



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 770**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 39/395</b> (2006.01)	<b>A61K 48/00</b> (2006.01)
<b>C07K 16/40</b> (2006.01)	<b>C12N 9/48</b> (2006.01)
<b>C12Q 1/68</b> (2006.01)	<b>G01N 33/573</b> (2006.01)
<b>A61P 11/06</b> (2006.01)	<b>G01N 33/564</b> (2006.01)
<b>A61P 37/00</b> (2006.01)	<b>A61K 38/55</b> (2006.01)
<b>G01N 33/577</b> (2006.01)	<b>G01N 33/543</b> (2006.01)
<b>C12N 15/11</b> (2006.01)	<b>C12N 9/64</b> (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03734121 .1**

96 Fecha de presentación : **21.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1513553**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54 Título: **Procedimiento y materiales para el tratamiento y diagnóstico de afecciones inflamatorias relacionadas con kaliceína-6.**

30 Prioridad: **21.05.2002 US 382471 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

73 Titular/es: **MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL  
EDUCATION AND RESEARCH  
200 First Street S.W.  
Rochester, Minnesota 55905, US  
Florida State University**

72 Inventor/es: **Scarisbrick, Isobel, A.;  
Blaber, Sachiko, I. y  
Blaber, Michael**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 316 770 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

Procedimientos y materiales para el tratamiento y diagnóstico de afecciones inflamatorias relacionadas con kaliceína-6.

### Campo técnico

La invención se refiere a los usos y materiales para el tratamiento de afecciones inflamatorias. Más específicamente, la invención se refiere al uso de moduladores de la actividad de la proteasa kaliceína 6 para tratar afecciones inflamatorias tales como esclerosis múltiple.

### Antecedentes

La esclerosis múltiple (EM) es un trastorno de desmielinización que afecta a alrededor de 350.000 personas en Estados Unidos en la actualidad, con 8.000 nuevos casos descritos cada año. La EM es la más común de las enfermedades crónicas que implica al sistema nervioso. La mayoría de las personas con EM se diagnostican en edades comprendidas entre los 20 y los 50 años aunque, en casos excepcionales, los síntomas podrían aparecer en la niñez o después de los 50 años. La EM es dos veces más común en mujeres que en hombres y se diagnostica más frecuentemente en caucásicos que en otros grupos raciales. La causa de la EM es desconocida, aunque existe una considerable evidencia de que es una enfermedad autoinmune. Aunque la enfermedad no provoca una muerte temprana ni impide las funciones cognitivas, incapacita al paciente por alterar su agudeza visual; estimular doble visión, alterar las funciones motoras que afectan a la capacidad de andar y el uso de las manos; producir incontinencia intestinal y de vejiga; por movimientos espasmódicos; y por déficit sensorial, tal como de tacto, dolor y sensibilidad a la temperatura.

Los pacientes, normalmente, se diagnostican en base a una combinación entre la historia del paciente y el examen neurológico, que incluye la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) del cerebro y de la médula espinal, procedimientos de electrodiagnóstico (por ejemplo, ensayos de potenciales evocados tales como potenciales evocados visuales, potenciales evocados auditivos del tallo cerebral, o potenciales evocados somatosensoriales); y punción lumbar para determinar evidencia de síntesis de inmunoglobulinas en el fluido cerebroespinal.

Actualmente, no existe una cura disponible para la EM, de forma que el tratamiento implica la supervisión de los síntomas y el tratamiento de la frecuencia y gravedad de las recaídas. Los agentes terapéuticos que se han aprobado desde 1993 incluyen al interferón- $\beta$  para su uso en pacientes ambulatorios con EM remitente-recurrente (Paty *et al.*, *Neurology* 43: 662-667, 1993) (por ejemplo, Betaseron<sup>®</sup> (interferón  $\beta$ -1 $\beta$  recombinante) y Avonex<sup>®</sup> (interferón  $\beta$ -1 $\alpha$  recombinante; acetato de glatiramer (Copaxone<sup>®</sup>) para EM remitente-recurrente; y Novantrone<sup>®</sup> en el caso de enfermedad progresiva secundaria y remitente-recurrente.

El documento WO 94/29336 describe nuevos derivados peptídicos que inhiben las serin-proteasas de tipo tripsina. El documento US2001/016331 se refiere a un monoclonal específico de la neurosina humana y a anticuerpos policlonales usados para la detección de dicha proteína en el fluido cerebroespinal de pacientes con enfermedad de Alzheimer. El documento CA 2360219 describe un procedimiento para la detección inmune de la kaliceína 6 humana en la sangre de pacientes con enfermedad de Alzheimer. El documento WO9811238 se refiere a la detección de una nueva serin-proteasa denominada proteasa M por cuantificación de los niveles de proteína o ARNm de la misma. Blaber *et al.* (*BIOCHEM*, 2002, vol. 41, n° 4, pp. 1165-73) describen una expresión aumentada de la proteasa específica de mielencéfalo en un modelo de esclerosis múltiple inducida por TMEV.

### Resumen

La invención se basa en el descubrimiento de que moduladores de la kaliceína 6 (K6) pueden alterar la patogénesis de las enfermedades mediadas por células inflamatorias tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en la periferia, y como resultado, pueden ayudar en el tratamiento y prevención de afecciones inflamatorias tales como EM, artritis reumatoide, lupus y asma. Como se describe en este documento, un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica a K6 reduce el grado de desmielinización y reduce las deficiencias de comportamiento en modelos animales de esclerosis múltiple.

La invención caracteriza el uso de un anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección inflamatoria en un mamífero. El uso incluye la administración a un mamífero de una cantidad de un modulador efectivo de K6 para tratar la afección inflamatoria y puede, adicionalmente, incluir la monitorización de la afección inflamatoria en el mamífero. La afección inflamatoria se puede seleccionar entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus y asma. El procedimiento es particularmente útil para la esclerosis múltiple. El modulador K6 es un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica a K6. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal y puede inhibir la actividad enzimática de K6.

En otro aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo que se une específicamente a K6 humana e inhibe la actividad enzimática de K6, y se revelan kits que contienen estos anticuerpos. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal. Un kit puede incluir adicionalmente una etiqueta o un prospecto que indica que el anticuerpo es útil para el tratamiento de una afección inflamatoria.

## ES 2 316 770 T3

La invención caracteriza también un procedimiento *ex vivo* para realizar un análisis de un individuo para detectar una afección inflamatoria. El procedimiento incluye la detección del nivel de proteína K6 humana, o de su ARN, presente en una muestra biológica del individuo; y la comparación del nivel de proteína K6 humana, o de su ARN, en la muestra respecto del nivel correspondiente en una población control, de forma que un aumento en el nivel de la proteína K6 humana, o su ARN, en el individuo respecto del correspondiente a la población control es indicativo de la afección inflamatoria en el individuo.

También se caracteriza un procedimiento *ex vivo* para monitorizar la terapia para una afección inflamatoria. El procedimiento incluye la detección del nivel de proteína K6 humana, o de su ARN, presente en una muestra biológica de un individuo que está sometido a tratamiento para la afección inflamatoria; y la comparación del nivel de proteína K6 humana, o de su ARN, en la muestra respecto de un nivel de línea base de la K6 humana presente en el individuo, de forma que una disminución en el nivel de la proteína K6 humana, o de su ARN, en el individuo respecto a la población control, es indicativo de una respuesta positiva a la terapia en el individuo. La afección inflamatoria se puede seleccionar entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus y asma. La muestra biológica se puede seleccionar entre el grupo constituido por suero y fluido cerebrospinal.

El nivel de proteína K6 humana se puede detectar inmunológicamente. Por ejemplo, el nivel de proteína K6 se puede detectar usando un anticuerpo monoclonal. El nivel de K6 se puede detectar usando un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, incluyendo el anticuerpo de detección un marcaje (por ejemplo, un fluoróforo tal como fluoresceína, isocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofococianina (APC) o proteína peridinin clorofila (PerCP); biotina; una enzima; o un radioisótopo. El anticuerpo de captura se puede unir a un sustrato sólido (por ejemplo, una bola o una placa de microensayo). El anticuerpo de captura puede ser un anticuerpo policlonal.

Se revela un oligonucleótido anti-sentido que inhibe la expresión de K6, teniendo el oligonucleótido, al menos, 8 nucleótidos de longitud. El oligonucleótido puede ser de, al menos, 15 nucleótidos de longitud.

A menos que se defina de otra forma, todos los términos científicos y técnicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente cualquier experto en la técnica al que se dirige esta invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales equivalentes a los descritos en esta memoria, en la práctica o en el ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones, será el control. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

### Descripción y dibujos

La Figura 1 contiene microfotografías en campo oscuro que muestran la localización autorradiográfica del ARNm de K6 en una sección transversal de médula espinal de una rata control y, en paralelo, ratas experimentales pareadas, 3 y 7 días después de la inyección intraperitoneal de KA. DF, LF y VF: funículos dorsal, lateral y ventral de materia blanca.

La Figura 2 contiene microfotografías de materia blanca (nWM) y gris (GM) normales en la médula espinal de animales control (panel izquierdo) y en asociación con células inflamatorias en los sitios de desmielinización activa, 180 días después de la infección con TMEV (panel derecho). Los oligodendrocitos están señalados por flechas; barra = 200  $\mu\text{m}$ .

La Figura 3A es una microfotografía de una lesión MS activa crónica bien delimitada (tinción de mielina con azul luxol rápido/ácido peryódico de Schiff (LFB/PAS), La Figura 3B es una vista a mayor aumento de la Figura 3A. La Figura 3C es una sección paralela a 3A, teñida para K6-IR, que se regula positivamente en células inflamatorias en la frontera entre la placa (PL) y la periplaca de materia blanca (PPWM), en el lateral de la lesión (flecha). La Figura 3D es una vista a mayor aumento de la Figura 3C; barra = 200  $\mu\text{m}$ .

La Figura 4 es una gráfica de la cantidad de proteína K6 detectada en suero de ratones no infectados (control, círculo sólido), o en ratones a 90 y 180 días después de la infección con TMEV (círculos abiertos y triángulos sólidos, respectivamente).

Las Figuras 5A-5B son fotografías de geles del 7,5% de SDS-PAGE (reductores) teñidos con azul Coomassie, que representan la degradación de colágeno de tipo I (5A), fibronectina (5B) y laminina (5C). En la Figura 5A, las líneas 1-6 son: patrones de masa molecular (kDa), gelatina + K6 a 0 minutos; 5 minutos; 30 minutos; 60 minutos; gelatina sola a 60 minutos de incubación, respectivamente. En la Figura 5B, las líneas 1-5 son: patrones de masa molecular; fibronectina + K6 a 0 minutos; 1 hora; 24 horas; fibronectina control a 24 horas, respectivamente. En la Figura 5C, las líneas 1-5 son: laminina + K6 a 0 horas; 1 hora; 16 horas; laminina control a 16 horas, patrones de masa molecular, respectivamente.

## ES 2 316 770 T3

Las Figuras 6A y 6B son fotografías de geles del 16,5% de Tricina SDS PAGE que muestran la degradación de la proteína básica de mielina de rata por K6 (11A) y del fragmento externo  $\alpha$ MOG de rata (residuos 1-125) por K6. En la Figura 6A, las líneas 1-9 son: patrones de masa molecular; no K6, 0 minutos; 1 minuto; 2 minutos; 5 minutos; 10 minutos; 30 minutos; 60 minutos de incubación con K6, respectivamente. En la Figura 6B, las líneas 1-6 son marcadores de masa molecular, 0 minutos; 1 hora; 4 horas; 12 horas y marcadores de peso molecular, respectivamente.

La Figura 7 es una gráfica del número de células que han migrado en función del tratamiento. \*P<0,05, SNK.

La Figura 8 es un Western blot de K6 (flecha a 25 kDa) en OLG en proliferación (Pro), y después de 48 horas, 72 horas y 7 días en cultivo.

La Figura 9 es un Western blot que muestra que el inhibidor endógeno de K6 es único en SNC, respecto a tejidos que no son del SNC. La proteína K6 madura está marcada con una flecha. Las líneas 1-4 son 10 ng de r-K6; 2,2 mg/ml de médula espinal; 6,4 mg/ml de cerebro; 9,6 mg/ml de riñón, respectivamente. Los complejos de alto peso molecular podrían representar la formación de complejos K6/inhibidor, con masas de aproximadamente 42 y 91 kDa. El complejo de 91 kDa mayor se encuentra principalmente en el riñón (asterisco doble), mientras que el complejo de 42 kDa se encuentra predominantemente en el cerebro y en la médula espinal (asterisco sencillo).

Las Figuras 10A-10B son gráficas del número de células de oligodendroglia diferenciadas después de la exposición a cantidades diferentes de K6 recombinante *in vitro*. \*p < 0,05, SNK.

La Figura 11 es una gráfica que representa la respuesta de anticuerpos frente a K6.

La Figura 12 es una gráfica que representa títulos altos de anticuerpos frente a K6 y disminución de la desmielinización y de la inflamación en la médula espinal, en el modelo TMEV de EM. Cuantificación del porcentaje de cuadrantes de médula espinal con desmielinización o inflamación en animales, 40 días después de la infección con TMEV, que se habían inmunizado previamente con K6 u OVA en ACF, con ACF sólo o sin ninguna inmunización previa (ninguna). La inmunización de ratones con K6 (5 semanas antes de la infección con TMEV) disminuye significativamente el número de cuadrantes de médula espinal asociados con desmielinización o inflamación, respecto a todos los grupos control inmunizados (ANOVA, p < 0,002, \*SNK, P < 0,05).

La Figura 13 es una gráfica que indica que la inmunización con K6 resulta en una patología de la materia blanca significativamente inferior después de la infección con TMEV. Cuantificación del área de patología de materia blanca a lo largo de la longitud de la médula espinal, 40 después de la infección con TMEV, en ratones inmunizados con K6, respecto a ratones control inmunizados con OVA, ACF solo, o sin ninguna inmunización anterior (ninguna). La inmunización con K6 se asoció con una reducción superior a 3 veces en el porcentaje de materia blanca de médula espinal asociada con la patología (ANOVA, P < 0,002, \*SNK, P < 0,05).

Las Figuras 14A y B son histogramas que cuantifican la patología de cerebro en animales control inmunizados con ACF solo (A) o con K6 (B). Cada símbolo representa un ratón individual calificado en una escala de 0 a 4. Cb, cerebelo; TC, tallo cerebral; Est, cuerpo estriado; Ctx, córtex, Hipo, hipocampo; CCall, cuerpo calloso; Mng, inflamación meníngea.

La Figura 15 es una gráfica que representa respuestas de DTH a la enfermedad inducida por TMEV. Los datos mostrados representan el cambio medio a 48 horas en el grosor de la oreja  $\pm$  DEM, en respuesta a la infección con 2,5  $\mu$ g de TMEV purificado irradiado con UV. Las respuestas DTH se redujeron significativamente en ratones inmunizados con K6, a un tiempo de 48 horas (\*P < 0,05, ensayo de la t de Student desapareado), en comparación con ratones inmunizados con PBS solo que contenía ACF.

Las Figuras 16A y 16B son gráficas que indican que la inmunización con K6 en el momento de la inducción de EAE, retrasa el inicio y atenúa la gravedad de EAE inducida por PLP 139-151. Los ratones se inmunizaron con PBS o K6 a la vez que se realizaba una estimulación inicial con 100  $\mu$ g de PLP 139-151 en ACF. (A) los datos representan la puntuación clínica media de cada grupo frente al tiempo. Las puntuaciones clínicas de ratones inmunizados con K6 fueron significativamente inferiores a las de ratones control inmunizados con PBS, a partir del D9 y en el resto del curso de la enfermedad examinado; \*P<0,05, ensayo U de Mann-Whitney. (B) la inmunización con K6 en el momento de la estimulación inicial se asoció también con un aumento significativo en la supervivencia (10/28 en comparación con 22/28, P = 0,003  $\chi^2$  usando un ensayo exacto de Fisher).

Las Figuras 17A y 17B son gráficas que indican que la inmunización previa con K6 retrasa el inicio del desarrollo de la enfermedad clínica e histológica en ratones estimulados inicialmente con PLP 139-151. (A) el día medio del inicio y el tiempo en el que la enfermedad alcanza su máximo se retrasaron de 3 a 4 días en ratones inmunizados con K6, en comparación con ratones no inmunizados y con controles inmunizados con PBS (P<0,02). Los ratones inmunizados con K6 presentan también una media significativamente reducida en las puntuaciones clínicas diarias hasta el día 15 posterior a la estimulación inicial con PLP (\*P<0,001, ensayo U de Mann-Whitney). (B) La evaluación histológica detallada de la médula espinal de ratones en cada grupo en día 21, indicaba que la inmunización previa con K6 reducía tanto la extensión de la patología parenquimal como la inflamación meníngea, en comparación con cada uno de los grupos control examinados (\*U de Mann Whitney, P<0,05).

## ES 2 316 770 T3

Las Figuras 18 A-D son gráficas que representan que la inmunización previa con K6 atenúa la enfermedad clínica, el desarrollo de la patología en el SNC y el desarrollo de respuestas Th1 *in vivo* e *in vitro*, cuando se examinan durante la fase aguda de la enfermedad. (A) la gravedad de la enfermedad clínica se redujo en ratones inmunizados previamente con K6, en comparación con los grupos control inmunizados solo con PBS, o que no recibieron inmunización previa (\*U de Mann Whitney,  $P < 0,05$ ) (n=14 por grupo). (B) el número de cuadrantes en la médula espinal asociados con patología o con inflamación meníngea se redujo significativamente también en ratones inmunizados previamente con K6 respecto de los controles, cuando se examinan a un tiempo de 12 días (ensayo de la t de Student desapareado,  $P \leq 0,05$ ). (C) se recogieron los linfocitos esplénicos de todos los ratones inmunizados en (A), y se cultivaron las células viables ( $5 \times 10^5$ /pocillo) con las concentraciones indicadas de PLP 139-151 durante 4 días. Se dio un pulso de  $^3\text{H-TdR}$  a cultivos 18 horas antes de recogerlos. Los datos mostrados representan los datos combinados de dos experimentos independientes. Los esplenocitos recogidos del ratón inmunizado con K6 presentaron una proliferación significativamente inferior en respuesta a la estimulación inicial con el antígeno, en comparación con sus controles de inmunización (\* $P \leq 0,005$ , ensayo de la t de Student desapareado). (D) las respuestas de DTH frente al péptido estimulador PLP 139-151 se evaluaron en todos los ratones en el día 9 después de la estimulación. Los datos mostrados representan la media, a 24 horas y a 48 horas, del cambio en el grosor de la oreja  $\pm$  DEM, en respuesta a una inmunización con  $10 \mu\text{g}$  de péptido 139-151. Las respuestas de DTH se redujeron significativamente en ratones inmunizados con K6 en el tiempo de 48 horas (\* $P < 0,05$ , ensayo de la t de Student desapareado).

La Figura 19 contiene gráficas que representan una disminución en la producción de citocinas específicas de Th1 en respuesta a la inmunización con K6. Los esplenocitos se cultivaron a partir de los animales descritos en las Figuras 18A a 18D en el día 12 después de la inducción de EAE y se estimularon con el antígeno de la estimulación inicial, PLP-139-151, durante un periodo de 72 horas. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se analizó en ellos la secreción de  $\text{IFN-}\gamma$  e  $\text{IL-2}$  por técnicas de captura de ELISA. La producción de  $\text{IFN-}\gamma$ , una citocina Th1, se redujo significativamente en ratones inmunizados con K6 (\*ensayo de la t de Student desapareado,  $P \leq 0,05$ ). Contrastando con esto, la  $\text{IL-2}$ , una citocina Th0, fue comparable entre los diferentes grupos experimentales.

La Figura 20A es una fotografía de un gel del 20% de Tricina SDS-PAGE (realizado en condiciones reductoras) que muestra la hidrólisis de MBP de rata en presencia o ausencia de IgG aislada de ratones control o inmunizados con K6. Líneas: 1, marcadores de peso molecular; 2, IgG anti-K6 + MBP; 3, IgG anti-ACF + K6 + MBP; 4, K6 + MBP; 5, IgG anti-K6 + MBP; 6, IgG anti- ACF + MBP; 7, MBP sola.

La Figura 20B es una gráfica que representa la velocidad de hidrólisis del sustrato AcATRpNA a lo largo del tiempo por K6 en presencia de IgG aislada de ratones control o inmunizados con K6.

La Figura 21 es una gráfica que representa la capacidad de anticuerpos monoclonales específicos de K6 para bloquear la actividad enzimática de K6 *in vitro*.

La Figura 22 es una gráfica que representa que la inmunoglobulina aislada de ratones inmunizados con K6 inhibe la migración de esplenocitos activados *in vitro*. En comparación con IgG normal de ratón (control) y con la no adición de anticuerpo, la adición de IgG específica de K6 inhibía la migración en un 25% (\*ensayo de la t de Student desapareado).

Las Figuras 23A y 23B son histogramas que muestran la tinción intracelular de K6 determinada por citometría de flujo. Las áreas rellenas muestran la expresión intracelular constitutiva de K6 por esplenocitos  $\text{CD4}^+$  (A) y  $\text{CD8}^+$  (B) cultivados en PBS.

Las Figuras 24A y 24B son gráficas que representan que la activación de esplenocitos resulta en un incremento en la producción y secreción de K6. Los esplenocitos se crecieron en medio que contenía PBS, como un control (A) o en medio que contenía  $10 \mu\text{g/ml}$  de ConA,  $5 \text{ mg/ml}$  de LPS (B). Alternativamente, los frascos de cultivo se recubrieron previamente con  $10 \mu\text{g/ml}$  de anticuerpo anti-CD3 (Ab) para el entrecruzamiento del receptor CD3. La activación específica de células T (Con A y Ab anti-CD3), o la activación no específica de todos los esplenocitos, producían un incremento significativo en la producción de K6 y de la secreción en el medio, en comparación con las células crecidas en PBS solo.

La Figura 25 es la secuencia de nucleótidos que codifica la K6 humana.

### Descripción detallada

En general, la invención proporciona el uso de un anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de afecciones inflamatorias en mamíferos usando moduladores de K6, así como procedimientos *ex vivo* para la detección de la presencia de una afección inflamatoria y la monitorización del estado de enfermedad inflamatorio, mediante la detección del nivel de proteína K6 o de un ácido ribonucleico que codifica K6 en muestras biológicas de mamíferos. El término "K6", como se usa en esta memoria, se refiere a la calicreína 6 de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas y seres humanos). Se debería apreciar que la K6 humana se denomina también proteasa M, neurosina, zyme y proteasa específica de mielencéfalo (MSP). En el ratón, K6 también se denomina serin proteasa de piel y cerebro (BSSP) o serin proteasa de cerebro (BSP). La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína K6 humana

## ES 2 316 770 T3

se puede encontrar en el GenBank bajo los números de acceso, AF013988, AF149289 y D78203. K6 se expresa en el SNC y dentro del SNC es más abundante en el hipocampo, sustancia nigra, ganglios basales y médula espinal. K6 presenta una distribución limitada en tejidos no neurales. En la materia blanca normal, la expresión de K6 está asociada casi exclusivamente con la oligodendroglia. Los niveles de K6 se regulan positivamente tanto en elementos neurales como en elementos gliales, después de eventos que producen lesión, tales como la lesión excitotóxica mediada por el receptor de glutamato.

Sin pretender quedar vinculado a un mecanismo particular, K6 se localiza tanto en macrófagos como en subpoblaciones de células T, en sitios de inflamación y desmielinización del SNC y puede degradar proteínas específicas de mielina y de la matriz extracelular y, cuando está presente en exceso, afecta de forma negativa a la integridad y al proceso de crecimiento de oligodendrocitos. K6 podría facilitar la migración transendotelial de células inflamatorias y dentro del SNC.

### 15 *Tratamiento de afecciones inflamatorias*

El término “afección inflamatoria”, como se usa en esta memoria, se refiere a cualquier enfermedad mediada por células inflamatorias en el SNC o en la periferia, que incluye enfermedades infecciosas (bacterianas o virales) y autoinmunes. Los ejemplos no limitantes de afecciones inflamatorias que afectan al sistema nervioso incluyen, EM; todos los tipos de encefalitis y meningitis; encefalomielitis diseminada aguda; mielitis transversa aguda; neuromielitis óptica; síndromes de desmielinización focal (por ejemplo, esclerosis concéntrica de Baló y variantes de Marburg de la EM); leucoencefalopatía multifocal progresiva; panencefalitis esclerosante subaguda; leucoencefalitis hemorrágica aguda (enfermedad de Hurst); mielopatía asociada al virus linfotrófico T humano de tipo 1/paraparesis espástica tropical; enfermedad de Devic; encefalopatía por el virus de inmunodeficiencia humano; mielopatía vacuolar por el virus de inmunodeficiencia humano; neuropatías periféricas; Síndrome de Guillain-Barre y otras neuropatías mediadas por el sistema inmune; y miastenia grave. Los ejemplos no limitantes de afecciones inflamatorias que no son del sistema nervioso incluyen artritis reumatoide; osteoartritis; artritis infecciosa; artritis psoriática; policondritis; trastornos periarticulares; colitis; pancreatitis; lupus eritematoso sistémico; conjuntivitis, diabetes de tipo II; dermatitis; asma; esclerosis sistémica (escleroderma); síndrome de Sjogren; Síndrome de Behcet; vasculitis sarcoidosis amiloidosis; alergias; anafilaxis; mastocitosis sistémica; y enfermedades infecciosas de órganos internos tales como hepatitis o úlceras.

Normalmente, un modulador de K6 se administra a un mamífero tal como un paciente humano que se ha diagnosticado con una afección inflamatoria (por ejemplo, EM). Los moduladores adecuados pueden disminuir los niveles de proteína K6, o inhibir la actividad de K6. Los moduladores de K6 que se usan son anticuerpos que tienen afinidad de unión específica a K6. Los moduladores de K6 se pueden administrar también profilácticamente a pacientes con riesgo de desarrollar afecciones inflamatorias para evitar que se produzca el desarrollo de síntomas de la enfermedad, para retrasar el inicio de los síntomas o para disminuir la gravedad de los síntomas de la enfermedad que se desarrollará posteriormente. Como se describe en esta memoria, la inmunización con K6 en un modelo autoinmune de EM (modelo de encefalomielitis alérgica experimental (EAE)) inhibe el desarrollo de signos clínicos de EAE. En cualquier caso, una cantidad de un modulador de K6 efectiva para tratar la afección inflamatoria se administra al paciente. El tratamiento de una afección inflamatoria puede incluir la reducción de la gravedad de la enfermedad o la lentificación de la progresión de la enfermedad. Como se usa en esta memoria, el término “cantidad efectiva” se refiere a una cantidad de un modulador K6 que reduce los efectos deletéreos de la afección inflamatoria sin inducir una toxicidad significativa en el huésped. Las cantidades efectivas de moduladores de K6 pueden ser determinadas por un médico, teniendo en cuenta varios factores que pueden modificar la acción de fármacos, tales como el estado de salud, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo y la vía de administración, otras medicaciones y cualquier otro factor clínico relevante.

Un modulador K6 se puede administrar por cualquier vía, que incluye, sin limitación, las vías oral y parenteral de administración tales como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intratecal, intraarterial, nasal, transdérmica (por ejemplo, como un parche) o absorción pulmonar. Un modulador de K6 se puede formular como, por ejemplo, una disolución, suspensión o emulsión con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, adecuados para la vía particular de administración, que incluyen portadores acuosos estériles o no acuosos. Los portadores acuosos incluyen, sin limitación, agua, alcohol, disolución salina y disoluciones tamponadas. Los ejemplos de portadores no acuosos incluyen, sin limitación, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables. También podrían estar presentes conservantes, aromatizantes, azúcares y otros aditivos tales como antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

Para la administración oral, se pueden preparar comprimidos o cápsulas por los procedimientos convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); agentes de relleno (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); agentes de desintegración (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato sódico). Los comprimidos se pueden recubrir por procedimientos conocidos en la técnica. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular también para proporcionar una liberación controlada del compuesto.

## ES 2 316 770 T3

Las preparaciones nasales se pueden presentar en una forma líquida o como un producto seco. Las suspensiones o disoluciones acuosas nebulizadas pueden incluir portadores o excipientes para ajustar el pH y/o tonicidad.

En algunas formas de realización, los agentes anti-inflamatorios se administrarán en combinación con un modulador de K6. Por ejemplo, se puede administrar a un individuo un agente anti-inflamatorio no esteroideo tal como acetaminofén (paracetamol), ibuprofeno o nabumetona o un esteroide tal como prednisolona. También se puede administrar un modulador de K6 con un inmunomodulador tal como interferón  $\beta$  (por ejemplo, Betaseron<sup>®</sup> (interferón  $\beta$ -1 $\beta$  recombinante) y Avonex<sup>®</sup> (interferón  $\beta$ -1 $\alpha$  recombinante); acetato de glatiramer (Copaxone<sup>®</sup>) para EM remitente-recurrente; o Novantrone<sup>®</sup>.

Los procedimientos *ex vivo* de la invención pueden incluir la monitorización de la afección inflamatoria para determinar, por ejemplo, si la afección inflamatoria está mejorando con el tratamiento. Se puede utilizar cualquier procedimiento para monitorizar una afección inflamatoria. Por ejemplo, para pacientes con esclerosis múltiple se puede monitorizar la función de las extremidades inferiores, la función de las extremidades superiores, la visión y la función cognitiva. Se pueden realizar técnicas de formación de imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, recuperación de la inversión atenuada por fluidos) para examinar lesiones y para diferenciar lesiones antiguas de las nuevas o de lesiones activas. Los ensayos de potenciales evocados se pueden realizar para monitorizar la transmisión nerviosa. Por ejemplo, los potenciales evocados se pueden usar para detectar neuritis óptica. Los potenciales evocados auditivos del tallo cerebral se pueden usar para detectar anomalías en pacientes con lesiones desmielinizantes en el tallo cerebral que pueden causar retrasos en la transmisión de sonido. Los potenciales evocados somatosensoriales se pueden usar para detectar alteraciones en las rutas desde los brazos y piernas al cerebro en posiciones muy específicas del SNC. El fluido cerebroespinal se puede examinar para detectar productos de rotura de la mielina, bandas oligoclonales o anticuerpos IgG (por ejemplo, índice de IgG). Además, como se discutirá más adelante, se pueden monitorizar los niveles de proteína K6 y de su ácido ribonucleico (ARN).

### *Anticuerpos anti-K6*

Los anticuerpos que tienen una afinidad de unión específica a K6 se pueden usar para modular K6 (por ejemplo, disminución de actividad). Como se usa en esta memoria, los términos “anticuerpo” o “anticuerpos” incluyen moléculas intactas, así como fragmentos de las mismas que son capaces de unirse a un determinante epitópico de la proteína K6 (por ejemplo, proteína K6 humana). El término “epítipo” se refiere a un determinante antigénico sobre un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten, normalmente, en grupos de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y, normalmente, tienen características estructurales tri-dimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos generalmente tienen, al menos, cinco aminoácidos contiguos (un epítipo continuo) o, alternativamente, pueden ser un grupo de aminoácidos no contiguos que definen una estructura particular (por ejemplo, un epítipo conformacional). Los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos o humanizados, fragmentos de anticuerpos Fv de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos F(ab)<sub>2</sub>. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo que están contenidas en el suero de animales inmunizados. Los anticuerpos monoclonales son poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un epítipo particular de un antígeno.

Los fragmentos de anticuerpo que tienen una afinidad de unión específica a K6 se pueden generar por técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab se pueden generar por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir genotecas de expresión de Fab. Véase, por ejemplo, Huse *et al.*, Science, 246: 1275 (1989). Una vez producidos, los anticuerpos o fragmentos del mismo se analizan para determinar su reconocimiento de K6 mediante procedimientos de inmunoensayo estándar, que incluyen las técnicas de ELISA, radioinmunoensayo y Western blot. Véase, Short Protocols in Molecular Biology, capítulo 11, Green Publishing Associates and John Wiley & Sons. Editado por Ausubel, F.M. *et al.*, 1992.

Los anticuerpos que tienen una afinidad de unión específica a K6 se pueden producir mediante procedimientos estándar. En general, un polipéptido K6 se puede generar de forma recombinante, o se puede purificar a partir de una muestra biológica, y usarse para inmunizar animales. Como se usa en esta memoria, el término “polipéptido” se refiere a un polipéptido de, al menos, cinco aminoácidos de longitud. Para producir un polipéptido K6 recombinante, una secuencia de un ácido nucleico que codifica un polipéptido K6 se puede unir en un vector de expresión y usarse para transformar una célula huésped bacteriana o eucariota. Las construcciones de ácidos nucleicos incluyen, normalmente, una secuencia reguladora unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico de K6. Las secuencias reguladoras no codifican, normalmente, un producto génico, sino que afectan a la expresión de la secuencia de ácido nucleico. En los sistemas bacterianos, se puede usar una cepa de *Escherichia coli*, tal como BL-21. Los vectores *E. coli* adecuados incluyen las series pGEX de vectores que producen proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). Las bacterias *E. coli* transformadas se crecen, normalmente, de forma exponencial y, posteriormente, se estimulan con isopropiltiogalactopiranosido (IPTG) antes de recogerlas. En general, estas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas por adsorción a bolas de agarosa-glutatión, seguido por la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para que incluyan trombina o sitios de rotura de la proteasa factor Xa de forma que el producto génico diana clonado se pueda liberar del resto GST.

## ES 2 316 770 T3

Las líneas celulares de mamíferos que expresan de forma estable un polipéptido K6 se pueden producir mediante el uso de vectores de expresión con los elementos control apropiados y un marcador de selección. Por ejemplo, el vector de expresión eucariota pCDNA.3.1+ (Invitrogen, San Diego, CA) es adecuado para la expresión de un polipéptido K6 en, por ejemplo, células COS, células de ovario de hámster chino (CHO) o HEK293. Después de la introducción del vector de expresión por electroporación, DEAE dextrano, u otro procedimiento adecuado, se seleccionan líneas estables. Alternativamente, K6 se puede transcribir y traducir *in vitro* usando extracto de germen de trigo o un lisado de reticulocitos de conejo.

En células huésped eucariotas, se pueden usar varios sistemas de expresión basados en virus para expresar un polipéptido K6. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido K6 se puede introducir en un vector viral basado en vaccinia, un retrovirus o SV40 y usarse para infectar células huésped. Alternativamente, un ácido nucleico que codifica un polipéptido K6 se puede clonar en, por ejemplo, un vector de baculovirus y, posteriormente, usarse para transfectar células de insecto. Por ejemplo, el ADNc que codifica la secuencia de una forma de K6 madura se puede insertar en el vector de transferencia pBAC3 (Novagen, Madison, WI), inmediatamente después del extremo 3' de la secuencia (Asp)<sup>4</sup>Lys de reconocimiento de la enteroquinasa (EK). Esto resulta en un pro-secuencia sintética de 44 aminoácidos (que termina en la secuencia de reconocimiento de EK) por delante del extremo amino-terminal de la secuencia Val-Val-His-Gly (SEQ ID n° 1) de la forma madura de K6. Para la expresión de K6 en un vector de transferencia pBAC3 se puede usar el sistema de transfección BacVector (Novagen, Madison, WI). La línea celular de insecto Sf9, junto con el medio libre de suero sf-900 II (life Technologies, Rockville, MD), se pueden usar para la preparación de un stock viral con un título alto (esto es, > 10<sup>9</sup> pfu/ml). La línea celular de insecto TN5 (High5, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) se puede usar para la producción de la proteína expresada por el stock viral. La proteína K6 recombinante se puede purificar en una única etapa utilizando una fusión con una cola de His y una resina de afinidad de níquel (Ni-NTA). La fracción K6 eluida se puede agrupar y dializar exhaustivamente frente a 40 mM Tris-HCl, pH 7,5 (o 40 mM de acetato sódico, pH 4,5), usando una bolsa de diálisis con un límite de retención de 6-8 kDa de peso molecular (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA).

Se pueden inmunizar distintos animales huésped por inyección del polipéptido K6. Los animales huésped incluyen conejos, pollos, ratones, cobayas y ratas. Los distintos adyuvantes que se pueden usar para aumentar la respuesta inmunológica dependen de la especie animal e incluyen adyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de la lapa (keyhole limpet) y dinitrofenol. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando un polipéptido K6 y la tecnología de hibridomas estándar. En particular, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo, tales como las descritas por Kohler, G. *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), la técnica de hibridomas de células B humanas (Kosbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026 (1983)) y la técnica de hibridomas-EBV (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96 (1983)). Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales de la invención se puede cultivar *in vitro* e *in vivo*.

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención pueden inhibir la actividad enzimática de K6. Los ensayos *in vitro* se pueden usar para monitorizar la actividad K6 después de incubación en presencia de un anticuerpo. Normalmente, K6 se puede incubar con un anticuerpo (por ejemplo, policlonal o monoclonal) y, posteriormente, se puede determinar la capacidad de K6 para romper un sustrato tal como la proteína básica de mielina o un sustrato fluorogénico específico, con arginina, a 37°C en un tampón adecuado (por ejemplo, tampón Tris). Dependiendo del sustrato, la rotura se puede monitorizar usando electroforesis en gel de poliacrilamina (PAGE)-dodecil sulfato sódico (SDS) o un espectrofotómetro.

### 50 Identificación de moduladores de K6

Se revelan procedimientos para identificar moduladores de K6 que sean adecuados para el tratamiento de una o más afecciones inflamatorias en mamíferos. Se pueden usar modelos *in vitro* o *in vivo* de afecciones inflamatorias para identificar moduladores adecuados de K6. Las líneas celulares *in vitro*, que incluyen la línea celular CG4 OLG, o explantes cultivados, o cultivos (por ejemplo, cultivos purificados de progenitores OLG) de un modelo animal, se pueden usar para identificar moduladores K6 adecuados. Estas células se pueden tratar con un compuesto bajo análisis a lo largo de un periodo de tiempo (por ejemplo, días, semanas o más) y, posteriormente, se pueden recoger y examinar las muestras (por ejemplo, células y medio celular), por ejemplo, para determinar la estabilidad del proceso y el crecimiento de OLG. Como control, se puede comparar el efecto del compuesto bajo análisis con cultivos tratados con un inhibidor de las serin proteasas (control positivo) o con cultivos sin tratar (control negativo). Otros ensayos para identificar moduladores de K6 incluyen poner en contacto los cultivos celulares inmunes con un compuesto bajo análisis y determinar la capacidad de trans migración de las células *in vitro*. Véase el Ejemplo 16 para un ensayo de este tipo. Además, K6 se puede incubar con un compuesto bajo análisis y se puede monitorizar la capacidad para romper un sustrato. Véase el Ejemplo 15 para un ensayo de este tipo.

Una vez que se ha determinado que el compuesto bajo análisis es efectivo *in vitro*, el compuesto bajo análisis se puede analizar *in vivo*. Por ejemplo, el compuesto bajo análisis se puede administrar a un modelo animal de esclerosis múltiple, tal como el modelo del virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV) o el mode-

## ES 2 316 770 T3

lo EAE (modelo autoinmune). Las muestras (por ejemplo, fluido cerebroespinal, sangre, suero o tejido) se pueden recoger a lo largo de un periodo de tiempo y analizarse. Por ejemplo, el fluido cerebroespinal se puede analizar para detectar productos de rotura de mielina. La patología de la médula espinal se puede examinar para determinar el grado de desmielinización e inflamación. Los animales se pueden examinar también para detectar deficiencias de comportamiento.

Se revelan procedimientos para el diseño, modelado e identificación de compuestos que se pueden unir a K6 e inhibir la actividad K6. Estos compuestos se pueden denominar también “ligandos” o “inhibidores”. Los compuestos diseñados, modelados e identificados por procedimientos de la invención tienen, típicamente, una afinidad de unión de, al menos, 1  $\mu\text{M}$  (por ejemplo, al menos 500 nM, al menos 100 nM, al menos 50 nM o al menos 10 nM) para K6.

Los compuestos identificados por procedimientos de la invención pueden ser polipéptidos tales como, por ejemplo, inhibidores de serin proteasas o anticuerpos. Alternativamente, un compuesto puede ser cualquier tipo de molécula adecuada que se una específicamente a K6.

El término “modelado” significa un análisis cuantitativo y/o cualitativo de la estructura/función del inhibidor de K6 en base a la información sobre su estructura tri-dimensional y a modelos de interacción con el inhibidor de K6. Estos incluyen modelos convencionales de dinámica molecular con base numérica y minimización de energía, modelos gráficos de ordenador interactivos, modelos mecánicos moleculares modificados y modelos de geometría de distancia y otras restricciones basadas en la estructura. El modelado típico se realiza usando un ordenador y se podría optimizar adicionalmente usando procedimientos conocidos.

Los procedimientos de diseño de ligandos que se unen específicamente (esto es, con alta afinidad) a K6, normalmente, se basan en ordenador e implican el uso de un ordenador que tiene un programa capaz de generar un modelo atómico. Los programas de ordenador que usan datos de cristalografía de rayos X son particularmente útiles para el diseño de ligandos que pueden interaccionar con K6. Los programas tales como RasMol, por ejemplo, se pueden usar para generar un modelo tri-dimensional de K6 y/o determinar las estructuras implicadas en la unión al ligando. Los programas de ordenador tales como INSIGHT (Accelrys, Burlington, MA), GRASP (Anthony Nicholls, Columbia University), Dock (Molecular Design Institute, University of California at San Francisco), y Auto-Dock (Accelrys) permiten una manipulación adicional de la capacidad para introducir nuevas estructuras.

Los procedimientos pueden incluir, por ejemplo, proporcionar a un ordenador las coordenadas estructurales atómicas de los residuos de aminoácidos en K6 o en una porción de K6, usando el ordenador para generar un modelo atómico de K6 o de una porción de K6, proporcionando adicionalmente las coordenadas estructurales atómicas de un compuesto candidato, y generar un modelo atómico del compuesto posicionado de forma óptima para que interaccione con K6, e identificar el compuesto candidato como ligando de interés si el compuesto interacciona con K6. El término “posicionado de forma óptima” significa posicionado para optimizar las interacciones hidrófobas entre el compuesto candidato y K6.

Alternativamente, un procedimiento para diseñar un ligando que tienen una afinidad de unión específica a K6, puede utilizar un ordenador con un modelo atómico almacenado en su memoria. Las coordenadas atómicas de un compuesto candidato se pueden proporcionar posteriormente al ordenador, y se puede generar un modelo atómico del compuesto candidato posicionado de forma óptima.

También se podrían diseñar compuestos de forma interactiva a partir de la información estructural de los compuestos descritos en esta memoria, usando otras técnicas de diseño/modelado basadas en la estructura (véase, por ejemplo, Jackson, *Seminars in Oncology* 24:L164-172 (1997); y Jones *et al.*, *J. Med. Chem.* 39: 904-917 (1996)).

Los compuestos y los polipéptidos se pueden identificar también, por ejemplo, por identificación de compuestos candidatos por modelado por ordenador, como aquellos que interaccionan espacial y preferentemente (esto es, con alta afinidad) con K6, y posterior análisis de estos compuestos *in vitro* o *in vivo* por su capacidad para reducir la actividad de K6 o para disminuir la inflamación y/o la desmielinización. Los procedimientos adecuados para este análisis *in vitro* e *in vivo* incluyen los descritos en esta memoria.

### *Procedimientos ex vivo de uso de K6 como un marcador de afecciones inflamatorias*

Los niveles de proteína K6 humana o de su ARN se pueden usar para monitorizar la terapia de afecciones inflamatorias, para analizar la presencia de una afección inflamatoria, o para monitorizar el estado de enfermedad (por ejemplo, remisión de EM). En general, los procedimientos *ex vivo* de la invención incluyen la detección del nivel de proteína K6 humana, o de un ARN que codifica la proteína K6 humana, en una muestra biológica de un paciente (por ejemplo, un paciente humano) y la comparación del nivel de proteína K6 humana, o de su ARN, con el de una población control (por ejemplo, el nivel promedio de proteína K6 humana de distintos individuos sin una afección inflamatoria). Los procedimientos *ex vivo* para la detección de niveles de proteína K6 humana y de su ARN se describen a continuación. Las muestras biológicas adecuada para medir los niveles de K6 incluyen, por ejemplo, sangre (que incluye sangre total, plasma y suero), orina y fluido cerebroespinal (FCS). El suero y el FCS son muestras biológicas particularmente útiles.

## ES 2 316 770 T3

La presencia de una afección inflamatoria se puede determinar en base al nivel de proteína K6 humana, o de su ARN, respecto a la población control. Así, se determina si los niveles de la proteína K6 humana, o de su ARN, se incrementan, disminuyen o son iguales a los de la población control. Un aumento en el nivel de K6 respecto al de la población control es indicativo de una afección inflamatoria. Los factores adicionales que se pueden considerar cuando se diagnostica una afección inflamatoria incluyen, por ejemplo, la historia del paciente, la historia familiar, factores genéticos y/o un examen neurológico alterado (por ejemplo, para EM u otra afección inflamatoria neurológica).

Los niveles de proteína K6 humana, o de su ARN, en un individuo se pueden usar también para monitorizar el tratamiento. Normalmente, se obtiene la línea base del nivel de proteína K6, o de su ARN, del individuo (por ejemplo, antes del tratamiento) y se compara con el nivel de K6 a distintos puntos temporales después o entre los tratamientos (por ejemplo, uno o más días, semanas, o meses después del tratamiento). Una disminución en los niveles de proteína K6, o de su ARN, respecto a la línea base, es indicativo de una respuesta positiva al tratamiento. De forma similar, el estado de enfermedad en un individuo se puede monitorizar (por ejemplo, para detectar remisión de la enfermedad) comparando los niveles de proteína K6, o de su ARN, en el individuo respecto al nivel de la línea base de proteína K6, o de su ARN, del individuo.

### 20 *Detección de la proteína K6 ex vivo*

La proteína K6 se puede detectar, por ejemplo, inmunológicamente usando uno o más anticuerpos. En los ensayos inmunológicos, se puede marcar, directa o indirectamente, un anticuerpo que tienen una afinidad de unión específica a K6, o un anticuerpo secundario que se une a este anticuerpo. Los marcajes adecuados incluyen, sin limitación, radionúclidos (por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  o  $^{14}\text{C}$ ), restos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, FITC, PerCP, rodamina o OE), restos luminiscentes (por ejemplo, nanopartículas Qdot<sup>TM</sup> suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA), compuestos que absorben luz a una longitud de onda definida, o enzimas (por ejemplo, fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano). Los anticuerpos se pueden marcar indirectamente por conjugación con biotina y, posteriormente, detectarse con avidina o estreptavidina marcada con una molécula como las descritas anteriormente. Los procedimientos de detección o cuantificación de un marcaje dependen de la naturaleza del marcaje y se conocen en la técnica. Los ejemplos de detectores incluyen, sin limitación, películas de rayos X, contadores de radiactividad, contadores de centelleo, espectrofotómetros, colorímetros, fluorómetros, luminómetros y densitómetros. Se pueden usar combinaciones de estas aproximaciones (que incluyen ensayos “multicapa”), familiares a los expertos en la técnica, para aumentar la sensibilidad de los ensayos.

Los ensayos inmunológicos para detectar K6 se pueden realizar en una variedad de formatos conocidos, que incluyen ensayos en sándwich, ensayos de competición (RIA competitivo), o inmunoensayos puente. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n° 5.296.347, 4.233.402, 4.098.876 y 4.034.074. Los procedimientos para detectar K6 incluyen, generalmente, poner en contacto a la muestra biológica con un anticuerpo que se une a K6 y detectar la unión de K6 al anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que tienen una afinidad de unión específica a K6 se puede inmovilizar sobre un sustrato sólido por cualquiera de los distintos procedimientos conocidos en la técnica y exponerse, posteriormente, a la muestra biológica. La unión de K6 al anticuerpo sobre el sustrato sólido se puede detectar explotando el fenómeno de resonancia de plasmón superficial, que resulta en un cambio en la intensidad de la resonancia del plasmón superficial tras la unión, que se puede detectar cualitativa o cuantitativamente mediante un instrumento apropiado, por ejemplo, un aparato Biacore (Biacore International AB, Rapskatan, Sweden). Alternativamente, el anticuerpo se puede marcar y detectar como se describió anteriormente. Se puede generar una curva patrón utilizando cantidades conocidas de K6 para ayudar en la cuantificación de los niveles de K6.

En otras formas de realización, se usa un ensayo en “sándwich”, en el que el anticuerpo de captura se inmoviliza sobre un sustrato sólido para detectar el nivel de K6. El sustrato sólido se puede poner en contacto con la muestra biológica de forma que cualquier proteína K6 en la muestra se pueda unir al anticuerpo inmovilizado. El nivel de proteína K6 unida al anticuerpo se puede determinar usando un anticuerpo de “detección” que tenga afinidad de unión específica a K6 y por los procedimientos descritos anteriormente. Se entiende que en estos ensayos en “sándwich”, el anticuerpo de captura no se debería unir al mismo epítipo (o gama de epítipos en el caso de un anticuerpo policlonal) que el anticuerpo de detección. De esta forma, si se usa un anticuerpo monoclonal como anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección puede ser otro anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que, bien este físicamente separado de forma completa, o bien que sólo solape parcialmente, con el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal de captura, o un anticuerpo policlonal que se une a epítipos distintos de, o además de, aquel al que se une el anticuerpo monoclonal de captura. Si se usa un anticuerpo policlonal como anticuerpo de captura, el anticuerpo de detección puede ser, bien un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que este separado físicamente de forma completa, o bien que solape parcialmente con cualquiera de los epítipos a los que se une el anticuerpo policlonal de captura, o un anticuerpo policlonal que se une a epítipos distintos de, o además de, aquellos a los que se une el anticuerpo policlonal de captura. Los ensayos en sándwich se pueden realizar como ensayos de ELISA en sándwich, ensayos de Western blot en sándwich o ensayos de detección inmunomagnética en sándwich.

Los sustratos sólidos adecuados a los que se puede unir un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de captura) incluyen, sin limitación, placas de microensayo, tubos, membranas tales como membranas de nylon o de nitrocelulosa y

bolas o partículas (por ejemplo, agarosa, celulosa, vidrio, poliestireno, poliacrilamida, magnéticas o bolas o partículas magnetizables. Las partículas magnéticas o magnetizables pueden ser particularmente útiles cuando se usa un sistema de inmunoensayo automatizado.

- 5 Las técnicas alternativas para la detección de K6 incluyen las técnicas de espectrofotometría de masas tales como ionización por electropulverización (ESI) y desorción-ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI). Véanse, por ejemplo, Gevaert *et al.*, *Electrophoresis* 22 (9): 1645-51, 2001; Chaurand *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 10(2): 91-103, 1999. Los espectrofotómetros de masas útiles para estas aproximaciones están disponibles en Applied Biosystems (Foster City, CA); Bruker Daltronics (Billerica, MA) y Amersham Pharmacia (Sunnyvale, CA).

#### *Detección del ácido ribonucleico de K6 ex vivo*

- 15 El ARN de K6 se puede detectar, por ejemplo, mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por técnicas de blotting de ARN (por ejemplo, Northern blot). Por ejemplo, el ARN de K6 se puede detectar en células mononucleares de sangre periférica. En general, PCR se refiere a la amplificación de un ácido nucleico diana, al uso de la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá, para diseñar oligonucleótidos cebadores que sean idénticos o similares en secuencia a la cadena opuesta del molde que se va a amplificar. Los cebadores son, normalmente, de 14 a 40 nucleótidos en longitud, pero pueden oscilar entre 10 nucleótidos y cientos de nucleótidos en longitud. La PCR se describe, por ejemplo, en PCR Primer: A Laboratory Manual, Ed. por Dieffenbach, C. y Dveksler, G., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Los ácidos nucleicos se pueden amplificar también mediante una reacción en cadena de la ligasa, mediante amplificación por desplazamiento de la banda, por replicación de secuencia autosostenida o por amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico. Véanse, por ejemplo, Lewis, R., *Genetic Engineering News*, 12(9): 1 (1992); Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1874-1878 (1990); Weiss, R., *Science*, 254: 1292 (1991).

- Por ejemplo, los niveles de ARNm de K6 se pueden detectar usando transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se puede realizar PCR cuantitativa a tiempo real usando, por ejemplo, el sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7700 y las sondas fluorogénicas Taqman, o el instrumento LigthCycler™ de Roche.

#### *Artículos de fabricación*

- 35 Los anticuerpos que tienen una afinidad de unión específica a K6 se pueden combinar con un material de empaque y comercializarse como un kit para la detección de K6 a partir de muestras biológicas, para el tratamiento de afecciones inflamatorias, para la monitorización de terapias de afecciones inflamatorias, o para la monitorización de remisiones de la enfermedad (por ejemplo, de EM). Los componentes y procedimientos para la producción de artículos de fabricación son muy conocidos. Los artículos de fabricación se podrían combinar con uno o más anticuerpos anti-K6 o fragmentos de los mismos, como se describe en esta memoria. Además, los artículos de fabricación podrían incluir adicionalmente reactivos, tales como anticuerpos secundarios, tampones, moléculas indicadoras, fases sólidas (por ejemplo, bolas), agentes anti-inflamatorios adicionales, y/o otros reactivos útiles para la detección de K5 a partir de muestras biológicas, para el tratamiento de afecciones inflamatorias, para monitorización de la terapia de afecciones inflamatorias o para la monitorización de remisiones de la enfermedad. El anticuerpo anti-K6 puede estar en un contenedor, tal como un recipiente de plástico, polietileno, polipropileno, etileno o propileno, que sea un tubo o una botella con tapa. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-K6 se puede incluir sobre una fase sólida, tal como un dispositivo portátil para el análisis en la cabecera de la cama. También se podría incluir en los kits de este tipo, las instrucciones que describen como los distintos reactivos son específicos para el tratamiento de afecciones inflamatorias, o para la monitorización de la terapia de afecciones inflamatorias o para la monitorización de remisiones de la enfermedad.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

#### 55 **Ejemplos**

##### *Materiales y procedimientos*

- 60 *Lesiones de esclerosis múltiple (EM) humana:* Este estudio se realizó sobre material de archivo fijado con formalina o embebido en parafina procedente de autopsias de individuos con EM confirmada clínica y patológicamente. Se tiñeron secciones embebidas en parafina de 5  $\mu\text{m}$  con las tinciones neuropatológicas de rutina, que incluían hematoxilina-eosina, azul luxol rápido/ácido peryódico de Schiff (LFB/PAS), y teñido axonal por impregnación de plata de Bileschowski, así como inmunocitoquímica para los siguientes marcadores: anti-proteína proteolípido (MCA839, Serotec, Raleigh, NC), anti-glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (Dr. s. Piddlesden, University of Cardiff, RU), anti-K6 (véase más adelante). Todos los casos se sometieron a un examen neuropatológico detallado y se analizaron para detectar lesiones de desmielinización de materia blanca. La actividad de desmielinización se clasificó según un criterio establecido recientemente (Lassmann *et al.* (1998), *J. Ann. Neuroimmunol.* 86: 213-217). Las lesiones de

## ES 2 316 770 T3

desmielinización activa estaban infiltradas de forma difusa por macrófagos que contenían proteínas de mielina como marcadores de fagocitosis de mielina reciente y continua. Las lesiones desmielinizadas inactivas estaban completamente desmielinizadas sin signos de remielinización.

5 *Modelo de EM por el virus de encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV):* Hembras de ratones SJL/J (H-2<sup>s</sup>) de cuatro a ocho semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) se inyectaron intracerebralmente con  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de placas (p.f.u.) de la cepa Daniel del TMEV, en un volumen de 10  $\mu$ l. El cuidado y el manejo de los ratones se realizó según las directrices de las comisiones de cuidado y uso de animales del HHH y de la clínica Mayo. Los ratones se anestesiaron con pentobarbital (150 mg/kg) 30, 45, 90 y 120 días después de la infección, 10 y se perfundieron con 4% de paraformaldehído. Las médulas espinales se bloquearon transversalmente a 1 mm, se protegieron de la congelación en 25% de sacarosa, se congelaron en hielo seco y se seccionaron transversalmente a 20 pm. Alternativamente, los bloques se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 5 pm. Se obtuvieron médulas espinales no fijadas en los mismos puntos temporales, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

15 *EAE inducida por MOG:* Se obtuvieron monos del nuevo mundo de Clea Japan o del New England Regional Primate Research Center, y se alojaron en la colonia de primates de University of California, San Francisco, según todas las directrices de las comisiones para el uso y cuidado animal institucionales. Se indujo EAE por inmunización con 100 pg de  $\alpha$ MOG de rata recombinante (dominio extracelular que contenía los aminoácidos 1-125), emulsionado en adyuvante completo de Freund (ACF), seguido por una inyección intravenosa de  $10^{10}$  organismos muertos de *Bordetella pertussis* en el día 10 de inmunización y 48 horas más tarde. Los signos clínicos de EAE se desarrollaron entre los días 19 y 23 después de la inmunización. Los animales se sometieron a eutanasia cuando los signos empeoraron durante la fase aguda (40-42 días después de la inmunización), bajo anestesia profunda con barbiturato, por perfusión intracardíaca con 4% de paraformaldehído. Los bloques de médula espinal se procesaron para parafina y se tiñeron secciones de 5 pm de grosor con hematoxilina y eosina, o se procesaron para localizar la inmunorreactividad con K6.

30 *Inmunohistoquímica:* La tinción inmune de K6 en secciones de tejido de ratón, mono del nuevo mundo o ser humano, se llevaron a cabo usando biotina purificada. Los anticuerpos monoclonales de rata anti-K6 de cerebro de ratón, conjugados o sin conjugar (Scarlsbrick *et al.*, *Glia* 30: 219-230 (2000)) o los anticuerpos policlonales de conejo (Blaber *et al.*, *Biochem.* 41: 1165-1173 (2002)), generaban patrones de tinción idénticos en los tejidos examinados. Los marcadores específicos de la mezcla celular usados en los estudios de doble marcaje fueron: anticuerpo anti-proteína ácida fibrilar de glia (anti-GFAP); anticuerpo conjugado con Cy3 (Sigma, St Louis, MO); anticuerpo de rata anti-IgG F480 de ratón (Serotec); isolectina B4 biotinilada (Sigma); anticuerpo de rata anti-CD4 de ratón; o anticuerpo de rata anti-CD8b.2 de ratón en tricina (PharMingen, San Diego, California, EE.UU.). Los anticuerpos unidos se detectaron usando anticuerpos secundarios apropiados para cada especie, adsorbidos con ratón, conjugados con un fluorocromo (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), o con la técnica de la inmunoperoxidasa biotina-avidina (Vector Laboratories, Burlingame, CA). En todos los casos, como control de especificidad de la tinción inmune se incluyó una tinción como las descritas anteriormente pero omitiendo el anticuerpo primario.

40 *Hibridación in situ:* El examen de la expresión del ARNm de K6 y de la proteína proteolípido (PLP) en médula espinal de ratones infectados con TMEV se llevó a cabo usando sondas de ARNc marcadas con digoxigenina (DIG). La sonda específica de K6 se preparó por transcripción a partir de la construcción de ADNc de K6, pM514, que contenía un fragmento de 435 pares de bases (pb) de la K6 de rata (nucleótidos 220-655), y la sonda PLP se preparó a partir de la construcción pGPLP-1, que contenía un fragmento de 250 pb de la proteína PLP de ratón (nucleótidos 34-285). La hibridación se realizó como se había descrito previamente (Scarlsbrick *et al.*, *J. Neurosci.* 19: 7757-7769 (1999)) y en algunos casos las preparaciones hibridadas se procesaron adicionalmente para localizar K6-IR, GFAP-IR o Isolectina<sub>B4</sub>-IR, como se detalló con anterioridad.

50 *Proteína K6 recombinante:* La proteína K6 de rata recombinante (r-K6) se expresó en un sistema de baculovirus, como se ha descrito en detalle en otra publicación (Blaber *et al.*, *supra*). Brevemente, la forma zimógeno de r-K6 con una pro-secuencia sintética de 44 aminoácidos que incluía una secuencia de reconocimiento de la enteroquinasa (EK) y una cola de 6 histidinas, se expresó en un sistema de expresión de baculovirus, se purificó en una única etapa utilizando la fusión de la cola de His y una resina de afinidad de níquel y se mostró que tenía un 98% de pureza por SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie. La homogeneidad de la proteína K6 purificada se confirmó usando secuenciación N-terminal, espectrometría de masas y exclusión por tamaño en cromatografía líquida de alta resolución. Después de la activación por EK (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN), la proteína r-K6 madura se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión de tamaño en la resina G-50 superfina (Pharmacia Corp., Kalamazoo, MI), para eliminar el propéptido escindido y la enteroquinasa.

60 *Degradación de la proteína básica de mielina y MOG por la proteína K6:* La proteína básica de mielina (MBP) de rata se aisló de ratas adultas y se incubó con proteína r-K6 en 40 mM de fosfato, 150 mM NaCl (pH 7,4) a una relación de masas de 100:1. La concentración final de r-K6 en la reacción fue de 35,3 pM. La mezcla de reacción se incubó a 37°C y se tomaron puntos temporales a 0, 1, 4 y 16 horas después de la incubación con el monoclonal, se congelaron rápidamente en hielo seco y se mantuvieron a -80°C. El patrón de digestión de la MBP de rata se analizó cargando 10 pl de muestra (equivalente a 5 pg de MBP de rata) por carril en un gel del 16% de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras.

## ES 2 316 770 T3

La glicoproteína de mielina de oligodendrocitos de rata recombinante ( $\alpha$ -MOG) se incubó, como se describió anteriormente, con r-K6 en las mismas condiciones que la MBP de rata, excepto que la concentración final de  $\alpha$ -MOG fue de 31,5 pM. La muestra digerida se resolvió en un gel del 16,5% de Tricina SDS-PAGE para análisis de la misma forma.

5

*Sistemas de cultivo celular de oligodendrocitos:* Se usaron dos sistemas de cultivo de oligodendrocitos: progenitores de oligodendrocitos purificados y la línea celular oligodendrocítica bipotencial CG4. Se prepararon cultivos primarios mixtos de células gliales a partir del telencéfalo de ratas Sprague-Dawley PN-1, y los progenitores OL se obtuvieron a partir de estos por agitación durante toda la noche y adhesión diferencial, según se describe en detalle en McCarthy y De Vellis (J. Cell. Biol. 85: 890-902 (1980)). Los progenitores OL purificados se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-L-ornitina a una densidad de  $20 \times 10^3/\text{cm}^2$  y se crecieron en medio mínimo esencial de Dulbecco (DMEM) que contenía: 4,5 mg/ml de glucosa, 2 mM de glutamina, suplemento N2 (Gibco-BRL, Grand Island, NY), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina, 30 nM de T3, 10 ng/ml de biotina, 50 U/ml de penicilina/estreptomicina, 0,1 mg/ml de piruvato sódico (Sigma) y 10 ng/ml de PDGF-AA y bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN). Las células CG4 no diferenciadas se crecieron en DMEM F12 de Ham que contenía los mismos suplementos.

15

Para examinar los efectos del exceso de r-K6 exógena, se diferenciaron células progenitoras derivadas de telencéfalo o CG4 O2A hacia el linaje oligodendrocítico mediante el reemplazo de los factores mitogénicos, PDGF y FGF, con 0,05% de albúmina de suero bovino (BSA). El efecto de r-K6 sobre los oligodendrocitos diferenciados se examinó por exposición de las células diferenciadas durante 72 horas a 1 ó 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (40 ó 400 nM) de r-K6 durante 72 horas más, reemplazando el medio por medio nuevo con r-K6 cada 24 horas. Para evaluar el efecto de r-K6 sobre la diferenciación de oligodendrocitos, los progenitores se sembraron en una placa con medio de diferenciación como anteriormente, pero el medio se suplementó con 1 ó 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de r-K6 después de un periodo de cultivo de 30 minutos, para permitir la unión celular. Como anteriormente, se permitió que las células se diferenciaran durante 72 horas adicionales antes del análisis. Para distinguir entre los efectos de la superficie celular o del sustrato, en un tercer paradigma, las células CG4 O2A se trataron en una de tres formas: (i) las células se sembraron en una placa y el medio se sustituyó por medio de diferenciación que contenía 1 ó 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de r-K6, 30 minutos después de la siembra; (ii) las células se resuspendieron y se incubaron durante 30 minutos con 1 ó 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de r-K6, se centrifugaron y se resuspendieron en medio de diferenciación sin proteasas antes de la siembra; o (iii) antes de la siembra, los cubreobjetos recubiertos con poli-ornitina se incubaron durante 1 hora a 37°C con 1 ó 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de r-K6. Las células se diferenciaron durante 24 horas más antes del análisis. Los pocillos control se suplementaron con un volumen igual de vehículo (40 mM NaOAc, 100 mM de NaCl, pH 4,5) solo. Para visualizar el proceso de diferenciación de oligodendrocitos, los cubreobjetos se aclararon brevemente en disolución salina tamponada con HEPES (HBSS) y las células vivas se tiñeron en HBSS que contenía un 1% de BSA para detectar la presencia de sulfátidos de la superficie celular, usando el anticuerpo monoclonal y anticuerpos secundarios conjugados con fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch). Las células marcadas se fijaron en 2% de paraformaldehído y se cubrieron con 90% de glicerol (pH 8,0) que contenía 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de bisbenzamida (Sigma) para la tinción nuclear, y un cubreobjetos.

25

30

35

En cada uno de los paradigmas de cultivo celular, el proceso de crecimiento y el número celular se evaluaron a partir de seis campos (165 mm<sup>2</sup>) por cubreobjetos, de los que se formaron imágenes digitales (objetivo 40x) usando un microscopio Olympus AX70 provisto de una cámara digital de color SPOT. (Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI). El número de oligodendrocitos en diferenciación, inmunoreactivos con O4 que cruzaban las líneas horizontales de un entramado de 0,64 cm (0,25 pulgadas) superpuesto sobre cada imagen, se contó para cada campo. Adicionalmente, se realizaron también recuentos en cada campo del número total de células O4 positivas y de todas las células teñidas con bisbenzamida. Como promedio, se contaron 120 células por condición de cultivo en cada experimento. La media y el error estándar de recuentos de pocillos triplicados se calcularon y se analizaron mediante un análisis de varianza en un sentido en un ensayo *post hoc* de Student Newman Keuls (SNK). Todos los experimentos se realizaron en triplicado y se repitieron, al menos dos veces, usando preparaciones de cultivo celular independientes.

50

*Sobre expresión de K6 en células CG4:* Para preparar la construcción de K6 de rata -proteína verde fluorescente (GFP), el clon de ADN de longitud total de K6, sin un codón de terminación, se amplificó mediante una reacción en cadena de la polimerasa a partir del vector SB12-42B y se subclonó, en fase con el marco de lectura, con la proteína cycle 3 GFP de pcDNA3.1/CT-GFP-TOP0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para la transfección celular, los vectores que contenían la construcción K6-GFP, o GFP sola, se digirieron con *Bgl*III, se precipitaron con etanol y se resuspendieron en agua estéril. Células CG4 en proliferación, crecidas en placas de 60 mm recubiertas con poli-ornitina a una densidad de  $2 \times 10^5$  por pocillo de 35 mm, se transfectaron con 2  $\mu\text{g}$  de ADN, usando el reactivo FuGENE 6 (Roche Diagnostics). Las células transfectadas con éxito se identificaron por expresión de cycle 3 GFP, cuando se observaban con un objetivo 40X en un microscopio invertido Olympus IX70 provisto de un dispositivo de filtros de FITC. Se formaron imágenes digitalmente de las células positivas para GFP usando un microscopio de fluorescencia y uno de fase, 24, 48 y 96 horas después de la transfección, y el número de prolongaciones se evaluó contando aquellos que cruzaron un entramado de 0,64 cm (0,25 pulgadas) superpuesto. En cada punto temporal, se compararon el número de prolongaciones asociadas con las células transfectadas con K6-GFP o con GFP sola, mediante la prueba de la suma de rangos de Mann-Whitney.

65

*Expresión y cristalización de K6 y recogida de datos:* La proteína K6 humana activa madura (hK6) se expresó y se purificó a partir de un sistema de baculovirus/línea celular de insecto, esencialmente, como el descrito para la proteína K6 homóloga de rata. La proteína hK6 purificada se concentró a 20 mg/ml en 40 mM de acetato sódico, 100 mM

## ES 2 316 770 T3

NaCl y 20 mM benzamidina, pH 4,5. Las condiciones de cristalización se identificaron usando una pantalla de matriz esparcida de gota pendiente de las condiciones de precipitantes, sales y pH (Hampton Research, Laguna Niguel, CA). Los cristales con calidad de difracción crecieron a partir de 30% de PEG 4000 (p/v), 0,2 M de cloruro de magnesio hexahidrato y 0,1 M de Tris clorhídrico, pH 8,5, después de dos semanas de incubación a 4°C. Los datos de intensidad de rayos X se recogieron a 103 K a partir de un único cristal (0,5 x 0,2 x 0,05 mm) con un detector de área de placa de formación de imágenes R-Axis IIC de Rigaku, usando radiación Cu-K $\alpha$ . Los datos se procesaron y se clasificaron usando DENZO y SCALEPACK 27,28. Este cristal difractaba a, al menos, 1,75 Å. El grupo espaciador se identificó provisionalmente como ortorrómbico P212121 con constantes de celda a = 39,1 Å, b = 62,1 Å, c = 85,8 Å. En base a una masa molecular de aproximadamente 29 kDa para la proteína hK6, un coeficiente de Matthews  $V_m = 1,80 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  sugería una única molécula en la unidad asimétrica 29.

*Reemplazo molecular y refinamiento de la estructura:* Las fases iniciales se calcularon por reemplazo molecular usando tripsina de salmón atlántico (código PDB 1A0J) como un modelo de búsqueda y el paquete informático 3D de Crystallography & NMR System (CNS). La búsqueda rotacional resultó en un único pico  $8\sigma$  por encima del nivel de ruido, y una búsqueda traslacional posterior en el grupo de espacio P212121 del modelo rotado correctamente resultó en un único pico  $4\sigma$  por encima del nivel de ruido. El R<sub>crist</sub> fue 47,3% después del refinamiento de cuerpo rígido de esta disolución inicial. Se calculó un mapa compuesto ponderado SIGMAA de los datos de recocido omitidos 3 Å 2F<sub>obs</sub> - F<sub>calc</sub> (5% de los datos omitidos) y se construyó y se refinó la estructura a través de ciclos alternativos usando el programa gráfico O 31 y CNS. Todos los refinamientos se realizaron mediante recocido simulado usando una diana de máxima probabilidad, y este procedimiento cíclico se repitió varias veces con un incremento gradual de la resolución hasta 1,75 Å. Una selección al azar del 3% de los datos se asignó para el cálculo de R<sub>libre</sub> y no se incluyó en el refinamiento. Las moléculas de disolvente se añadieron en la última etapa del refinamiento en posiciones esteroquímicamente razonables.

*Generación de anticuerpos monoclonales específicos de la proteína hK6:* Los anticuerpos monoclonales que reconocen a K6 se generaron usando la proteína K6 recombinante humana expresada en el sistema de baculovirus. Se emulsionó hK6 activada por enteroquinasa, a relaciones iguales, con adyuvante completo de Freund (ACF) y disolución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS), hasta una concentración de 500  $\mu\text{g}$  por ml. Se inmunizaron ratones Balb/c (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) en dos sitios, de forma subcutánea, y en la base de la cola, con un total de 200  $\mu\text{l}$  de emulsión en ACF. Después de 30 días, se suministró a cada ratón una dosis de recuerdo de 50  $\mu\text{g}$  de hK6 disuelta en 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Seis días después de la dosis de recuerdo, los linfocitos esplénicos se fusionaron con células de mieloma. El protocolo usado para la generación de hibridomas de células B siguió procedimientos estándar (Faedas de St. Groth y Scheidegger, 1980). Brevemente, se extrajeron los bazo de los ratones y se prepararon suspensiones unicelulares, lisándose los eritrocitos de la sangre con tampón cloruro amónico. Los linfocitos esplénicos y las células de mieloma F/O (mieloma no secretor derivado de las células de mieloma sp2/0 Balb/C) se mezclaron a una relación de 5:1 y se centrifugaron para formar un precipitado. Las células precipitadas se resuspendieron en 1 ml de una disolución del 50% de polietilenglicol 1540 y, posteriormente, se incubaron a 37°C durante 90 segundos. Las células se lavaron y se resuspendieron en medio nuevo, y se añadieron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  a pocillos de placas de microensayo. Después de 24 horas, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo suplementado con 1M hipoxantina (HT), 4 mM de aminopterina y 0,16 M de timidina (HAT). A partir de este momento, se reemplazaron 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo cada 3-4 días con 100  $\mu\text{l}$  de medio nuevo que contenía HAT, HT y medio completo sin HAT, sucesivamente a lo largo de un periodo de aproximadamente 14 días. Cuando el cultivo alcanzaba el 75% de confluencia, los sobrenadantes de cultivo se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia de anticuerpos específicos de K6, usando placas Immunolon II recubiertas con hK6 recombinante, o placas recubiertas con la proteína kaliceína 3 humana (hK3) recombinante como control negativo, usando técnicas estándar. Posteriormente, los hibridomas específicos de K6 se clonaron en cultivos de dilución límite a 1 célula por pocillo de la placa. Se utilizaron células de bazo de ratones Balb/c como capa de células alimentadoras (feeder) en las placas de cultivo para la fusión y el clonaje ( $3 \times 10^5$  por pocillo). Las células fusionadas se crecieron en placas de 96 pocillos en medio Iscove's Modified Dulbecco's Medium, que contenía 10,0% de suero fetal bovino. Los sobrenadantes de estos clones se analizaron para detectar reactividad con K6 mediante ensayos de ELISA (como anteriormente), y los clones específicos de K6 se subclonaron a 0,3 células por pocillo de la placa. Los sobrenadantes de los subclones se analizaron mediante la técnica de ELISA para detectar reactividad con K6 y los subclones seleccionados se expandieron. Los hibridomas específicos de K6 se crecieron en botellas de "roller" en medio sin suero y la fracción IgG se purificó usando Proteína G (Pharmacia). Se determinó el isotipo IgG o IgM de los anticuerpos purificados usando un kit para determinar el isotipo de anticuerpos monoclonales de ratón (IsoStrip, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Dos monoclonales generados de esta forma, K6-1 y K6-2, son IgG-1 $\kappa$  específica y reconocen a las proteínas K6 recombinantes humana y de roedores. A menos que se especifique de otra forma, todos los reactivos se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO).

### Ejemplo 1

#### *K6 se expresa de forma abundante y diferenciada en el SNC humano adulto*

Se determinó el nivel de ARNm de K6 en el cerebro y en los tejidos periféricos humanos adultos. Se utilizaron ADNc de K6 humana marcados radiactivamente para hibridar un dot blot que contenía ARN humano de 43 regiones diferentes, que incluían el cerebro (filas A y B) y tejidos periféricos (filas C a F). Los niveles más altos de ARNm de K6 se presentaron en la médula espinal (B7) y en el bulbo raquídeo (A8) (véase Tabla 1). Contrastando con esto, el

## ES 2 316 770 T3

nivel de ARNm de K6 en muestras de la mayoría de los tejidos periféricos fue bajo, con la excepción de riñón (E1), en el que el nivel de ARNm de K6 detectado fue similar al detectado en la médula (B7). También había niveles bajos de ARN de K6 en el timo humano (E5), bazo (E4) y nódulos linfáticos (E7).

5

TABLA 1

*Cuantificación del ARNm de K6 presente en las regiones del cerebro y de los tejidos periféricos humanos*

10

15

20

25

30

35

40

45

Fuente de ARN	K6	Fuente de ARN	K6	Fuente de ARN	K6
A1 - Cerebro total	18*	C1 - Corazón	7	E1 - Riñón	87
A2 - Amígdala	15	C2 - Aorta	5	E2 - Hígado	23
A3 - Núcleo caudado	19	C3 - Músculo esquelético	9	E3 - Intestino delgado	15
A4 - Cerebelo		C4 - Colon	12	E4 - Bazo	9
A5 - Córtex cerebral	8	C5 - Vejiga	12	E5 - Timo	23
A6 - Lóbulo frontal	20	C6 - Útero	13	E6 - Leucocitos periféricos	14
A7 - Hipocampo	43	C7 - Próstata	13	E7 - Nódulos linfáticos	17
A8 - Bulbo raquídeo	57	C8 - Estómago	16	E8 - Médula espinal	15
B1 - Polo occipital	102	D1 - Testículos	13	F1 - Apéndice	9
B2 - Putamen	9	D2 - Ovario	9	F2 - Pulmón	20
B3 - Sustancia negra	21	D3 - Páncreas	9	F3 - Tráquea	9
B4 - Lóbulo temporal	33	D4 - Glándula pituitaria	16	F4 - Placenta	9
B5 - Tálamo	13	D5 - Glándula adrenal	16		
B6 - Núcleo sub- talámico	29 34	D6 - Glándula tiroides	19		
B7- Médula espinal	100	D7 - Glándula salivar	14		
		D8 - Glándula mamaria	17		

\* La densidad óptica relativa producida por hibridación de una sonda de ADNc de K6 humana con cada muestra de ARN se expresó como porcentaje de la señal producida en la médula espinal.

### Ejemplo 2

50

*K6 se expresa fuertemente en oligodendrocitos*

55

Los oligodendrocitos en todas las regiones del cerebro humano se examinaron por inmunohistoquímica, como se describe en las secciones de Materiales y Procedimientos, y se encontró que había una reacción inmune con K6 densa. Los oligodendrocitos inmunoreactivos incluían aquellos del cuerpo caloso, el nervio óptico y la materia blanca sub-cortical. La localización de K6 en los oligodendrocitos, pero no en los astrocitos, en la materia blanca del cerebro adulto, sugiere que esta enzima juega un papel en los mecanismos homeostáticos de los oligodendrocitos normales.

60

### Ejemplo 3

*La expresión de K6 por oligodendrocitos se regula positivamente por lesiones*

65

Los niveles de ARNm de K6 en la médula espinal de rata adulta aumentaron, tanto en la materia blanca como en la gris, después de la lesión excitotóxica inducida por ácido kaínico (KA). Las microfotografías en campo oscuro (Figura 1) muestran la localización autorradiográfica del ARNm de K6 en una sección transversal de la médula espinal de una rata control, y en paralelo secciones de ratas experimentales pareadas, 3 y 7 días después de la inyección

## ES 2 316 770 T3

intraperitoneal de KA. Tres días después del tratamiento con KA, el ARNm fue dos veces más alto en la materia blanca y 1,5 veces más alto en el cuerno dorsal (DH) y en cuerno ventral (VH) de la materia gris de la médula espinal, en comparación con los controles ( $P < 0,05$ ). Una hemi-sección de la materia blanca de la médula espinal de una rata adulta revela un incremento de 5 veces en la expresión del ARNm de K6 por los oligodendrocitos, 72 horas después de la lesión, en comparación con los controles. Estos descubrimientos apoyan la hipótesis de que K6 está implicada en la respuesta de los oligodendrocitos a las lesiones y sugiere que K6 podría participar en el metabolismo de la mielina.

### 10 Ejemplo 4

*La cantidad de K6 es elevada en los sitios de neuroinflamación y desmielinización*

15 La inmunorreactividad con K6 fue densa en oligodendrocitos en áreas de materia blanca y gris normales de la médula espinal de animales control (Figura 2A) y en asociación con células inflamatorias en sitios de desmielinización activa, 180 días después de la infección con TMEV (Figura 2B).

20 Una sección de médula espinal de un mono del nuevo mundo con EAE inducida por  $\alpha$ MOG mostró focos de células inflamatorias, vistos como áreas de hiper-celularidad en secciones de recuento teñidas con hematoxilina/eosina. En una sección adyacente, la inmunorreactividad con K6 se asoció con oligodendrocitos en áreas de materia blanca normal y con células inflamatorias en los sitios de desmielinización activa.

25 Las secciones de cerebro humano de autopsias de individuos con EM confirmada de forma clínica y patológica se tiñeron con LAF/PAS. Estos estudios revelaron un lesión de EM activa crónica bien demarcada (Figura 3A; mostrada con una amplificación mayor en la Figura 3B). La placa (PL) mostró una pérdida completa de mielina en comparación con la peri-placa de materia blanca (PPWM). El análisis inmunohistoquímico demostró que K6 se reguló positivamente en las células inflamatorias en la frontera entre la PL y la PPWM, sobre el lateral de la lesión (Figura 3C; mostrado con una amplificación mayor en la Figura 3D). Los niveles más altos de inmunorreactividad con K6 se asociaron con células inflamatorias en la frontera PL/PPWM. La inmunorreactividad con K6 también se reguló positivamente con astrocitos reactivos.

### 30 Ejemplo 5

35 *K6 se expresa en macrófagos, además de en células inflamatorias CD4 y CD8, en los sitios de desmielinización de la médula espinal de ratones infectados con TMEV*

40 El primer evento conocido en la patogénesis de las lesiones de EM es la migración transendotelial de linfocitos al interior del SNC. Como se discutió anteriormente, la inmunorreactividad con K6 en EAE inducida tanto por TMEV como por  $\alpha$ MOG, así como en lesiones de EM humana activa, es densa en células inflamatorias en los sitios de desmielinización. Por lo tanto, se examinó el papel potencial de K6 en la enfermedad de desmielinización.

45 La proteína K6 se localizó por inmunofluorescencia en los sitios de desmielinización en la materia blanca de la médula espinal de ratón, 90 días después de la infección con TMEV. Las secciones de materia blanca se tiñeron también con marcadores para células inflamatorias, que incluían F480, CD4 y CD8. Esta técnica de marcaje doble demostró que había altos niveles de inmunorreactividad con K6 asociados con macrófagos, así como con células T CD4 y CD8. La inmunorreactividad con K6 no se reguló positivamente en oligodendrocitos en áreas de desmielinización, al menos, respecto a los altos niveles observados en células inflamatorias.

### 50 Ejemplo 6

55 *El nivel de K6 es elevado en suero de ratones infectados con TMEV*

Se usó un ensayo de inmunocaptura (ELISA) de captura cuantitativo para determinar la cantidad de K6 en suero de ratones no infectados (control) o en ratones infectados, 90 y 180 días después de la infección con TMEV (Figura 4). Hubo un incremento de aproximadamente 3,5 veces en la cantidad de K6 en suero, 180 días después de la infección, en comparación con suero control.

### 60 Ejemplo 7

65 *La proteína K6 recombinante degrada componentes de la barrera hemato-encefálica*

Para determinar si K6 podría participar en la migración de células inflamatorias al interior del SNC por degradación de la lámina basal BBB, se llevaron a cabo estudios enzimáticos de K6 con colágeno, fibronectina y laminina. K6 degradó rápidamente los tres componentes de BBB. El colágeno de tipo I se degradó 5 minutos después de la adición

## ES 2 316 770 T3

de K6 (Figura 5A, línea 3, en comparación con línea 2). La fibronectina se degradó parcialmente 1 hora después de la adición de K6 y se degradó completamente a las 24 horas (Figura 5B, líneas 3 y 4, en comparación con la línea 2). La laminina se degradó parcialmente una hora después de la adición de K6 y se degradó completamente a las 16 horas (Figura 5C, líneas 2 y 3, en comparación con la línea 1). Por lo tanto, K6 podría jugar un papel en la migración de las células inflamatorias hacia el interior del SNC.

### Ejemplo 8

10 *La proteína K6 recombinante puede degradar proteínas específicas de mielina*

La proteína K6 es una serin proteasa del tipo de la tripsina que hidroliza específicamente proteínas después de residuos de arginina. Dada su amplia especificidad de sustrato, es probable que niveles incrementados de K6 en los sitios de inflamación del SNC tengan funciones generales de degradación, que incluyen la rotura de las proteínas específicas de mielina. Esta hipótesis se analizó *in vitro* examinando la capacidad de K6 para degradar MBP y el fragmento de los 125 aminoácidos amino terminales del  $\alpha$ MOG. MBP se degradó parcialmente 10 minutos después de la adición de K6, y se mostraron niveles de degradación mucho mayores a 30 minutos y 60 minutos (Figura 6A, líneas 7-9).  $\alpha$ MOG se degradó parcialmente 1 hora después de la adición de K6, y se degradó completamente en 4 horas (Figura 6B, líneas 3 y 4).

### Ejemplo 9

25 *K6 es capaz de aumentar la migración de las células inflamatorias a través de la barrera hemato-encefálica ECM*

Se determinó la migración de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC). Membranas de tamaño de poro de 8  $\mu$ m recubiertas con matrigel se trataron previamente con 10  $\mu$ g/ml de proteína K6 recombinante (r-K6) durante 24 horas, antes de la adición de las células, usando suero de ternera fetal (STF) como quimiotáctico. Un periodo de incubación de 8 horas en presencia de un gradiente de STF reveló que el tratamiento previo de una membrana de Matrigel con r-K6 aumentaba significativamente la migración de PBMC (Figura 7;  $P < 0,05$ ).

### Ejemplo 10

35 *K6 es importante en el desarrollo de oligodendrocitos normales*

Se usaron dos sistemas de cultivo de oligodendrocitos, oligodendrocitos primarios "agitados" (McCarthy and De Vellis, *supra*) y la línea celular oligodendrocítica CG4 (Louis *et al.*, *Glia* 6: 30-38 (1992)), además de ensayos de inmunohistoquímica, inmunoblot y ELISA sensibles, para mostrar que la proteína K6 se expresaba en progenitores de oligodendrocitos (O2A) durante la maduración *in vitro*. Aunque es abundante en todas las etapas del linaje, la distribución de proteína K6 se alteraba con la maduración, haciéndose más abundante en asociación con las prolongaciones distales. Este patrón dinámico de expresión apunta hacia funciones de K6 en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo mielinizante maduro.

Mediante el uso de inmunohistoquímica se mostró que K6 y los marcadores de linaje de oligodendrocitos co-localizaban en cultivos purificados de progenitores de oligodendrocitos aislados a partir de cerebro de rata postnatal, y en la línea celular CG4 en las etapas de diferenciación O4 (sulfatido, pro-oligodendrocito) y O1 (galactocerebro-sido, inmaduro/maduro). Tanto los progenitores de oligodendrocitos A2B5<sup>+</sup> (gangliosido) como los pre-progenitores A2B5<sup>-</sup> fueron inmunorreactivos con K6. Se debe apreciar que la microglia también se asociaba con altos niveles de inmunorreactividad con K6. En células CG4 en las etapas de maduración O4 y O1, la inmunorreactividad con K6 fue más abundante en las prolongaciones distales.

La expresión de K6 regulada durante el desarrollo en oligodendrocitos cultivados, se confirmó por inmunoblotting (Figura 8). Los niveles más altos de proteína K6 (25 kDa) se observaron en oligodendrocitos en proliferación (Pro) con una disminución progresiva a medida que la célula maduraba *in vitro* (48 horas, 72 horas y 7 días). Los astrocitos cultivados producían también K6, aunque a un nivel inferior que los oligodendrocitos, pero mostraron una pérdida progresiva de expresión similar a medida que las células maduraban. También se observó una segunda banda que tenía reacción cruzada con el antisuero anti-K6, con un peso molecular de aproximadamente 42 kDa. Esta banda podría representar proteína K6 unida covalentemente a un regulador endógeno (por ejemplo, un inhibidor).

El posible inhibidor endógeno de K6 parecía ser exclusivo de los tejidos del SNC. El análisis por Western blot de los tejidos homogeneizados de rata con anticuerpos policlonales de conejo frente a r-K6 reveló la presencia tanto de proteína K6 madura como de complejos de peso molecular mayor (Figura 9). Los complejos de peso molecular mayor, con masas de aproximadamente 42 y 91 kDa, podrían representar la formación de complejos K6/inhibidor. El complejo mayor de 91 kDa se observó principalmente en el riñón (línea 4) mientras que el complejo de 42 kDa

## ES 2 316 770 T3

se encontró predominantemente en el cerebro y en la médula espinal (línea 2 y 3, respectivamente). Se identificó también un complejo de 42 kDa en poblaciones purificadas de células del sistema nervioso (Figura 8). Estos datos apoyan la presencia de inhibidores de K6 endógenos exclusivos del sistema nervioso, en comparación con tejidos no nerviosos.

5

### Ejemplo 11

#### *El exceso de K6 da como resultado una degeneración de las prolongaciones de oligodendrocitos*

10

Aunque la expresión regulada de K6 parece ser importante para el desarrollo normal de oligodendrocitos, se plantea la hipótesis de que un exceso de K6, como el que ocurre en los sitios de inflamación de SNC, podría contribuir a una oligodendroglíopatía. Para determinar el efecto potencial de K6 en la estabilidad de las prolongaciones de oligodendrocitos, se sembraron en una placa progenitores de oligodendrocitos y se permitió su diferenciación durante 72 horas. En este momento, las células contenían una mezcla de células O4<sup>+</sup> y O1<sup>+</sup>. Se añadió r-K6 activo a pocillos triplicados a una concentración de 1 ó 10 µg/ml y las células se incubaron durante 72 horas más, antes de la tinción específica de sulfatido con el anticuerpo monoclonal anti-O4. La exposición de los oligodendrocitos maduros a r-K6 dio como resultado una disminución de 2 a 3 veces en el número de prolongaciones O4<sup>+</sup> (Figura 16A), pero no tenía efecto en el número de células O4<sup>+</sup> (Figura 16B) o en el número total de células (Figura 16C). Así, el exceso de proteína K6 tenía un efecto dramático en la estabilidad de las prolongaciones de oligodendrocitos, pero no afectaba a la supervivencia celular o a la diferenciación hacia el linaje O4<sup>+</sup> (P<0,05).

La sobre-expresión de K6 en progenitores de oligodendrocitos disminuyó también el proceso de crecimiento. El clon de ADN K6 de longitud completa se insertó en un vector que codificaba la proteína verde fluorescente (GFP) para dar lugar a la producción de la proteína de fusión K6-GFP. Los progenitores de oligodendrocitos CG4 se transfectoron, bien con la construcción K6-GFP, o bien con el vector que codifica GFP sola, y se determinó el número de prolongaciones en células que expresan GFP, 12, 48 ó 96 horas después de la transfección. Aunque ninguna de las construcciones afectaba a la supervivencia de los oligodendrocitos, las células que sobre-expresaban K6 tenían significativamente menos prolongaciones desde el punto temporal de 48 horas en adelante, respecto del control de GFP (P <0,05). Por lo tanto, la sobre-expresión de K6 en la célula tenía el mismo efecto que la aplicación de K6 de forma exógena.

### Ejemplo 12

#### *La inhibición de K6 atenúa la enfermedad de desmielinización del SNC*

*Immunización con K6 e infección por TMEV:* Hembras de ratones SJL/J de 8 semanas de edad (Jackson Laboratories) se inmunizaron con 100 µg de proteína K6 recombinante (r-K6) en 200 µl de adyuvante completo de Freund (CFA, Difco) que contenía 200 µg de micobacterias matadas por calor. La proteína K6 se expresó en un sistema de baculovirus, se purificó y se activó como se describe en la sección de Materiales y Procedimientos. Los animales control se inmunizaron de forma similar, recibiendo el antígeno no propio ovoalbumina (OVA, Sigma), ACF solo, o PBS solo. La emulsión se inyectó subcutáneamente en cada flanco y en la base de la cola.

Se determinaron los títulos de anticuerpos específicos de K6 y OVA mediante ELISA y los animales recibieron una dosis de recuerdo por inyección intraperitoneal (o subcutánea) de 25 µg de r-K6, o de OVA en PBS, o con PBS solo. Una semana después de la dosis de recuerdo, los animales se inyectaron intracerebralmente con 2 x 10<sup>6</sup> unidades formadoras de placas (PFU) de la cepa Daniel de TMEV, en un volumen de 10 µl. Cuarenta días después de la infección con TMEV, se evaluaron histológicamente secciones a través de la médula espinal de cada animal, y se determinaron los títulos de anticuerpos específicos de K6 y OVA en el suero. Los ratones se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (150 mg/kg) y tras recoger el suero, se perfundieron de forma transcardiaca con 4% de formaldehído, con 1% de glutaraldehído en PBS (pH 7,4), o con 4% de paraformaldehído. Las médulas espinales se seccionaron transversalmente en bloques de 1 mm, y un bloque de cada 3 se embebió en metacrilato de glicol. Para determinar la desmielinización, se cortaron secciones de 1 µm de espesor a partir de los bloques embebidos en plástico y se tiñeron con una tinción de eriocromo modificada, con contrateñido de violeta de cresilo. Esta metodología permite, de forma reproducible, la visualización de las células inflamatorias y de la extensión de la desmielinización en la médula espinal.

*DTH por TMEV:* Las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado específicas de TMEV (DTH, una medida de las respuestas inmunes de tipo Th1) se determinaron 48 horas antes del final del cada experimento. TMEV purificado irradiado con luz UV (2,5 µg) o el péptido PLP 139-151 (10 µg) en un volumen de 10 µl se inyectaron intradérmicamente en orejas opuestas, usando una jeringa Hamilton de 500 µl (Hamilton Co., Reno, Nevada) provista con una aguja de calibre 30. La hinchazón de la oreja se midió 24 y 48 horas después de la inyección, con un micrómetro de disco calibrado. Se comparó la diferencia media respecto de las medidas anteriores a la inyección en cada grupo, entre los ratones inmunizados con K6 y los grupos control.

*Histología cuantitativa:* El análisis morfológico cuantitativo se realizó en 10-15 secciones, que correspondían a 10-15 segmentos de médula espinal diferentes, por ratón. Se usaron dos procedimientos para determinar la extensión de la patología de la materia blanca. Primero, el área de materia blanca total y el área de lesión total (en mm<sup>2</sup>) se calcularon usando un sistema de análisis digital interactivo Zeiss (ZIDAS), y una cámara lúcida unida a un fotomicroscopio Zeiss. Los datos se expresaron como el porcentaje del área de lesión total por área de materia blanca total. Segundo, se asignó a cada animal una puntuación patológica que reflejaba la frecuencia de la patología en base a la inflamación meníngea y a la desmielinización. El resultado se expresa como un porcentaje del número total de cuadrantes de médula espinal positivos para cada medida patológica, dividido por el número total de cuadrantes de médula espinal examinados. Una puntuación máxima de 100 refleja la presencia de patología en los 4 cuadrantes de cada segmento de médula espinal examinado a partir de una médula espinal individual. La significación de las diferencias en el porcentaje de los cuadrantes con cada característica patológica, o en el porcentaje del área de lesión, se determinó mediante un análisis de varianza en un sentido (ANOVA) y el ensayo *post hoc* de Student-Newman-Kuel (SNK).

La estrategia de inmunización reveló que tanto la inflamación como la desmielinización decrecían en el modelo de TMEV de EM. Se observaron títulos de anticuerpos específicos de K6 elevados en los sueros de ratones, 4 semanas después de la inmunización con r-K6 (Figura 11). Los sueros de los animales inmunizados con ACF solo no tenían títulos significativos de anticuerpos específicos de K6. Se observaron resultados similares en todos los ratones inmunizados. El suero fue sustituido por albúmina de suero bovino (BSA) como control negativo en este ensayo.

El porcentaje de cuadrantes de médula espinal que mostraron desmielinización (DM) o inflamación (Infl) se cuantificó en los animales inmunizados (I) con K6 o con ACF solo. La inmunización de ratones con r-K6 (n=9) 5 semanas antes de la infección con TMEV resultó en significativamente menos DM e Infl en la médula espinal, cuando se examinaron 40 días después de la infección, en comparación con los ratones inmunizados con ACF solo (n=10) (P<0,05, Figura 12). La inmunización con K6 se asoció con una reducción superior a 3 veces en el porcentaje de materia blanca de la médula espinal asociada con la patología (ANOVA, P<0,0023, \*SNK, P<0,05). Estos resultados se confirmaron en dos experimentos independientes.

En ratones inmunizados con ACF, en respuesta a la infección por TMEV se produjeron lesiones desmielinizadas bien formadas con infiltrados celulares perivasculares y parenquimales extensivos, pero estas lesiones fueron significativamente menos prominentes en ratones inmunizados con K6. La cantidad de desmielinización e inflamación se determinó en 10 a 15 secciones por ratón, determinando el número de cuadrantes de médula espinal que contenía cada característica patológica. Las médulas espinales se embebieron en plástico de metacrilato de glicol y se tiñeron con una tinción de eriocromo modificada/violeta de cresilo.

Los niveles de patología en el cerebro se cuantificaron para animales control inmunizados con ACF solo (Figura 14A) y para animales inmunizados con K6 (Figura 14B). Una puntuación de 0 refleja la ausencia de patología; un 1, ausencia de destrucción de tejido e inflamación mínima; un 2, destrucción temprana del tejido (pérdida de su arquitectura) e inflamación moderada; un 3, destrucción tisular definida (desmielinización, lesión parenquimal); y 4, una clara necrosis parenquimal. Los ratones inmunizados con K6 tenían significativamente menos enfermedad en todas las regiones del cerebro examinadas, que incluían el cerebelo, tallo cerebral, cuerpo estriado, córtex, hipocampo, cuerpo calloso y meninges).

Los títulos elevados de anticuerpos específicos de K6 atenuaron la respuesta Th-1 inducida por el virus *in vivo*. Se evaluaron las respuestas de DTH frente a la enfermedad inducida por TMEV en ratones, en el día 38 después de la infección (n=8 por grupo). Los datos mostrados en la Figura 15 representan la media de cambio a 48 horas en el grosor de la oreja  $\pm$  SEM, en respuesta a la estimulación con 2,5  $\mu$ g de TMEV purificado irradiado con UV. Las respuestas de DTH se redujeron significativamente en ratones inmunizados con K6 en el punto temporal de 48 horas (\*P<0,05, ensayo de la t de Student desapareado) en comparación con ratones inmunizados con PBS que contenía ACF solo. No se observaron respuestas de DTH significativas en respuesta a TMEV en ratones que no se infectaron. No se observaron respuestas DTH significativas en estos ratones en respuesta al péptido propio PLP-139-151, 38 días después de la infección con TMEV.

### Ejemplo 13

*La presencia de títulos de anticuerpos específicos de K6 altos, generados usando una aproximación de inmunización activa, disminuyeron tanto la desmielinización como la inflamación de la médula espinal, así como las respuestas inmunes Th1 *in vivo* e *in vitro*, en el modelo autoinmune de esclerosis múltiple*

*Generación de títulos de anticuerpos específicos de K6 e inducción de EAE:* Se generaron anticuerpos anti-K6 que bloqueaban la función por inmunización activa de ratones con proteína K6 recombinante (K6), lo que daba como resultado la generación de anticuerpos específicos de K6 de una forma autónoma propia. Los ratones se inmunizaron para la generación de anticuerpos anti-K6, bien en el momento de la inducción de EAE, usando adyuvante completo de Freund, o bien antes de la inducción de EAE, usando un adyuvante Ribi (Corixa) para evitar la administración repetida de ACF.

## ES 2 316 770 T3

La EAE se indujo en hembras de ratones SJL (H-2<sup>s</sup>) de 12 semanas de edad (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA) por inmunización con 100  $\mu\text{g}$  del péptido altamente encefalitogénico PLP 139-151 (HSLGKWLGHDPKF) disuelto en PBS y emulsionado con adyuvante incompleto de Freund (AIF), que contenía 400  $\mu\text{g}$  de *Mycobacterium Tuberculosis*, cepa H37Ra (Difco, Detroit, MI). En estas primeras series de experimentos, los ratones se inmunizaron con K6 en el momento de la inducción de EAE, por la adición de 75  $\mu\text{g}$  por ratón de K6 en PBS, o PBS solo, en el momento de la emulsión. Se inyectaron subcutáneamente (s.c.) grupos de 14 ratones con 0,2 ml de las emulsiones de péptido, y el mismo día y 48 horas después, se inyectó intraperitonealmente (i.p.) con 400 ng de toxina de *Bordetella Pertussis* en 0,1 ml de PBS. Este protocolo de estimulación previa con una dosis alta de PLP 139-151 produjo una enfermedad grave con mortalidad sustancial antes del punto de valoración de 21 días, impidiendo un análisis significativo de la patología. Por tanto, en una segunda serie de experimentos, en los que se examinaron los efectos de la inmunización previa con MSP, se eligió una forma más leve de EAE, en la que se inducía una enfermedad clínica consistente, pero en la que se reducía la mortalidad. Se establecieron títulos altos de anticuerpos anti-K6 en estos ratones, antes de la inducción de EAE, por inmunización de ratones con 70  $\mu\text{g}$  de K6 en 100  $\mu\text{l}$  de PBS mezclado con 100  $\mu\text{l}$  de adyuvante Ribi, resuspendido en PBS, o Ribi-PBS solo. Como un segundo control negativo, otros grupos de ratones no recibieron inmunización antes de la inducción de EAE. Se inyectaron s.c. 200  $\mu\text{l}$  de la suspensión Ribi-K6 o de Ribi solo, en dos sitios de los flancos de los ratones, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sueros, obtenidos por sangrado de la cola, se examinaron por ELISA para confirmar la producción de anticuerpos anti-K6 antes de la inducción de EAE. La estimulación previa con una dosis menor de PLP 139-151 se indujo en estos ratones por administración de 50  $\mu\text{g}$  de PLP 139-151 en AIF que contenía 200  $\mu\text{g}$  de *M. Tuberculosis*, suplementado con 20  $\mu\text{g}$  de K6. Los ratones recibieron 100 ng de toxina de *B. Pertussis* en el día de la inmunización y 48 horas después. Todos los péptidos se sintetizaron en el servicio central de proteínas de la clínica Mayo, verificándose la composición de aminoácidos por espectrometría de masas y confirmando una pureza (>98%) por espectroscopia de masas.

*Determinación de la enfermedad clínica:* Los ratones se alojaron en condiciones aisladas y se proporcionó un fácil acceso a la comida y al agua a los ratones paralizados. El criterio principal de valoración en estos experimentos fue el resultado clínico y los animales se observaron diariamente y se calificaron, de una forma ciega, según la gravedad clínica como sigue: grado 0, ausencia de enfermedad clínica; grado 1, pérdida del tono de la cola; grado 1,5, alteraciones de reflejos apropiados; grado 2, paresia o parálisis de una extremidad posterior; grado 3, parálisis completa de ambas extremidades inferiores; grado 4, no ambulatorio y moribundo; grado 5, muerte. Los sueros se recogieron en el momento del sacrificio para examinar los títulos de anticuerpos anti-K6 y anti-PLP.

*Análisis estadístico:* Cuando los datos no eran lineales, como en el caso de las puntuaciones de comportamiento, la significación de las diferencias entre ratones inmunizados con K6 y controles, se determinó por un ensayo de U de Mann-Whitney. Los ensayos de la t de Student desapareados paramétricos se usaron para la evaluación de diferencias en las puntuaciones histológicas, DTH, proliferación de células T, producción de citocinas y respuestas de anticuerpos en suero, excepto cuando los datos no se distribuían de forma normal, en cuyo caso se usaba un ensayo de U de Mann-Whitney. La comparación del porcentaje de supervivencia entre los grupos se realizó usando una  $X^2$  utilizando un ensayo exacto de Fisher. La significación estadística se estableció a  $P \leq 0,05$ .

*Resultados:* La inmunización con K6 en el momento de, o antes de la estimulación con PLP 139-151, inhibe el desarrollo de signos clínicos de EAE. El papel de K6 en el desarrollo de manifestaciones clínicas e histológicas de EAE se investigó por inhibición de la actividad enzimática de K6, usando una aproximación activa de inmunización. La presencia de anticuerpos anti-K6 generados antes de, o en el momento de la inducción de EAE, retrasaba en ambos casos el inicio de la enfermedad, y reducía las puntuaciones clínicas de la enfermedad, en el modelo de EAE inducida por PLP 139-151 en ratones SJL/J (Figuras 16 a 19 y Tablas 2 y 3).

Se mostró que la inmunización con K6 en el momento de la estimulación con PLP 139-151 retrasaba el día medio del inicio de la enfermedad (día  $12,7 \pm 0,1$  frente al control  $10,1 \pm 0,4$ ,  $P=0,006$ ), además del punto medio en el que la enfermedad alcanza su máximo (día  $14,7 \pm 0,5$  frente al control  $13,1 \pm 0,54$ ,  $P<0,04$ ) (Figura 16A, Tabla 2).

TABLA 2

Enfermedad clínica en PLP-EAE en ratones co-inmunizados con K6					
	Incidencia	Supervivencia	Día de inicio	MCS	Día del máximo de la enfermedad
Control EAE (n = 28)	28/28	11/28	10,1 ± 0,4	2,9 ± 0,2	13,1 ± 0,5
EAE con co-inmunización con K6 (n = 28) (n-28)	28/28	22/28	12,7 ± 0,5	1,8 ± 0,2	14,7 ± 0,5
		P = 0,003 <sup>a</sup>	P = 0,006 <sup>b</sup>	P < 0,002 <sup>c</sup>	P = 0,036 <sup>b</sup>

**Puntuaciones clínicas en ratones inmunizados con K6 en el momento de la estimulación de EAE con PLP 139-151.** Mientras que la incidencia de la enfermedad no difería entre los dos grupos, se mostró que la inmunización con K6 en el momento de la estimulación con PLP 139-151 retrasaba el día medio de inicio de la enfermedad, además del día en el que la enfermedad alcanzaba su máximo. La puntuación clínica diaria media (MCS) se redujo también significativamente en ratones inmunizados con K6 en comparación con el grupo control. Adicionalmente, la inmunización con K6 se asoció con una supervivencia significativamente mejorada en el punto temporal del día 21, en comparación con los ratones control (<sup>a</sup>  $\chi^2$ ; <sup>b</sup> ensayo de la t de Student desapareado; <sup>c</sup> ensayo de la U de Mann-Whitney).

La puntuación clínica diaria media después del inicio de los síntomas también se redujo significativamente en ratones inmunizados con K6 ( $1,8 \pm 0,3$ ) en comparación con el grupo control ( $2,8 \pm 0,4$ ,  $P < 0,01$ ), así como la media de la enfermedad clínica máxima observada ( $3,3 \pm 0,2$  frente al control  $4,3 \pm 0,2$ ,  $P = 0,003$ ). A lo largo del periodo de 21 días examinado, los ratones inmunizados con K6 presentaron también significativamente más días sin síntomas ( $11,7 \pm 0,45$  frente al control  $9,1 \pm 0,38$ ,  $P \leq 0,001$ ). Los ratones SJL con EAE inducida por dosis altas PLP 139-151 usados en estos experimentos iniciales, experimentaron una grave enfermedad clínica, con mortalidad significativa. Notablemente, a este respecto, la inmunización con K6 se asoció con una supervivencia significativamente mejorada en el punto de valoración de 21 días (22/28, 78,6%), en comparación con (10/28, 35,7%) en el grupo control ( $P = 0,003$ , análisis  $\chi^2$ ) (Figura 16B. Tabla 2). Los resultados de dos experimentos independientes fueron similares y los datos se combinaron para el análisis estadístico (n=28 por grupo). Dada la alta incidencia de mortalidad en los experimentos de PLP con alta dosis, el examen histológico de los tejidos de SNC no se realizó en detalle.

La inmunización previa con K6, anterior en el tiempo a la estimulación con PLP 139-151, atenuaba de forma similar el tiempo medio del inicio de la enfermedad y la gravedad de la enfermedad clínica alcanzada (Figura 17, Tabla 3). La inmunización previa con K6 retrasaba el inicio medio de la enfermedad clínica en aproximadamente 4 días respecto de los ratones control (día  $14,3 \pm 0,8$ , n=13 frente a la inmunización con PBS  $10,5 \pm 0,1$ , n=15, frente a sin inmunización previa  $10,8 \pm 0,2$ ,  $P < 0,001$ , n=14), así como el tiempo medio para alcanzar el pico (día  $16,9 \pm 0,6$  frente a inmunización con PBS  $14,7 \pm 0,7$  frente a sin inmunización previa  $13,7 \pm 0,6$ ,  $P < 0,02$ ). La inmunización previa con K6 se asoció también con una reducción significativa en la puntuación clínica diaria media después del inicio de los síntomas ( $1,4 \pm 0,3$  frente a inmunización con PBS  $2,1 \pm 0,2$  frente a sin inmunización  $2,1 \pm 0,2$ ,  $P < 0,001$ ). Como fue el caso para la inmunización con K6 en el momento de la inducción con EAE, los ratones inmunizados previamente con K6 presentaron significativamente más días sin enfermedad a lo largo del periodo examinado ( $13 \pm 0,8$  frente a inmunización con PBS  $9,5 \pm 0,2$  frente a sin inmunización previa  $9,6 \pm 0,1$ ,  $P < 0,001$ ). No se observaron diferencias significativas en el tiempo o en la gravedad de la enfermedad

clínica entre los ratones no inmunizados y los inmunizados con PBS. La incidencia de la enfermedad y la supervivencia en la dosis inferior de PLP-EAE no difería significativamente entre los grupos examinados. Notablemente, a pesar de la dosis inferior de PLP utilizada en el experimento de inmunización previa y del establecimiento de títulos altos de anticuerpos anti-K6 antes de la estimulación, la capacidad global de los dos paradigmas de tratamiento para retrasar el inicio de la enfermedad y para atenuar su gravedad, era similar. En conjunto, estos resultados indican que la inmunización con K6 es efectiva para retrasar y atenuar los signos clínicos de EAE inducida por PLP 139-151 y sugieren que otros procedimientos de inhibición de la actividad K6 atenuarían de forma similar la enfermedad.

TABLA 3

<b>Enfermedad clínica en PLP-EAE en ratones pre-inmunizados con K6</b>					
	Incidencia	Supervivencia	Día de inicio	MCS	Día del máximo de la enfermedad
Control EAE (n = 14)	14/14	12/14	10,8 ± 0,2	2,1 ± 0,2	13,7 ± 0,2
EAE con inmunización previa con Ribí-PBS (n = 15)	15/15	13/15	10,5 ± 0,1	2,1 ± 0,2	14,7 ± 0,2
EAE con inmunización previa con Ribí-K6 (n = 15)	12/13	11/13	14,3 ± 0,8	1,2 ± 0,2	16,9 ± 0,2
			P < 0,001 <sup>a</sup>	P < 0,005 <sup>a</sup>	P < 0,001 <sup>a</sup>
<b>Puntuaciones clínicas en ratones inmunizados previamente con K6 antes de la estimulación de EAE con PLP 139-151.</b> La inmunización previa con K6 anterior a la estimulación con PLP 139-151 reducía la puntuación clínica media y el día del inicio de la enfermedad respecto a ratones control que no recibieron inmunización anterior o inmunización previa con PBS solo ( <sup>a</sup> *ensayo de U de Mann-Whitney, P < 0,05).					

## Ejemplo 14

La inmunización con K6 reduce la enfermedad clínica e histológica, además de las respuestas inmunes Th1 en EAE aguda inducida por PLP 139-151

Para entender adicionalmente los mecanismos por los que los anticuerpos anti-K6 mejoran la enfermedad inducida por PLP 139-151, se examinaron los efectos de la inmunización con K6 en la función de las células T usando aproximaciones *in vivo* e *in vitro*, durante la fase aguda de la enfermedad. Se usaron las siguientes aproximaciones.

**Proliferación de células T:** Los bazo se eliminaron 12 días después de la estimulación de EAE y se llevaron a cabo ensayos de proliferación en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon Labware, Oxnard, CA) en un volumen total de 200  $\mu$ l de medio de Click, usando  $5 \times 10^5$  células de bazo. La proliferación específica de antígeno se analizó en triplicado determinando la incorporación de <sup>3</sup>H]TdR (1  $\mu$ Ci/pocillo) durante las 18 horas finales de un periodo de cultivo de 96 horas, usando diluciones del péptido PLP 139-151 comenzando a 10

$\mu\text{g/ml}$ . Se usaron concentraciones en paralelo de un antígeno no específico, el péptido 323-339 de OVA (ISQAV-HAAHAEINEAGR, SEQ ID n°: 3), como controles negativos. Como un control positivo, se usó Concanavalina A (Sigma) a diluciones que comenzaban a  $10 \mu\text{g/ml}$ . La captación de  $^3\text{H}$ TdR se detectó usando un contador de centelleo de microplacas Topcount (Packard Instrument, Meriden, CT). Los resultados se expresaron como el índice de estimulación = media de cpm de los cultivos que contenían antígeno/media de cpm de los cultivos control sin antígeno añadido.

*DTH*: Las respuestas DTH se cuantificaron usando un ensayo de hinchazón de la oreja de 24 a 28 horas, 9 días después de la estimulación con PLP 139-151. El grosor de la oreja antes de la estimulación se determinó usando un micrómetro de disco calibrado. Las respuestas DTH se generaron mediante la inyección de  $10 \mu\text{g}$  del péptido estimulador PLP 139-151 en  $10 \mu\text{l}$  de disolución salina, en la superficie ventral de la oreja derecha y del péptido 323-339 de OVA a la misma concentración en la oreja izquierda, como se describió en la sección de TMEV. Se determinaron los incrementos en el grosor de la oreja, 24 y a 48 horas después de la estimulación en la oreja, respecto de las medidas anteriores a la estimulación. Los resultados se expresaron en unidades de  $2,54 \times 10^{-4} \text{ cm}$  ( $10^{-4}$  pulgadas) + SEM. Las respuestas de hinchazón de la oreja fueron el resultado de la infiltración de células mononucleares y mostró una cinética típica de DTH (esto es, mínima hinchazón a 4 horas, máxima hinchazón a 24-48 horas).

*Producción de citocinas Th1*: Para el análisis de citocinas, se cultivaron  $2,5 \times 10^6$  células de bazo en un volumen total de 1 ml de medio de Click completo, suplementado con  $10 \mu\text{g/ml}$  de PLP 139-151, o con medio de Click solo. Los sobrenadantes se recogieron a las 72 horas y se analizó en ellos la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 mediante un ensayo ELISA de captura, usando anticuerpos de captura y de detección, además de patrones de citocinas, de Pharmingen, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

*Resultados*: Para examinar los efectos potenciales de la inmunización con K6 en la expansión y/o diferenciación de células Th1, se determinó el nivel de proliferación de células T y de producción de citocinas, específicas de PLP 139-151 en ratones tratados. Las respuestas de recuerdo de esplenocitos aislados a partir de ratones estimulados con PLP 139-151, se determinaron mediante un ensayo de proliferación *in vitro* al final de cada experimento, esto es, en el día 12 posterior a la estimulación, tras una nueva estimulación *in vitro*. Los esplenocitos de todos los ratones estimulados con PLP 139-151 (Figura 18A), proliferaron en respuesta al péptido PLP 139-151 de una forma dependiente de la dosis. La respuesta proliferativa a PLP 139-151, pero no al antígeno irrelevante, péptido de OVA, disminuyó significativamente en esplenocitos aislados de ratones inmunizados con K6 ( $n=14$ ), en comparación con ratones inmunizados con PBS ( $n=14$ ), o con ratones que no recibieron inmunización anterior ( $n=14$ ), cuando se examinaron en el día 12 después de la estimulación con PLP 139-151 (Figura 18C). Se requirió una cantidad superior a 10 veces de péptido PLP para producir una proliferación equivalente de esplenocitos aislados de ratones inmunizados con K6, en comparación con cada uno de los grupos control ( $P \leq 0,005$ ). Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-K6 alteran la respuesta de células T específicas de mielina frente al antígeno que produce la enfermedad.

*Respuestas DTH específicas de PLP 139-151 en ratones inmunizados con K6*: En los ratones descritos en la Figura 18A se muestra que cuando se inicia en el día 9, posterior a la estimulación con PLP, la hinchazón de la oreja inducida por PLP 139-151 (DTH) se suprimía *in vivo*, en ratones inmunizados con K6. El desarrollo de DTH frente al epítipo estimulador se redujo en aproximadamente 2,6 veces en ratones inmunizados con K6, respecto a sus hermanos de camada no inmunizados o inmunizados con adyuvante como control, en el punto temporal de 48 horas ( $P \leq 0,003$ ) (Figura 18D). No se observó una respuesta DTH significativa después de la inyección del péptido OVA en ninguno de los grupos, lo que indicó la especificidad del ensayo. Esto sugiere que los anticuerpos anti-K6 actúan, al menos en parte, inhibiendo la función efectora de las respuestas Th1 específicas de mielina.

*La inmunización con K6 bloquea la diferenciación de células Th1 específicas de PLP 139-151*: Para determinar los efectos del tratamiento anti-K6 sobre la diferenciación Th1, se determinó la capacidad de las células T que responden a PLP para producir citocinas Th1, IFN- $\gamma$  e IL-2. La estimulación secundaria *in vitro* de las células T específicas de PLP 139-151, derivadas de bazos de ratones inmunizados previamente con K6, PBS, o de aquellos que no recibieron inmunización anterior, reveló que la producción de la citocina Th1, IFN- $\gamma$ , se suprimió aproximadamente en 3 veces en los ratones inmunizados previamente con K6 ( $P < 0,05$  en un ensayo de la *t* de Student desapareado) respecto de los grupos control (Figura 19,  $n=6$  por grupo). Los niveles de producción de IFN- $\gamma$  por células sin estimular no se afectó significativamente, lo que sugería una recuperación de números similares de células Th1 activadas, y era un dato en contra de la inmuno-supresión global por inmunización con K6. Además, a pesar de los niveles reducidos de IFN- $\gamma$ , la secreción de IL-2 fue comparable entre los diferentes grupos. También se determinaron las secreciones inducidas por PLP 139-151 de IL-4, IL-5 e IL-10, pero sólo se observaron niveles mínimos de secreción de estas citocinas en todos los cultivos y esto probablemente refleja el hecho de que los ratones SJL generan respuestas Th2 débiles. Estos resultados son consistentes con la capacidad de los anticuerpos anti-K6 para inhibir la diferenciación Th1.

*La inmunización previa con K6 reduce el desarrollo de EAE a nivel histológico*: Se realizó un examen histológico detallado de los cambios inflamatorios y patológicos en la médula espinal en ratones inmunizados previamente con K6 y en grupos control de ratones, para determinar si la reducción de las puntuaciones de enfermedad clínica, observada por inmunización con K6, se correlacionaba con una menor inflamación y/o patología en el SNC. La eva-

## ES 2 316 770 T3

luación cuantitativa de secciones de médula espinal mostró que la reducción de las deficiencias clínicas se asociaba con una reducción de la inflamación y de la patología meníngea, cuando se examinaban, bien en el día 12 (Figura 18B), o bien en el día 21 (Figura 17B), después de la estimulación con PLP 139-151. Una comparación del porcentaje de cuadrantes de médula espinal con inflamación meníngea, o con patología parenquimal clara, se muestra en las Figuras 17B y 18B. El porcentaje medio de cuadrantes de médula espinal con inflamación meníngea/patología de la materia blanca, 12 días después de la inducción de EAE, se redujo significativamente en ratones inmunizados con K6 ( $37,3\% \pm 13,9/15,9\% \pm 7,1$ ,  $n=6$ ), en comparación con los ratones inmunizados con PBS solo ( $78,8\% \pm 7,3\%/40,1 \pm 19,9$ ,  $n=6$ ) y con los que no recibieron inmunización anterior ( $77,6\% \pm 17,5/47,5\% \pm 10,4$ ,  $n=6$ ) (ensayo de la t de Student desapareado,  $P \leq 0,05$ ). También fue evidente una reducción similar en el porcentaje de cuadrantes de médula espinal con inflamación/patología meníngea entre los ratones inmunizados previamente con K6 en el día 21 después de la inducción con EAE ( $44,6\% \pm 6,3/12,5\% \pm 3,7$ ,  $n=11$ ), en comparación con los ratones inmunizados con PBS solo ( $77,1\% \pm 4,4/36,6\% \pm 5,2$ ,  $n=13$ ), y los que no recibieron inmunización anterior ( $76,5\% \pm 6,2/47,5\% \pm 10,4$ ) (ensayo de la t de Student desapareado,  $P \leq 0,007$ ,  $n=12$ ). Este fue el caso, incluso aunque las deficiencias clínicas no fueran estadísticamente diferentes entre los distintos grupos de ratones en el punto temporal de 21 días. No se observaron diferencias significativas entre los ratones inmunizados previamente con PBS, en comparación con los que no recibieron inmunización, antes de la inducción de EAE, en cualquiera de los puntos temporales examinados.

### 20 Ejemplo 15

#### *Las inmunoglobulinas de ratones inmunizados con K6 bloquean la actividad enzimática de K6 in vitro*

Para determinar la eficacia de los anticuerpos específicos de K6, generados por inmunización directa de ratones con K6, para bloquear la actividad de K6, se aislaron inmunoglobulinas de un grupo de sueros de ratones inmunizados con K6 en ACF o con PBS que sólo contenía ACF, recogidos antes de la inducción de EAE, por purificación con proteína G (Pharmacia). Las inmunoglobulinas aisladas de ratones inmunizados con K6 se compararon también con IgG de ratón normal disponible comercialmente (IgG de ratón ChromPure, molécula completa, Jackson ImmunoResearch), como un control negativo alternativo. Adicionalmente, se generaron anticuerpos monoclonales frente a la molécula K6 recombinante completa, y se examinó su capacidad para bloquear la actividad K6 *in vitro*. Se usaron los siguientes procedimientos.

*Hidrólisis de MBP*: La función de capacidad para bloquear de los anticuerpos anti-K6 se examinó *in vitro* determinando su capacidad para inhibir la rotura de la proteína básica de mielina de rata (MBP), aislada a partir de médula espinal de rata completa, así como de un sustrato fluorogénico específico, con arginina, Ac-Ala-Thr-Arg-pNa (Bachem, King of Prussia, PA). Para el análisis de la digestión de MBP, se mezclaron 10 ng de proteína K6 activa con 2  $\mu$ g de IgG aislada de ratones inmunizados con K6 o PBS sólo, en tampón 50 mM Tris y 100 mM NaCl (pH 8,0). La mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los controles negativos de IgG se sustituyeron con un volumen igual de tampón de resuspensión solo, en lugar de K6. Posteriormente, se añadió MBP (5  $\mu$ g) a cada tubo de reacción, o tampón Tris solo, como un control, y se permitió que las reacciones procedieran durante 3 horas a 37°C. La reacción se paró por la adición de tampón de muestra SDS-PAGE con  $\beta$ -mercaptoetanol y se analizó mediante geles del 20% de Tricina SDS-PAGE.

Para examinar el efecto de la IgG aislada de los sueros de los ratones inmunizados con K6 para bloquear la hidrólisis del sustrato fluorogénico AcATR<sub>p</sub>NA, 20 ng de proteína K6 activa se incubaron previamente con 4  $\mu$ g de IgG (relación molar 1:35) a TA durante 15 minutos, en 50 mM de Tris, 1 mM EDTA, pH 8,5. Las condiciones cinéticas del ensayo fueron 1 nM de proteína K6 activada con 400  $\mu$ M de AcATR<sub>p</sub>NA, incubada a 37°C. Las absorbancias se leyeron a 405 nm, a intervalos de 15 minutos a lo largo de un periodo de 2 horas, con una lectura final al punto temporal de 3 horas, en un espectrofotómetro DU640 de Beckman Coulter conectado con un controlador de temperatura. Un diseño experimental similar se usó para analizar la capacidad de dos anticuerpos monoclonales anti-K6 (K6-2 y K6-3, IgG<sub>1k</sub>) para bloquear la hidrólisis de sustrato mediada por K6.

*Resultados*: Los sueros de ratones inmunizados con K6 se analizaron mediante ELISA al final de cada experimento, para determinar los niveles de producción de anticuerpo anti-K6 y, en todos los casos, se determinaron niveles altos. La capacidad de los anti-sueros de ratones inmunizados con K6 para bloquear la actividad enzimática específica de K6 se evaluó *in vitro* (Figura 20, Tabla 3). La fracción IgG se aisló a partir de sueros de ratones inmunizados con K6, o con adyuvante sólo, antes de la inducción de EAE. La incubación previa de K6 con IgG aislada de ratones inmunizados con K6 bloqueaba de forma efectiva la hidrólisis de MBP mediada por K6 (línea 2), mientras que la IgG aislada de animales inmunizados con PBS que sólo contenía CFA (línea 3) no lo hacía. La adición de sólo IgG, aislada de diferentes grupos experimentales, no tenía efecto sobre MBP en ausencia de la adición de proteína K6 (líneas 5 y 6). La fracción IgG de los ratones inmunizados con K6, pero no la de ratones control, o la obtenida comercialmente (datos no mostrados), bloqueaba la degradación de MBP mediada por K6 *in vitro* (disminución del 92,3%) (Figura 20A), y reducía de forma significativa la velocidad de hidrólisis del sustrato K6-AcATR<sub>p</sub>NA (disminución del 75-87%) (Figura 20B, Tabla 4).

## ES 2 316 770 T3

TABLA 4

Muestra	Velocidad de reacción (A405/min)	Normalizada frente a K6 (%)	Cambio (%)
K6 sola	0,000804	100	0
K6 + IgG anti-K6	<b>0,0000619</b>	7,7	<b>-92,3 disminución</b>
K6 + IgG anti-ACF	0,00106	131,8	31,8 aumento
Control IgG anti-K6	0,0000458	5,7	-94,3 disminución
Control IgG anti-ACF	0,0000194	2,4	-97,6 disminución

Porcentaje de cambio en la velocidad de hidrólisis del sustrato AcATRpNA mediada por K6, en presencia de IgG añadida, aislada a partir de ratones inmunizados con K6 o a partir de ratones inmunizados con PBS solo (control ACF). Hubo una disminución del 92,3% en la hidrólisis del sustrato con la adición de IgG aislada de ratones inmunizados con K6, en comparación con la velocidad de hidrólisis de sustrato observada en presencia de K6 solo. La adición de sólo IgG aislada, sin K6 añadida, no resultó en una hidrólisis de sustrato significativa a lo largo del tiempo. La adición de anti-ACF resultó en un ligero aumento en la velocidad de hidrólisis del sustrato, superior a la observada con K6 sola, un efecto mediado posiblemente por la capacidad de IgG para bloquear la velocidad de autólisis de K6.

En paralelo a la capacidad de la IgG aislada de ratones inmunizados con K6 para bloquear la actividad de la proteína K6 *in vitro*, los anticuerpos monoclonales específicos de K6 bloquearon la hidrólisis del sustrato mediada por K6 (Figura 21). La incubación previa de la proteína K6 activa con anticuerpos monoclonales específicos de K6 (hK6-2 o hK6-3) durante un periodo de 15 minutos a TA (relación molar de 1:1 a 1:10) bloqueó, en ambos casos, efectiva y dramáticamente y en una forma dependiente de la dosis, la hidrólisis mediada por K6 de un sustrato AcATRpNA fluorogénico (véase la Tabla 5). Las lecturas se tomaron cada minuto a lo largo de un periodo de 88 minutos. Los anticuerpos monoclonales específicos de K6 dieron como resultado una disminución superior al 75% en la velocidad de hidrólisis de sustrato. Contrastando con esto, la IgG de ratón normal (control) no produjo una disminución similar y, de hecho, dio como resultado un ligero aumento de la hidrólisis de sustrato mediada por K6, probablemente, al decrecer la velocidad de autólisis de K6.

## ES 2 316 770 T3

TABLA 5

Muestra	Velocidad de reacción (A405/min)	Normalizada frente a K6 (%)	Cambio (%)
K6 sola	6,685E-05	100	0
<b>Control IgG + K6 (1:1)</b>	7,675E-05	115	15% aumento
Control IgG + K6 (1:10)	8,55E-05	128	
<b>IgG K6-2 + K6 (1:1)</b>	<b>1,67E-05</b>	<b>25</b>	28 aumento
<b>IgG K6-2 + K6 (1:10)</b>	<b>8,835E-0</b>	<b>13</b>	<b>-75 disminución</b>
<b>IgG K6-3 + K6 (1:1)</b>	<b>1,58E-05</b>	<b>24</b>	<b>-87 disminución</b>
<b>IgG K6-3 + K6 (1:10)</b>	<b>8,135E-05</b>	<b>12</b>	<b>-76 disminución</b> <b>-88 disminución</b>

Estos resultados indican que el mecanismo de acción de la inmunización directa con K6 en la atenuación de la enfermedad en los modelos inflamatorios en animales examinados en esta memoria, fueron debidos, probablemente, a la capacidad de los anticuerpos generados por esta aproximación para bloquear directamente la actividad enzimática de K6, que probablemente juega funciones efectoras clave mediando la enfermedad inflamatoria. Por lo tanto, otros procedimientos de inhibición de la actividad funcional de K6, tales como inhibidores de proteasas específicos de K6, o estrategias con secuencias anti-sentido, se podrían usar también para bloquear la enfermedad inflamatoria.

### Ejemplo 16

#### *Las inmunoglobulinas aislada a partir de ratones inmunizados con K6 disminuyen la migración de las células inmunes in vitro*

La posibilidad de que anticuerpos específicos de K6 generados por inmunización directa en ratones con K6, bloquee la migración de las células inmunes, se examinó determinando el efecto de IgG aislada a partir de sueros de ratones inmunizados con K6 sobre la migración de esplenocitos *in vitro*, usando un ensayo de cámara de Boyden modificado. Se aislaron esplenocitos a partir de ratones normales y se crecieron en medio de Click completo que contenía 10 µg/ml de concanavalina A (ConA, Sigma). Después de 48 horas en cultivo, las células se recogieron y se crecieron durante 3 horas más en medio desprovisto de suero (RPMI sin rojo fenol, 1% de albúmina de suero bovino, 1 mM tampón Hepes, 50 U/ml de penicilina-estreptomycinina y 2 mM de glutamina). Las células se marcaron con Calceína AM según las recomendaciones de los fabricantes (Molecular Probes). 1 x 10<sup>6</sup> células marcadas con Calceína AM se aplicaron en 250 µl de medio desprovisto de suero a cada pocillo superior de una placa de 24 pocillos Fluoroblock recubierta con Matrigel (BD Pharmingen), con o sin la adición de 25 µg/ml de IgG de ratones inmunizados con K6, y se añadieron 750 µl del mismo medio en la cámara inferior con SDF-1α (50 ng/ml), añadido como un quimotáctico. La IgG aislada de los ratones inmunizados con ACF, o IgG de ratón purificada disponible comercialmente (Jackson Laboratories), sirven como controles de inmunoglobulinas. La fluorescencia de las células, que han emigrado hacia el interior de la cámara inferior, se leyó después de un periodo de cultivo de 24 horas en un lector de la parte inferior de las placas, Cytoflour 4000, a A530 (BioRad).

**Resultados:** Un evento de iniciación clave en el desarrollo de la desmielinización del SNC mediada por el sistema inmune, es la extravasación y migración de células inmunes desde el sistema vascular hacia el interior del SNC. Como se describió anteriormente en esta memoria, los ratones con títulos altos de anticuerpos anti-K6 tienen una inflamación parenquimal y meníngea de la médula espinal significativamente menor, en las enfermedades inflamatorias del SNC inducidas por TMEV y por PLP 139-151. En este ejemplo, se demuestra *in vitro* que la IgG aislada a partir de ratones inmunizados con K6 (Figura 22), o de anticuerpos monoclonales específicos de K6 (no mostrado), inhibe la migración de esplenocitos activados en un ensayo de invasión de cámara de Boyden. En comparación con IgG de ratón normal (control) y con la no adición de anticuerpo, la adición de IgG anti-K6 inhibe la migración en un 25% (\*ensayo de la t de Student desapareado). Estos descubrimientos indican que la eficacia de los anticuerpos específicos de K6, generados en una forma autónoma, en la atenuación de la enfermedad clínica y de la patología de la médula espinal se podría deber, al menos en parte, a una disminución en la capacidad de las células inflama-

## ES 2 316 770 T3

torias para migrar hacia el interior y dentro del SNC. Estos resultados apoyan adicionalmente la idea de que otros procedimientos de inhibición de la actividad enzimática de K6, podrían anular también la migración de las células inflamatorias.

5

### Ejemplo 17

#### *La proteína K6 está regulada positivamente en células inmunes activadas*

10 Para determinar la cuestión de si la producción de K6 por células inflamatorias infiltradas en el SNC, representa la expresión constitutiva o una regulación positiva en células activadas, se examinaron los niveles de producción y secreción de K6 en esplenocitos activados y en reposo, usando las técnicas de citometría de flujo y de ELISA.

15 Los esplenocitos se aislaron a partir de ratones SJL normales y se crecieron en presencia o en ausencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  de ConA para la activación de las células T. Las células se recogieron después de 72 horas y se examinaron para determinar la producción intracelular de K6 por citometría de flujo, usando un anticuerpo monoclonal IgG<sub>1K</sub> específico de K6 (K6-2) y un anticuerpo secundario anti-Ig de ratón marcado con FITC. Se usó IgG<sub>1K</sub> de ratón purificada como control de isotipo. Las células se marcaron conjuntamente con anticuerpos frente a los marcadores CD4 y CD8  
20 marcados con PE (Pharmingen).

La incubación de las células en presencia de ConA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 72 horas (áreas no rellenadas) dio como resultado un incremento en el número y en la intensidad de la tinción específica de K6 en células T CD4+ (Figura 23A) y CD8+ (Figura 23B), superior a la observada en esplenocitos cultivados en PBS solo.

25

Para el examen de la producción de K6 en esplenocitos y de la secreción en el medio de cultivo celular, los esplenocitos se aislaron a partir de ratones SJL normales y se cultivaron en presencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  de ConA, 5  $\mu\text{g/ml}$  de lipopolisacárido (LPS), 20  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo anti-CD3 (Ac anti-CD3) o PBS solo. Las células y los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de un periodo de 72 horas y se examinaron en ellos los niveles de proteína K6 por  
30 ELISA. Las placas se recubrieron con 100  $\mu\text{l}$  de proteínas a 250  $\mu\text{g/ml}$ , diluidas en 0,1 M tampón carbonato, o con 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cultivo, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después de bloquear la unión no específica con 1% de BSA, K6 se detectó con un anticuerpo monoclonal IgG<sub>1K</sub> específico de K6 (K6-2) y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con AP (Jackson Laboratories). Las placas se leyeron a 405 nm.

35 Como se muestra en la Figura 24A, la activación específica de células T (Con A o Ac anti-CD3), o la activación no específica de todos los esplenocitos, produjo un aumento significativo en la producción de K6 y de su secreción en el medio, en comparación con aquellas células crecidas en PBS solo (Figura 24B). La estimulación con LPS provocó un aumento de 2 veces o más en la producción de K6, mientras que la activación selectiva de las células T dio como resultado un aumento de aproximadamente 1,5 veces en K6. Estos resultados indican que  
40 las células inmunes activadas, tales como las vistas en lesiones inflamatorias del SNC, expresan niveles superiores de K6 que las células inmunes en reposo, lo que, según proponen los autores de este trabajo, contribuye a la patogénesis.

### 45 Ejemplo 18

#### *Refinamiento de la estructura de rayos X y modelo*

Se añadieron un total de 140 moléculas de disolvente a la estructura hK6 refinada. Una molécula de disolvente, asignada de forma provisional, presentaba una geometría de coordinación octaédrica con moléculas de disolvente adyacentes y distancias de contacto cortas ( 2,0Å) entre estos grupos. Este disolvente se asignó, por tanto, como un ión Mg<sup>2+</sup> 33. También fue visible una densidad no ambigua en la región del sitio activo, lo que indicaba la presencia de un inhibidor del enlace benzamidina. En la estructura refinada final, 227 de los 229 residuos de aminoácido se definieron en el mapa de densidad electrónica. La densidad electrónica observada está en total acuerdo con la  
55 secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de ADNc. La estructura peptídica de hK6 se podría trazar, sin ambigüedad, a partir de sus aminoácidos amino-terminales Ile16 a Gln243 (usando el esquema de numeración del tripsinógeno). Los residuos carboxi-terminales Ala244 y Lys245 carecen de la densidad electrónica adecuada y no se incluyeron en el modelo. Los residuos de las cadenas laterales de Lys24, Arg110, Gln239 y Gln243 no estaban definidos en el mapa de densidad electrónica y se modelaron, por tanto, como residuos de alanina. El  
60 Asp150 se modeló en múltiples conformaciones de rotámero. Algunas regiones en lazo, en particular la región del Trp215 a la Pro225, requirieron una remodelación exhaustiva debido a las grandes diferencias respecto del modelo de búsqueda. El modelo se refinó hasta valores aceptables para la esteoquímica y la cristalografía de los residuos (Tabla 6).

65

TABLA 6

**Cristal, recogida de datos, y estadística del refinamiento**

5	<i>A. Datos del cristal</i>	
	Grupo de espacio	P212121
10	Dimensiones celulares (Å)	a=39,1; b=62,1; c=85,8
	Moléculas/unidad asimétrica	1
	Constante de Matthews (Vm) (Å <sup>3</sup> /Da)	1,80
15	Resolución máxima (Å)	1,75
	<i>B. Recogida de datos y procesamiento</i>	
	Reflexiones total/única	495,027/21,777
20	Terminación (43-1,75 Å) / (X - 1,75 Å) (%)	96,0/82,7
	I/σ (43-1,75 Å) / (1,79X - 1,75 Å)	43,0/4,9
	Rfusión (43-1,75 Å) / (1,79X - 1,75 Å) (%)	5,7/38,2
25	Factor de temperatura de Wilson (Å <sup>2</sup> )	26,6
	<i>C. Refinamiento</i>	
30	Rcristal (43 - 1,75 Å) (%)	20,9
	Rlibre (43 - 1,75 Å) (%)	24,1
	rms desviación de la longitud del enlace (Å)	0,005
35	rms desviación del ángulo de enlace (°)	1,35
	rms desviación del factor B (σ)	2,83
	Representación de Ramachandran (%)	
40	Región más favorecida	87,6
	Región permitida adicional	12,4
	Región permitida generosamente	0
45	Región no permitida	0
	Número de átomos/molécula	
50	Proteína no H	1,685
	Agua/lón	139/1

## 55 Ejemplo 19

*Evaluación de la proteína hK6 recombinante*

60 La homogeneidad de la proteína hK6 purificada se evaluó usando secuenciación amino-terminal y espectrometría de masas MALDI-TOF. La espectrometría de masas reveló que las muestras hK6 usadas para la cristalización contenían a la enzima glicosilada intacta. El pico principal tenía una masa de 25.866 Da, que es una diferencia de 1366 Da respecto de la masa calculada a partir de la secuencia de proteínas. Esta masa extra corresponde a aproximadamente seis moléculas de N-acetilglucosamina. Además, los picos que corresponden a seis formas glicosiladas fueron visibles en el espectro de masas, siendo la diferencia media en masa entre cada forma = 184 Da, que corresponde a la masa de una unidad de hexosa. El análisis de la secuenciación amino-terminal dio lugar a una única secuencia de Leu-Val-His-Gly, que representa la secuencia amino terminal correcta de la proteína hK6 madura.

## ES 2 316 770 T3

### Ejemplo 20

#### *Inactivación autolítica de hK6*

5 La determinación de la estructura de rayos X de hK6 proporciona una oportunidad para caracterizar adicionalmente la regulación autolítica de K6/hK6. A diferencia de las kaliceínas de ratón, y de forma similar a la tripsina, la autólisis de hK6 conduce a su inactivación. Así, la autólisis representa un potencial mecanismo regulador en el control de la actividad de hK6. La Arg 76, un sitio de autólisis de hK6, es el residuo de arginina más accesible al disolvente en la estructura. Tanto la tripsina como la proteína hK6 se inactivan por autólisis y, aunque los sitios de autólisis no son idénticos, ambas proteasas autolizan en el dominio carboxilo terminal. Los dos sitios canónicos de autólisis en las kaliceínas de ratón, que no están asociados con inactivación, se localizan en el dominio amino terminal (en las posiciones 95 y 148). Las roturas en el dominio carboxilo terminal podrían resultar en la desestabilización de la estructura, y en la inactivación por autólisis podría representar un mecanismo de inactivación basado en la estabilidad. Alternativamente, las roturas cercanas a la histidina del sitio activo (en la posición 57) podrían favorecer la flexibilidad en esta posición, que es incompatible con el mecanismo catalítico.

### Ejemplo 21

#### *Relación estructural de hK6 con otras serin proteasas*

La estructura secundaria de la proteína hK6 está compuesta de trece láminas  $\beta$ , dos hélices  $\alpha$ , dos hélices 310 y ocho regiones en lazo identificables. Estas regiones en lazo tienen funciones variables que, en base a las estructuras de serin proteasas relacionadas, incluyen la definición de la especificidad de sustrato y la regulación autolítica. Además, estos lazos proporcionan sitios para N-glicosilación que podrían servir para regular la actividad de esta clase de enzimas. Cuando se compara la estructura de rayos X de la proteína hK6 con la tripsina bovina o con la kaliceína de ratón (enzima de conversión de pro-renina, mK13) existen tres regiones en lazo identificables de forma inmediata, adyacentes al sitio activo, que presentan heterogeneidad estructural. Estas incluyen las posiciones de los residuos 92-102 (lazo de kaliceína), 141-152 y 172-178. El lazo de kaliceína de hK6 es indistinguible en longitud cuando se compara con las proteasas de degradación tripsina y quimiotripsina, y es más corto que el observado en las kaliceínas de ratón o en otras proteasas de tipo regulador. Aunque la secuencia de aminoácidos en esta región difiere entre la proteína hK6 y la tripsina, las estructuras son esencialmente idénticas.

El lazo de superficie corto que comprende los residuos en las posiciones 172-178 es idéntico en longitud para hK6, rK6, tripsina, quimiotripsina, mK13, neuropsina, ppKa). La secuencia de aminoácidos para hK6 en esta región es idéntica a la de la tripsina bovina, con la excepción de la posición 178, y adopta una estructura esencialmente idéntica a la tripsina bovina. Este lazo corto está orientado hacia fuera del sitio activo, y contrasta con la región homóloga en mK13 (que está orientada hacia el sitio activo).

La región en lazo 141-152 en hK6 es más corta que en la tripsina, y conduce a una conformación que orienta este lazo fuera del sitio activo en comparación con la tripsina. En la comparación con otras proteasas, las proteasas de degradación de amplia especificidad tienen, generalmente, un lazo de longitud más corta en esta región, mientras que las proteasas reguladoras tienen lazos más largos que permiten contribuciones mayores al sitio de unión del sustrato.

En general, los datos estructurales para las regiones de superficie variables en lazo que limitan con el sitio activo, describen lazos que son cortos y están orientados, generalmente, hacia fuera del sitio de unión del sustrato. Así, su contribución a la formación de los sitios S2 y S3 en la proteasa, es limitada. Este es un rasgo característico de las proteasas de tipo degradativo, ejemplificadas por las enzimas digestivas, tripsina y quimiotripsina.

Los resultados cinéticos indican que hK6 tiene una eficiencia catalítica 133 veces mayor por la rotura después de arginina, en comparación con la rotura después de lisina en un sustrato tripeptídico. Así, la especificidad de hK6 por una arginina frente a una lisina en la posición P1 es más similar a la de proteasas tales como la kaliceína porcina y la trombina que tienen preferencias similares por arginina sobre lisina en la posición P1, y a diferencia de la tripsina que tiene una preferencia mucho menor, de sólo 2 a 10 veces. El bolsillo de unión S1 está definido por los residuos 189-195, 214-220 y 224-228 y la triada catalítica. Las regiones 189-195 y 224-228 son idénticas entre hK6 y tripsina, sin embargo, la región 214-220 es heterogénea con respecto a la longitud y a la secuencia y es, por tanto, el determinante estructural probable de la especificidad de P1.

Se ha descrito que los oligosacáridos unidos en N en el lazo de kaliceína de la neuropsina afectan al tamaño de la cavidad S2 y que mutaciones en esta región dan como resultado una disminución significativa tanto de  $K_{cat}$  como de  $K_m$  (a la vez que se mantienen la relación  $k_{cat}/K_m$  global). Como se mencionó previamente, hK6 carece del lazo kaliceína característico equivalente de las proteasas reguladoras, que incluyen el residuo de asparagina unido en N, en la posición 95. Sin embargo, los datos de espectrometría de masas sugieren que existe un sitio de glicosilación unida en N potencial en la posición 132 que no está presente en ninguna otra estructura de kaliceína conocida. Contrastando con el sitio de N-glicosilación encontrado en el lazo de kaliceína en otras kaliceínas, este sitio está bastante distante del sitio activo que yace en la "parte posterior" de la enzima. Existe una densidad electrónica en esta región, que es indicativa de posibles residuos de azúcar. La función de este sitio de glicosilación no se ha determinado todavía, pero

## ES 2 316 770 T3

debido a su localización distal del sitio activo, se plantea la hipótesis de que no afecta a la especificidad o función de la enzima.

### 5 **Otras formas de realización**

Se debe entender que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción presente pretende ser ilustrativa y no limitar el ámbito de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones anexas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un inhibidor de la kaliceína 6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección inflamatoria en un mamífero,

en el que dicha afección inflamatoria se selecciona entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus y asma, y

10 en el que dicho inhibidor de la kaliceína 6 es un anticuerpo que tiene afinidad de unión específica a la kaliceína 6.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es policlonal o monoclonal.

15 3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo inhibe la actividad enzimática de la kaliceína 6.

4. Un procedimiento *ex vivo* para detectar una afección inflamatoria en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento la detección del nivel de proteína kaliceína 6 humana o de su ARN, presente en una muestra de sangre o de fluido cerebroespinal de dicho individuo; y la comparación del nivel de proteína kaliceína 6 humana o de su ARN en dicha muestra con el nivel correspondiente en una población control, en el que un incremento en el nivel de proteína kaliceína 6 humana o de su ARN en dicho individuo, respecto al del dicha población control, es indicativo de dicha afección inflamatoria en dicho individuo,

25 en el que dicha afección inflamatoria se selecciona entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus y asma.

5. Un procedimiento *ex vivo* para monitorizar la terapia frente a una afección inflamatoria, comprendiendo dicho procedimiento la detección del nivel de proteína kaliceína 6 humana o de su ARN, presente en una muestra de sangre o de fluido cerebroespinal de un individuo sometido a un tratamiento para dicha afección inflamatoria; y comparación del nivel de proteína kaliceína 6 humana o de su ARN en dicha muestra, respecto del nivel de línea base de kaliceína 6 humana presente en dicho individuo, en el que una disminución en el nivel de proteína kaliceína 6 humana o de su ARN en dicho individuo, respecto de dicho nivel de línea base es indicativo de una respuesta positiva a la terapia en dicho individuo,

35 en el que dicha afección inflamatoria se selecciona entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus y asma.

6. El procedimiento de la reivindicación 4 ó 5, en el que dicha muestra biológica es suero.

40 7. El procedimiento de la reivindicación 4 ó 5, en el que la proteína kaliceína 6 humana se detecta inmunológicamente.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el nivel de proteína kaliceína 6 humana se detecta usando un anticuerpo monoclonal.

45 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el nivel de proteína kaliceína 6 humana se detecta usando un anticuerpo de captura y un anticuerpo de detección, en el que dicho anticuerpo de detección comprende un marcaje.

50 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho marcaje se selecciona entre el grupo constituido por biotina, una enzima y un radio-isótopo.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicho fluoróforo es fluoresceína, isocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), aloficocianina (APC) o proteína peridinin clorofila (PerCP).

55 12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el anticuerpo de captura está unido a un sustrato sólido.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el sustrato sólido se selecciona entre el grupo constituido por una bola y una placa de microensayo.

60 14. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo de captura es un anticuerpo policlonal.

FIG. 1

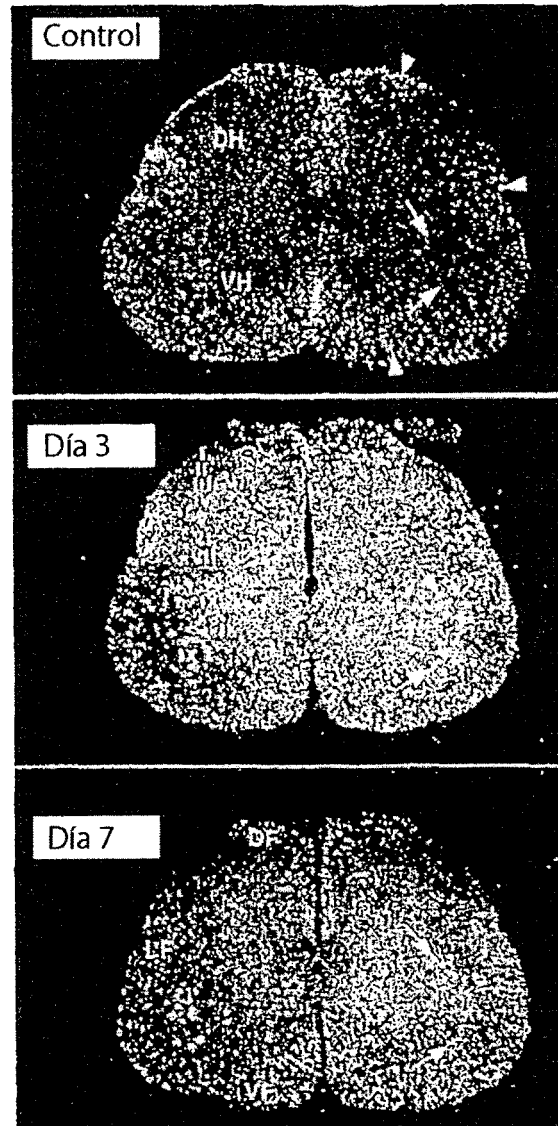


Fig. 2

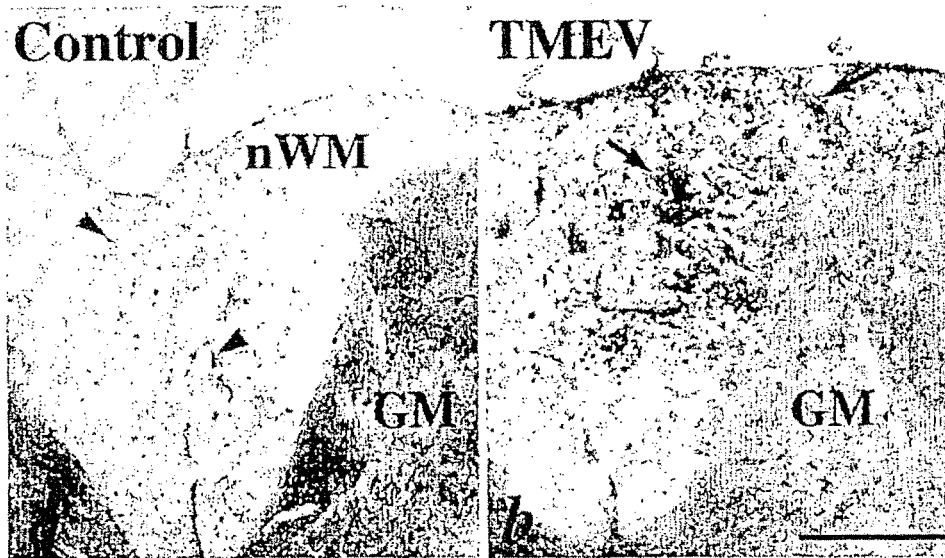


FIG. 3

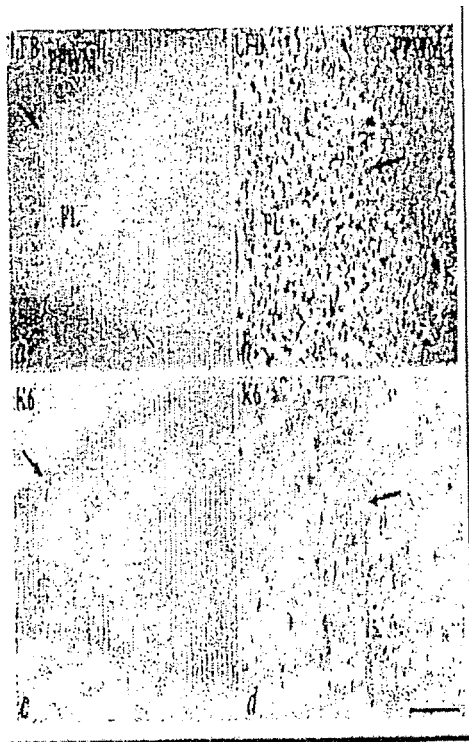


FIG. 4

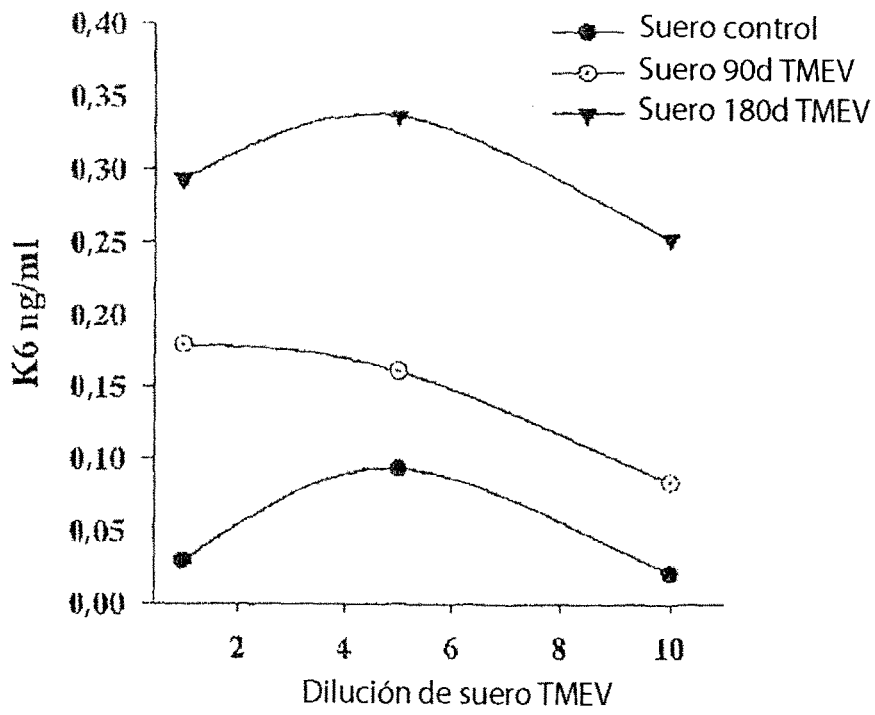


FIG. 5

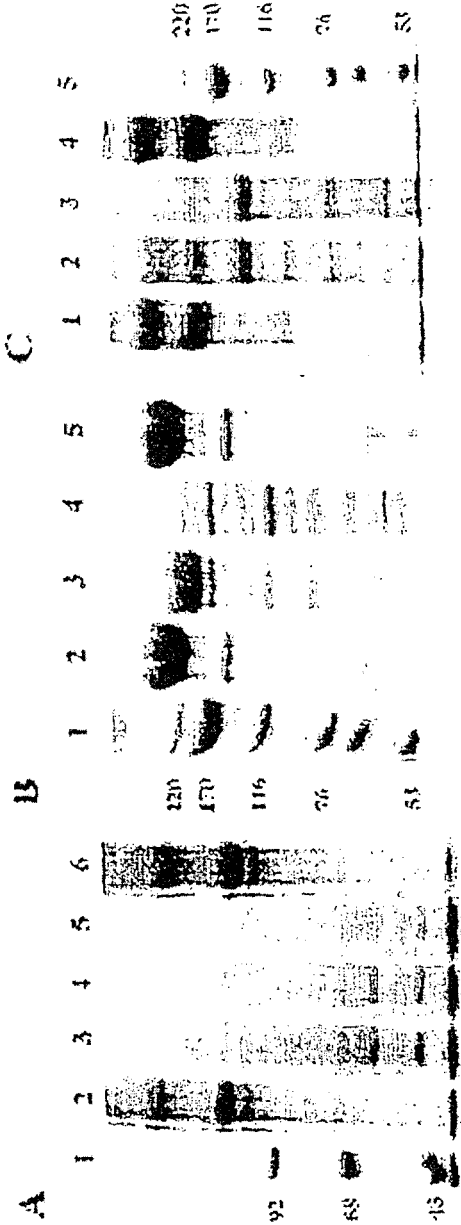


FIG. 6

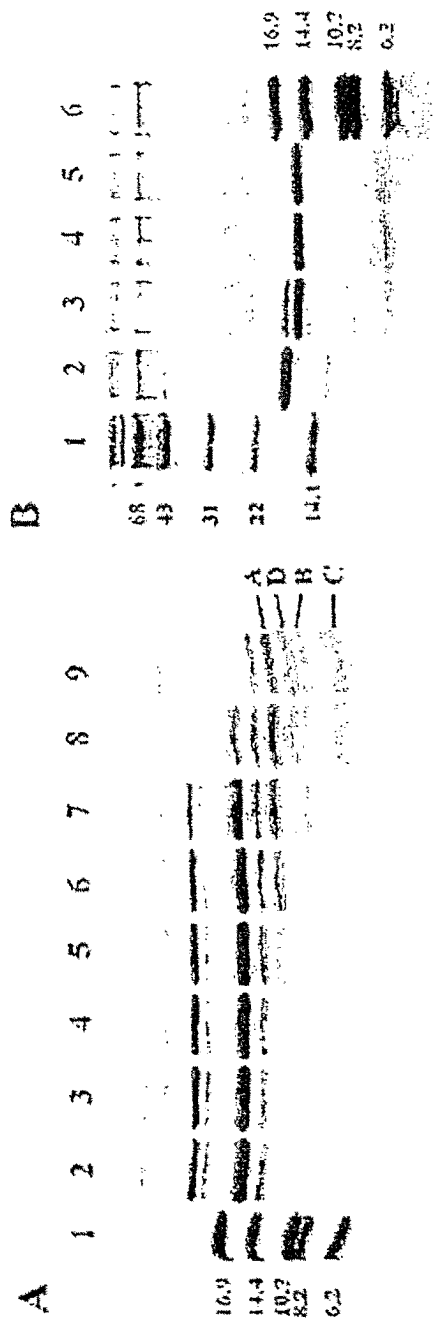


FIG. 7

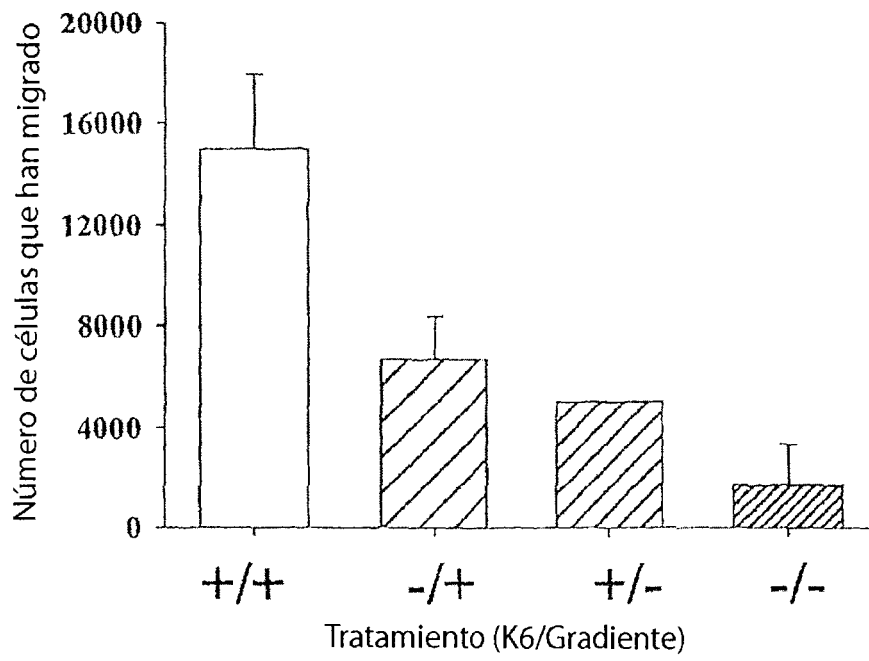


FIG. 8

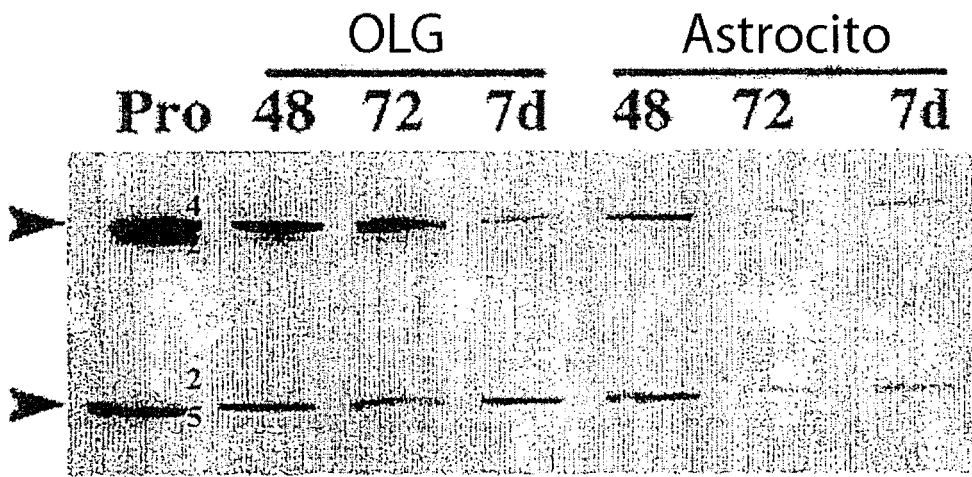
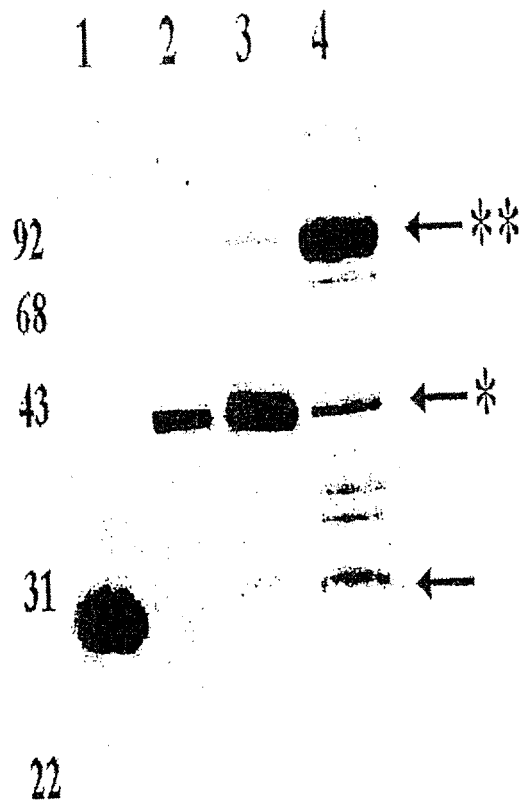


FIG. 9



**FIG. 10**

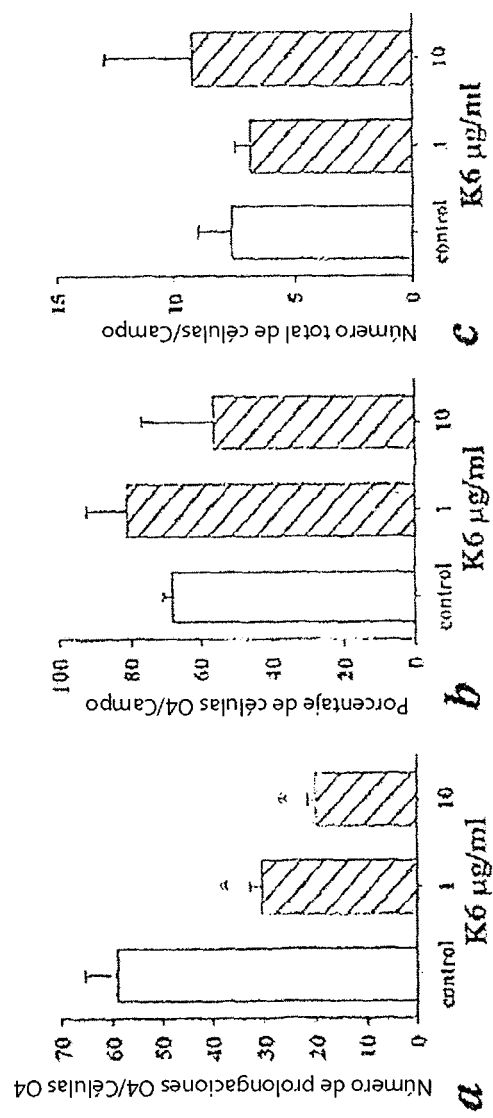


FIG. 11

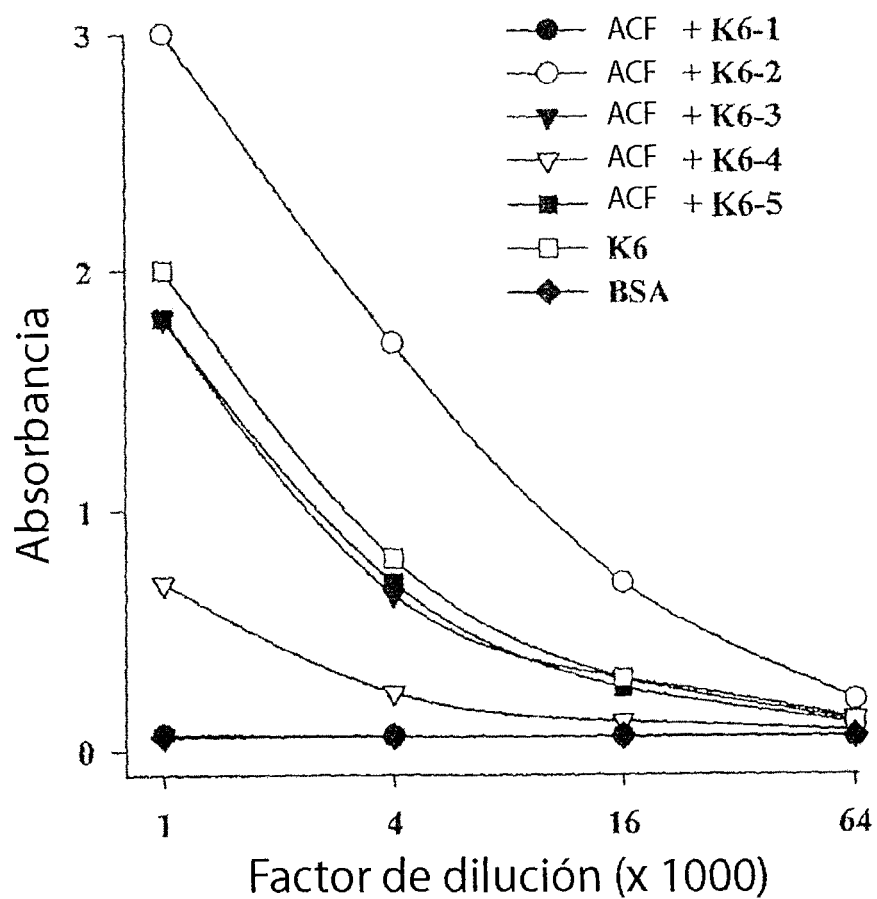


FIG. 12

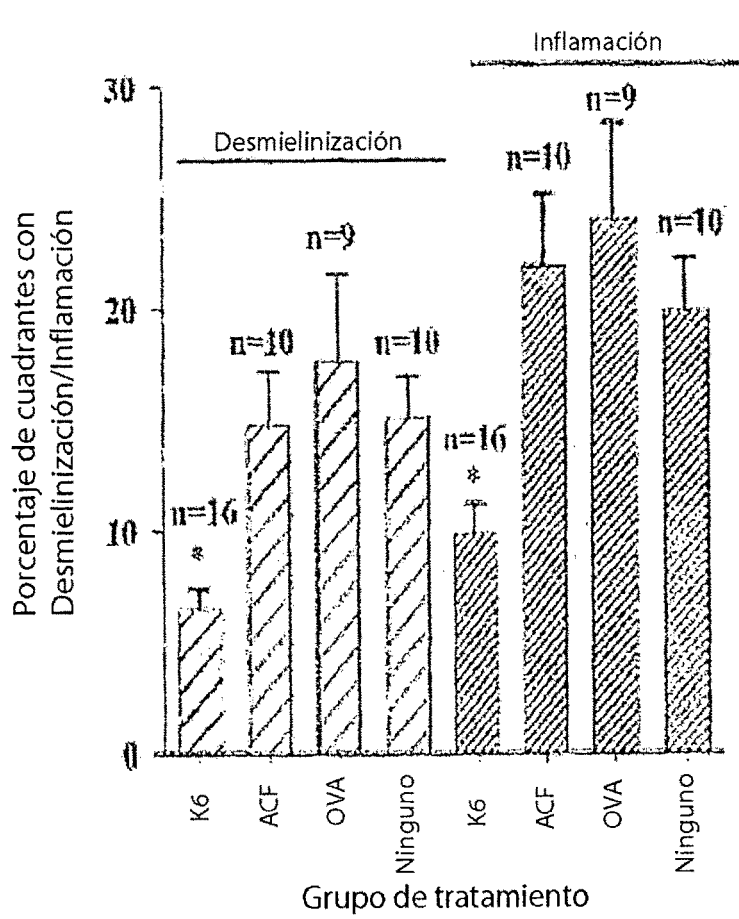


FIG. 13

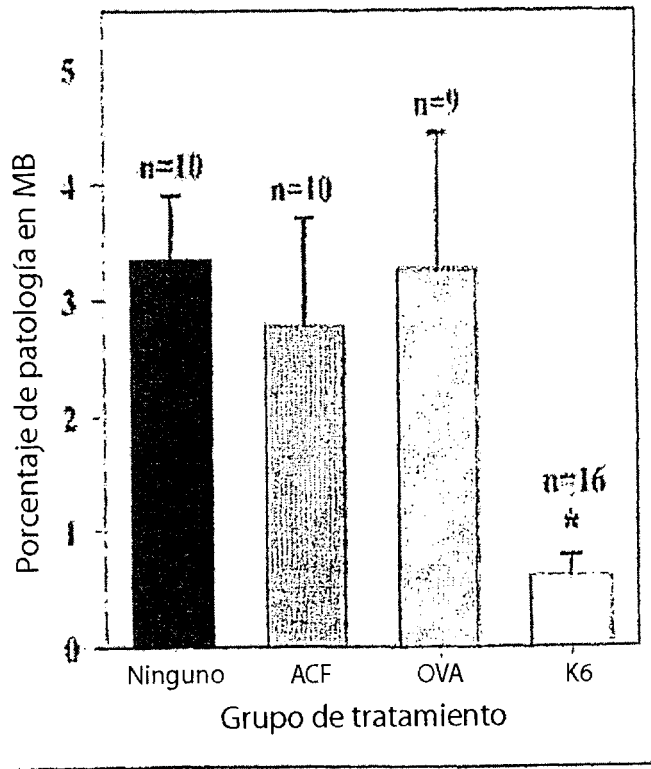


FIG. 14

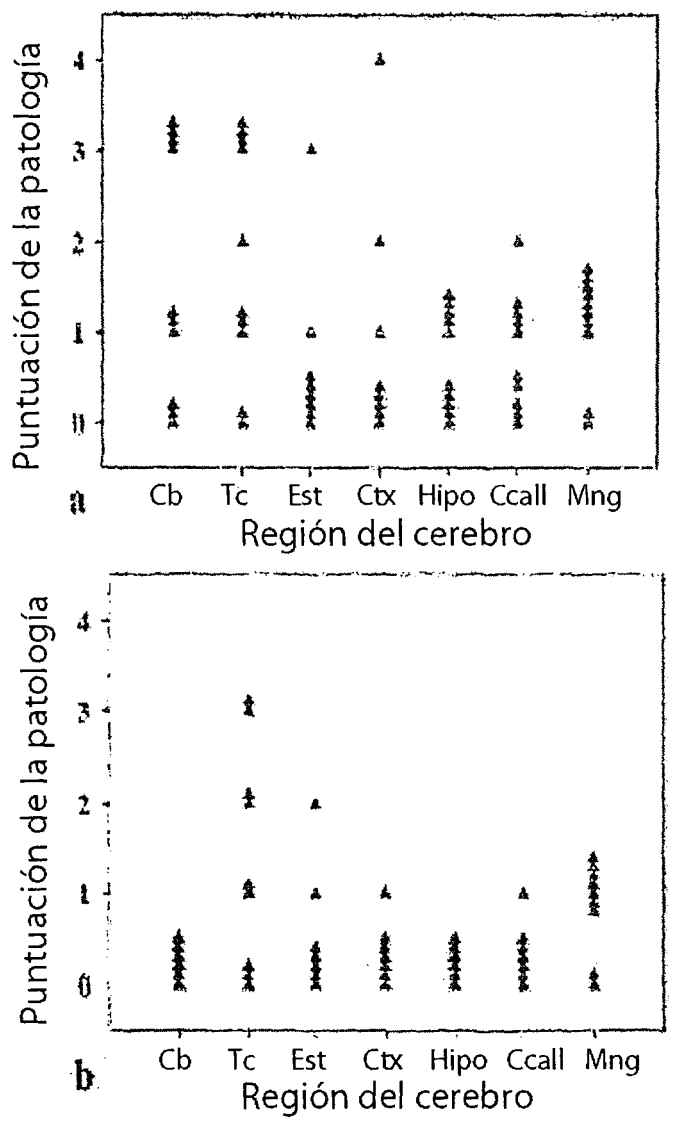


FIG. 15

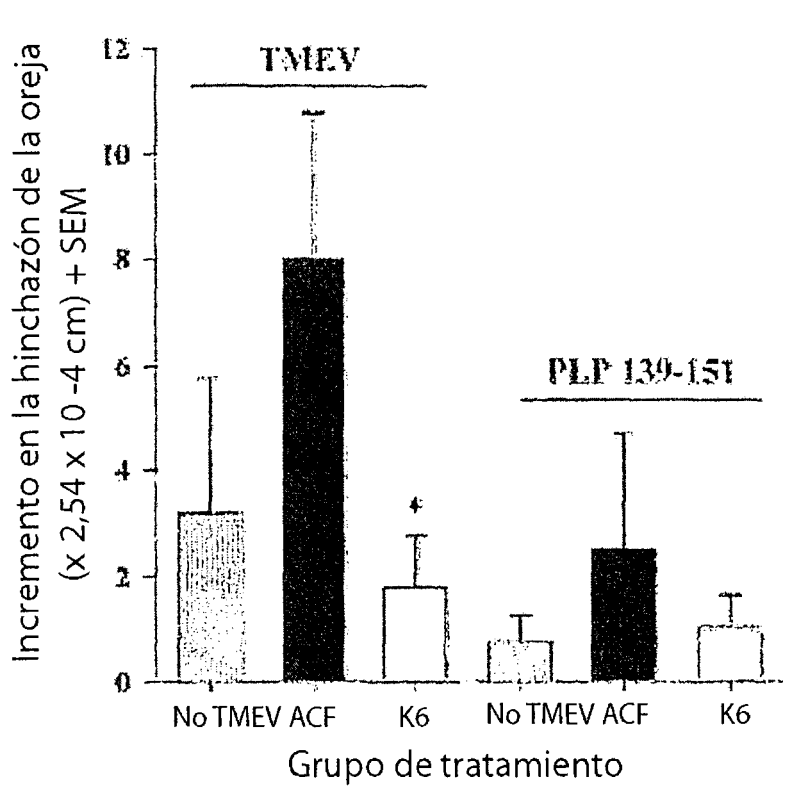


FIG. 16

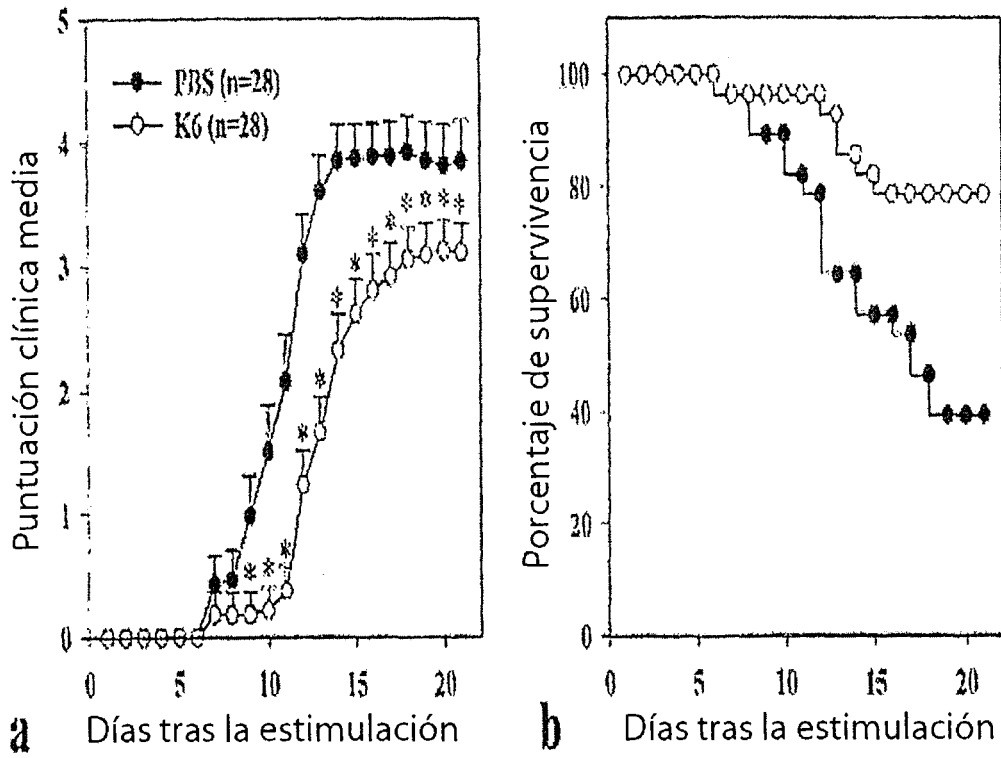


FIG. 17

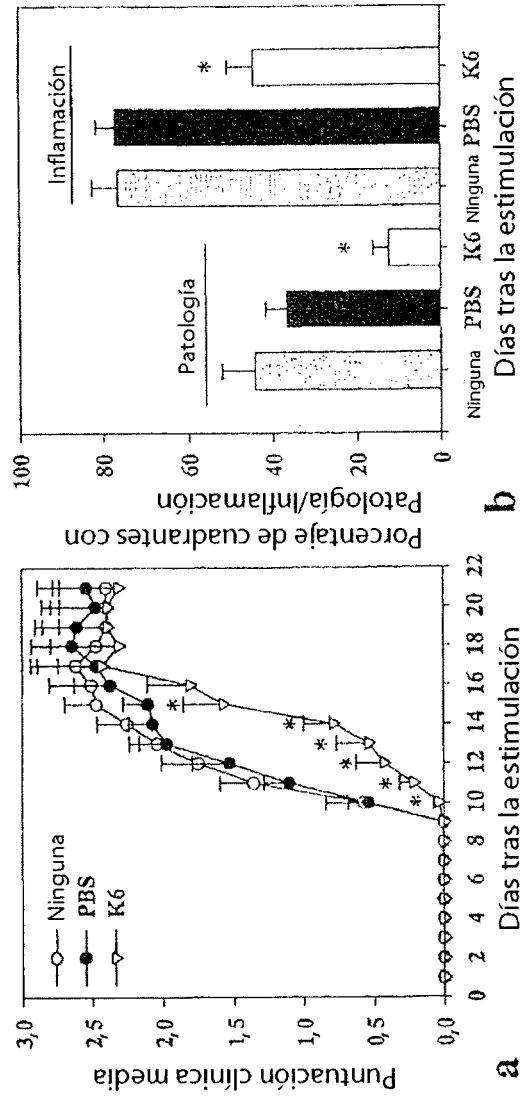


FIG. 18

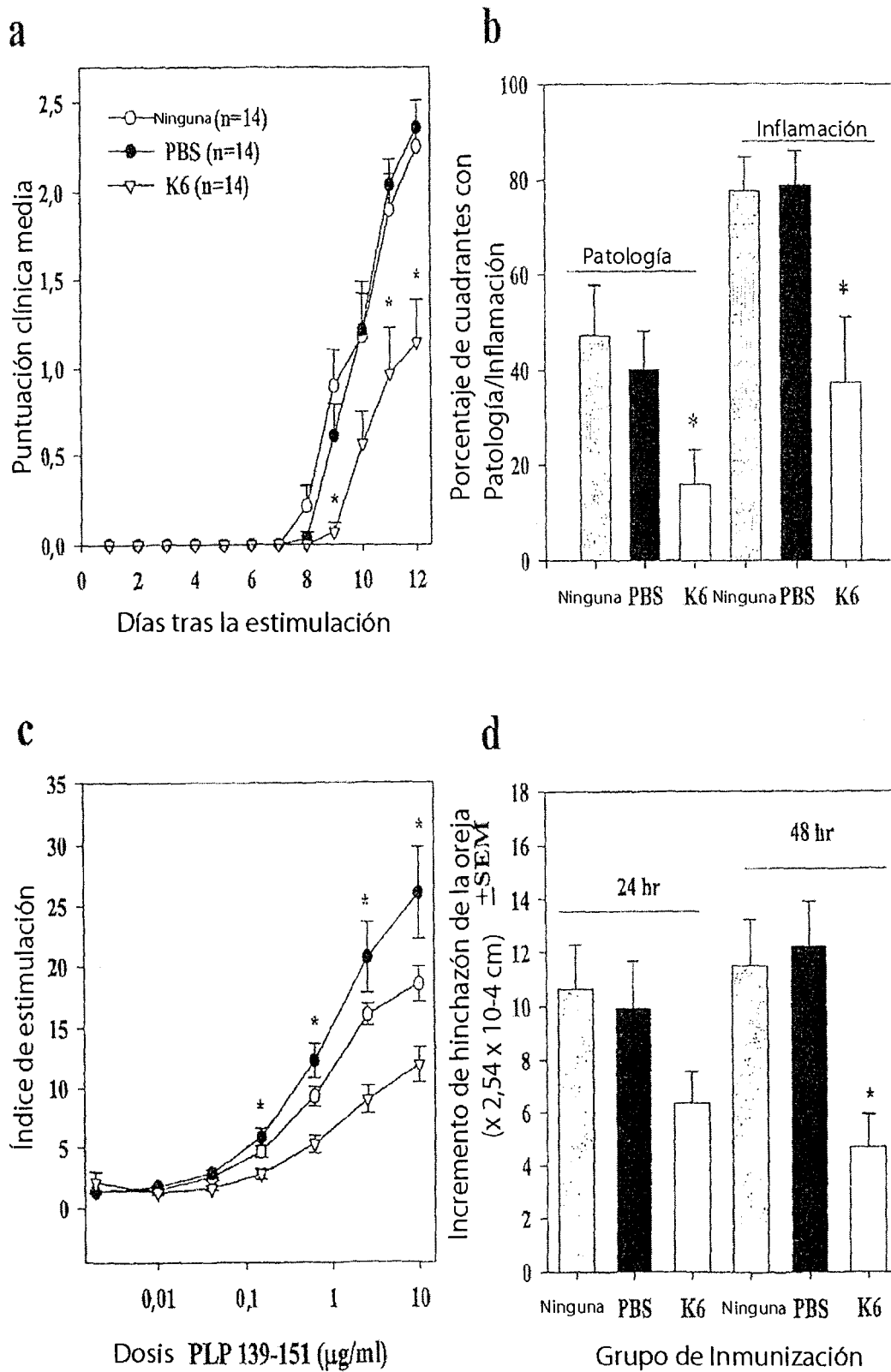


FIG. 19

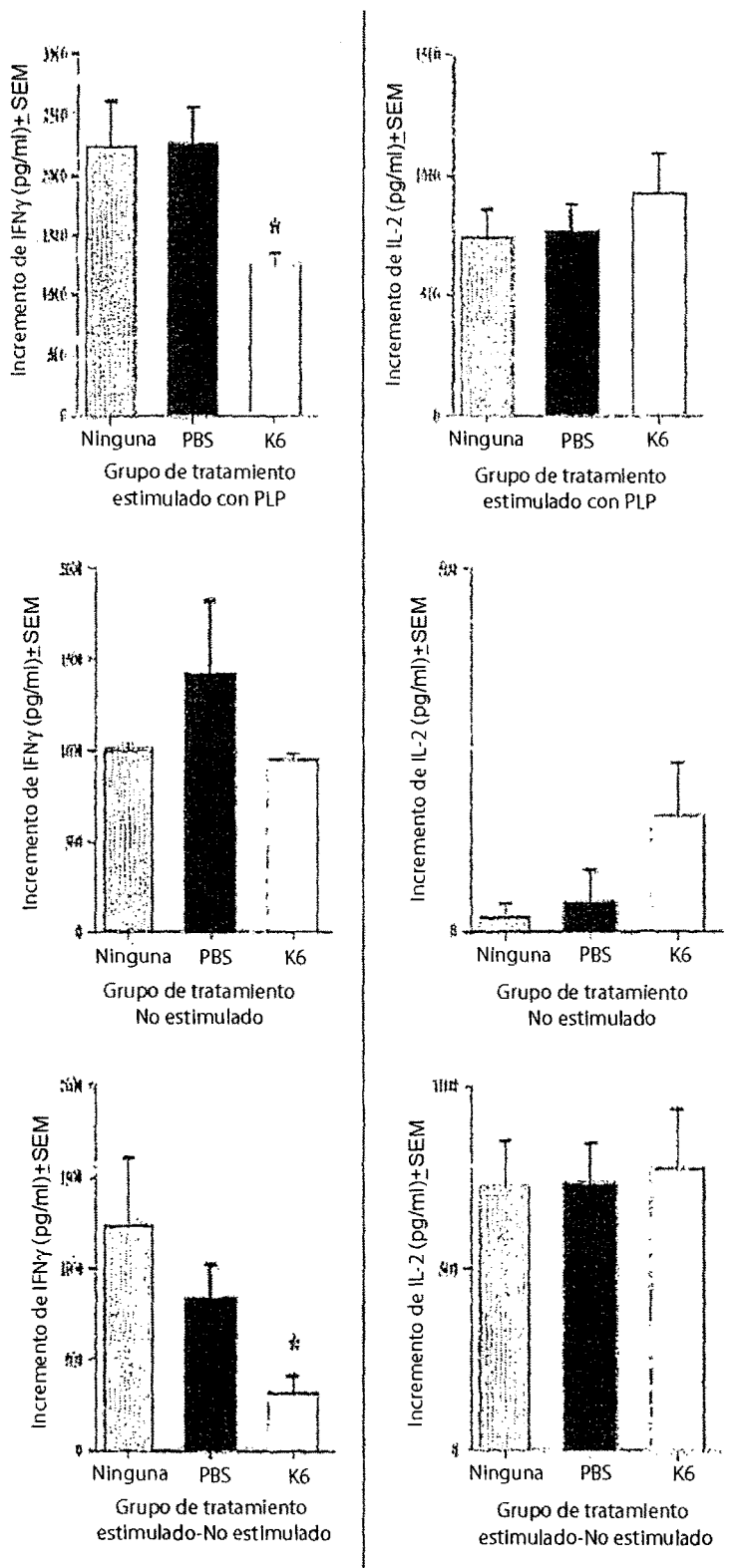


FIG. 20

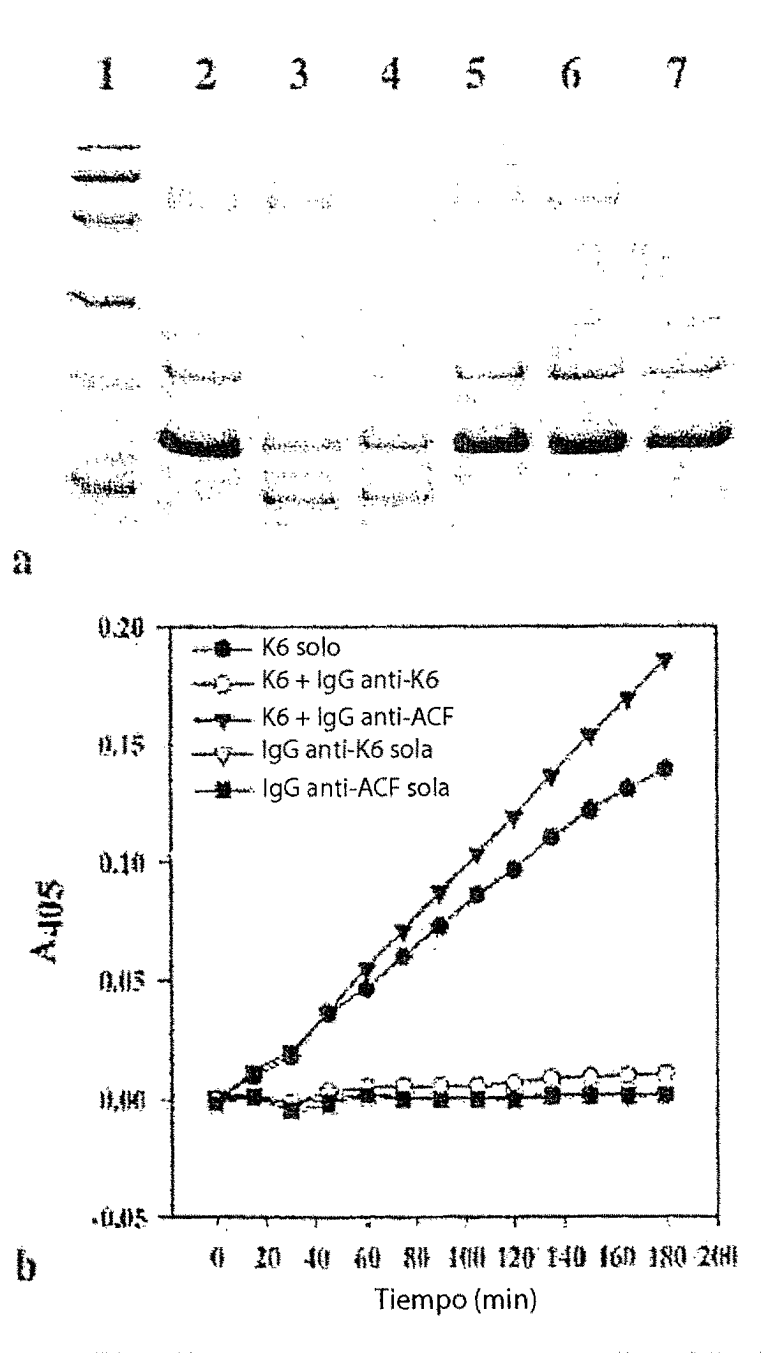


FIG. 21

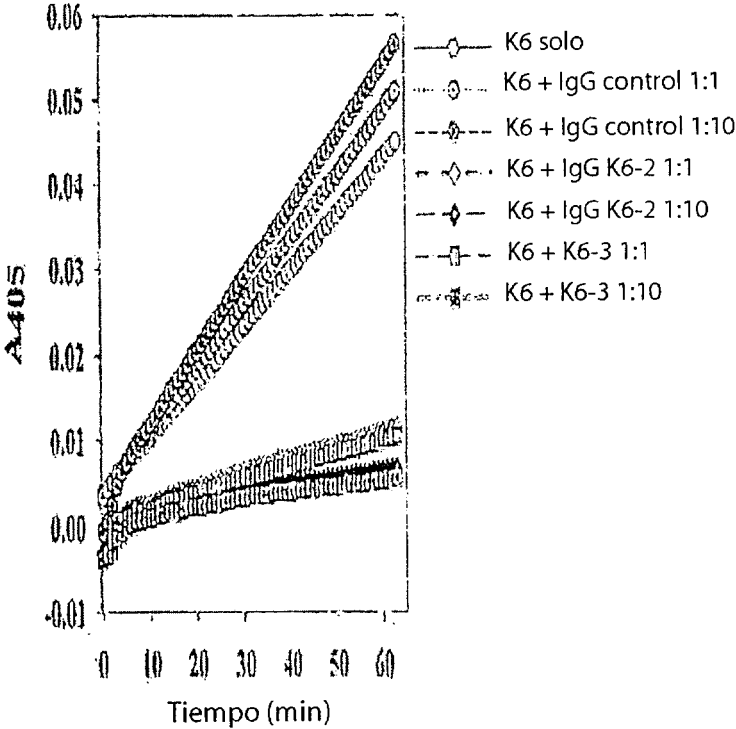


FIG. 22

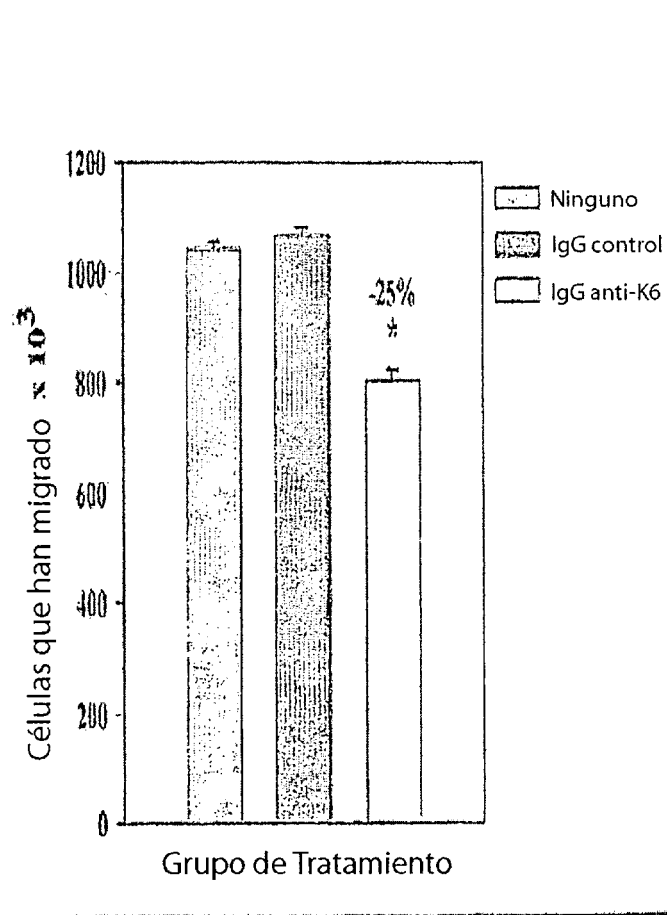


FIG. 23

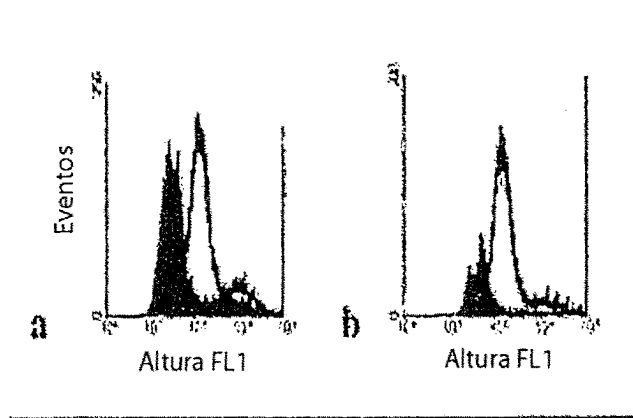


FIG. 24

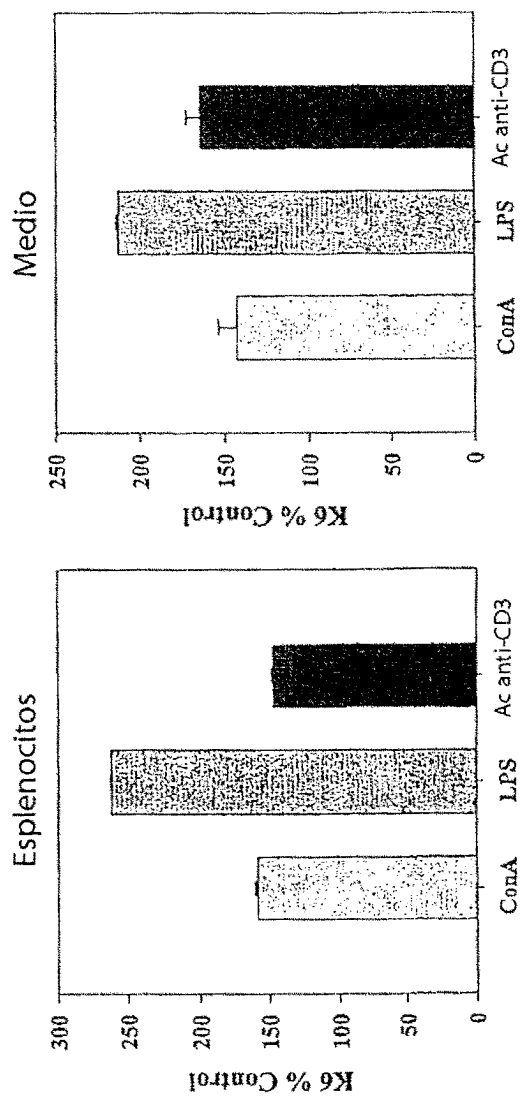


FIG. 25

```

1   gtcgaccac gcgtccggct ggctgggctcg ctctctcctg gggacacaga ggtcggcagg
61  cagcacacag agggacctac gggcagctgt tccctccccc gactcaagaa tccccggagg
121 cccggaggcc tgcagcagga gcgcccatga agaagctgat ggtggctgctg agtctgattg
181 ctgcagcctg ggcagaggag cagaataagt tgggtgcatgg cggaccctgc gacaagacat
241 ctcaccccta ccaagctgcc ctctacacct cgggccactt gctctgtggt ggggtcctta
301 tccatccact gtgggtcctc acagctgccc actgcaaaaa accgaatcct caggctctcc
361 tggggaagca taaccttcgg caaagggaga gtccccagga gcagagttct gttgtccggg
421 ctgtgatcca cctgactat gatgccgcca gccatgacca ggacatcatg ctgttgcgcc
481 tggcacgccc agccaaactc tctgaactca tccagccctt tcccctggag agggactgct
541 cagccaacac caccagctgc cacatcctgg gctggggcaa gacagcagat ggtgatttcc
601 ctgacacccat ccagttgca tacatccacc tgggtgcccc tgaggagtgt gacatgcct
661 accctggcca gatcacccag aacatgttgt gtgctgggga tgagaagtac ggaaggatt
721 cctgccaggg tgattctggg ggtccgctgg tatgtggaga ccacctccga ggccttgtgt
781 catggggtaa catcccctgt ggatcaaaag agaagccagg agtctacacc aacgtctgca
841 gatacacgaa ctggatccaa aaaaccattc aggccaaagt accctgacat gtgacatcta
901 cctcccgacc taccacccca ctggctgggt ccagaacgct tctcacctag accttgcctc
961 ccctcctctc ctgcccagct ctgacctga tgcttaataa acgcagcgac gtgagggtcc
1021 tgattctccc tggttttacc ccagctccat ccttgcata ctggggagga cgtgatgagt
1081 gaggacttgg gtcctcggtc ttaccccccac cactaagaga atacaggaaa atcccctcta
1141 ggcattctct ctccccaaac cttccacacg tttgatttct tccctgcagag gcccagcccac
1201 gtgtctggaa tcccagctcc gctgcttact gtccggtgctc ccttgggatg taccttctct
1261 cactgcagat ttctcacctg taagatgaag ataaggatga tacagtctcc ataaggcagt
1321 ggctgttggg aagatttaag gtttcacacc tatgacatac atggaatagc acctggggca
1381 ccatgcactc aataaagaat gaattttatt atg

```