



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) PI 0716833-0 A2**



(22) Data de Depósito: 18/09/2007  
(43) Data da Publicação: 05/11/2013  
(RPI 2235)

**(51) Int.Cl.:**  
A61K 31/00  
A61K 31/18  
A61K 31/195  
A61K 31/404  
A61K 31/42  
A61K 31/513  
A61K 31/575  
A61K 31/58  
G01N 33/68  
G01N 33/74  
G01N 33/92

**(54) Título:** USO DE AGONISTAS DE LXR PARA O TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE

**(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 19/09/2006 US 60/845,576

**(73) Titular(es):** Wyeth

**(72) Inventor(es):** Edward Lavallie, Elisabeth Morris, Lisa Collins-Racie, Sunil Nagpal, Zhiyong Yang

**(74) Procurador(es):** Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

**(86) Pedido Internacional:** PCT US2007020150 de 18/09/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2008/036239de 27/03/2008

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**USO DE AGONISTAS DE LXR PARA O TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE**".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a métodos de tratar ou impedir a osteoartrite com agonistas LXR.

Antecedentes da Invenção

10 A osteoartrite, igualmente conhecida como a doença degenerativa das juntas, é caracterizada pela degeneração da cartilagem articular assim como a proliferação e remodelagem do osso subcondrial. Os sintomas usuais são rigidez, limitação do movimento, e dor. A osteoartrite é a forma mais comum da artrite, e as taxas da predominância aumentam consideravelmente com a idade.

15 Os tratamentos mais próximos da osteoartrite incluem exercício, medicamentos, descanso e cuidado das juntas, cirurgia, técnicas de alívio da dor, terapias alternativas, e controle do peso. Os medicamentos mais comumente usados para tratar a osteoartrite incluem fármacos anti-inflamatórias não-esteroidais (NSAIDs), por exemplo, aspirina, ibuprofeno, naproxeno sódico, quetoprofeno; cremes tópicos de alívio da dor, emulsões, e sprays (por exemplo, creme de capsaicina) aplicados diretamente à pele;

20 corticosteroides, tipicamente injetados em juntas afetadas para aliviar temporariamente a dor; e ácido hialurônico. A cirurgia pode ser executada para reparar ossos, reposicionar ossos, e substituir juntas. Embora vários medicamentos sejam usados no tratamento da doença, não são eficazes para o controle e a prevenção a longo prazo.

25 Os receptores X do fígado (LXRs), originalmente identificados no fígado como receptores órfãos, são membros da super família de receptores hormonais nucleares e foram descobertos como sendo reguladores negativos da expressão de gene inflamatório de macrófago (veja o pedido de patente publicado US2004/0259948 ; SB, Joseph *et al*, Nat. MED. 9:213 - 19

30 (2003)). LXRs são fatores de transcrição ligantes-ativados e se ligam ao ADN como heterodímeros obrigados com os receptores de retinoide X. Enquanto LXR $\alpha$  é restrito a determinados tecidos tais como fígado, rim, tecido

adiposo, intestino, e macrófagos, LXR $\beta$  indica um padrão ubíquo de distribuição do tecido. A ativação de LXRs por oxisterois (ligantes endógenos) nos macrófagos resulta na expressão de diversos genes envolvidos no metabolismo de lipídeos e transporte reverso do colesterol, incluindo ABCA1, ABCG1, e apolipoproteína E.

#### Sumário da Invenção

Um aspecto é relacionado ao método de tratamento de um mamífero que sofre de osteoartrite compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade do gene LXR responsável pela expressão-indução de um agonista LXR.

Um outro aspecto é relacionado ao método de induzir a expressão de apolipoproteína D em um mamífero que tem a cartilagem osteoartrítica compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade eficaz de um agonista LXR.

Um outro aspecto relaciona-se a um método de impedir a osteoartrite compreendendo: (a) determinar um nível da expressão da linha de base da apolipoproteína D na cartilagem normal de um sujeito; e (b) manter o nível de expressão da linha de base da apolipoproteína D na cartilagem do sujeito através do tratamento com agonista LXR.

Um aspecto adicional é relacionado ao método de tratamento de um mamífero que sofre de osteoartrite compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade de uma agrecanase de atividade inibitória de um agonista LXR.

Um outro aspecto adicional é relacionado ao método de inibição da atividade da agrecanase em um mamífero que tem cartilagem osteoartrítica compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade eficaz de um agonista LXR.

Um outro aspecto relaciona-se a um método de tratamento de um mamífero que sofre de osteoartrite compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade, uma quantidade eficaz de um agonista LXR para inibir a elaboração de citocinas pró-inflamatórias em lesões osteoartríticas.

Um aspecto adicional relaciona-se a um método para detectar um fenótipo osteoartrítico em um sujeito compreendendo: (a) determinar um nível de expressão da linha de base da apolipoproteína D na cartilagem normal; (b) obter uma amostra de cartilagem do sujeito suspeito de ter osteoartrite; e (c) detectar o nível de expressão da apolipoproteína D na amostra; onde uma quantidade mais baixa de expressão da apolipoproteína D na amostra comparada à expressão da linha de base da apolipoproteína D é indicativa de osteoartrite.

Um outro aspecto adicional é um método para identificar um LXR ligante capaz de reduzir um efeito osteoartrítico na cartilagem compreendendo: (a) fornecer uma amostra contendo LXR; (b) colocar em contato a amostra com um composto de teste; e (c) determinar se o composto de teste induz a expressão da apolipoproteína D, inibe a atividade da agreganase, inibe a elaboração de citocinas pró-inflamatórias, ou uma combinação destas.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão aparentes àqueles versados na técnica através da referência à descrição detalhada que aqui segue.

#### Breve Descrição das Figuras

A figura 1A é um gráfico de barra que mostra níveis de expressão relativos a um receptor nuclear (NR) na cartilagem com osteoartrite severa (OA). A figura 1B é um gráfico de barra que mostra níveis de expressão relativos da expressão do receptor de retinoide na cartilagem com OA severa.

A figura 2A é um gráfico de barra que mostra a expressão de ApoD na cartilagem normal, e na cartilagem com OA suave e OA severa. A severidade da doença foi avaliada macroscopicamente examinando os tamanhos e a profundidade das lesões nas cartilagens das amostras. A figura 2B é um gráfico de barra que mostra a expressão de TNF $\alpha$  na cartilagem normal, e na cartilagem com OA suave e OA severa.

A figura 3 é um gráfico de barra que mostra que a degradação/liberação de proteoglicanos induzida por citocina a partir de explantes da

cartilagem humana com OA é inibida por agonistas LXR, e que a redução induzida por citocina do conteúdo total de proteoglicanos nestes explantes é impedida pelos agonistas LXR.

5 A figura 4A é um Western blot que mostra neo-epítomos agreca-  
nos gerados por agrecanase usando o anticorpo BC-3, que reconhece o N-  
terminal em catabólitos agrecanos gerados por agrecanase. Os explantes da  
cartilagem de dois doadores humanos com estágio terminal de OA (após  
cirurgia de recolocação das juntas) foram usados. O doador número 259 é  
um paciente masculino de 57 anos de idade, e o doador número 261 é um  
10 paciente feminino de 55 anos de idade. Rotas 1, 5: veículo. Rotas 2, 6:  
TO901317 (2 $\mu$ M). Rotas 3, 7: IL-1 $\beta$  + oncostatina M (OSM) (10 ng/ml cada).  
Rotas 4, 8: IL-1 $\beta$  + OSM + TO901317. A figura 4B é um Western blot que  
mostra neo-epítomos agrecanos gerados por agrecanase usando o anticorpo  
AGEG, que reconhece um diferente epítipo em catabólitos agrecanos gera-  
15 dos por agrecanase. Rotas 1, 5: veículo. Rotas 2, 6: TO901317 (2 $\mu$ M). Rotas  
3, 7: IL-1 $\beta$  + OSM (10 ng/ml cada). Rotas 4, 8: IL-1 $\beta$  +OSM + TO901317.

A figura 5A é um gráfico de barra que mostra a inibição da produção total da prostaglandina E2 (PGE2) dos explantes de cartilagem humana tratadas com citocinas pelos agonistas LXR.

20 A figura 5B compara as quantidades de ácido araquidônico nas  
formas de membrana fosfolipídicas PC e PE nos explantes tratados com o  
veículo controle ou agonista LXR GW3965 (2  $\mu$ M) por 21 dias. As amostras  
de cartilagem de 2 doadores OA humanos foram usadas neste estudo.

#### Descrição Detalhada da Invenção

25 Os requerentes incorporam especificamente os conteúdos completos de todas as referências mencionadas nesta descrição. Adicionalmente, quando uma quantidade, concentração, ou outro valor ou parâmetro é dado tanto como uma faixa, faixa preferida, ou uma lista de valores superiores preferíveis e valores inferiores preferíveis, esta deve ser compreendida  
30 como especificamente descrevendo todas as faixas formadas de qualquer par de qualquer limite de faixa superior ou valor preferido e qualquer limite de faixa inferior ou valor preferido, independentemente se as faixas são di-

vulgadas separadamente. Quando uma faixa de valores em uméricos é relacionada neste, a menos que indicada de outra maneira, a faixa pretende incluir os pontos finais da mesma, e todos os números inteiros e frações dentro da faixa. Não se pretende que o escopo da invenção esteja limitado aos valores específicos relatados ao definir uma faixa.

A prática da presente invenção empregará, salvo indicação contrária, as técnicas convencionais da biologia celular, cultura celular, biologia molecular, biologia transgênica, microbiologia, DNA recombinante, e imunologia, que estão dentro da habilidade da técnica. Tais técnicas são explicadas inteiramente na literatura. Veja, por exemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); US4,683,195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods in Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Aqui, os requerentes mostram que LXR $\alpha$  e LXR $\beta$  (receptor X de fígado  $\alpha$  e  $\beta$ ) são expressados nas cartilagens osteoartríticas normais, médias e cartilagens osteoartríticas severas. Os requerentes também demonstraram pela primeira vez um defeito lipídico plausível na osteoartrite porque a expressão de Apolipoproteína D (ApoD), que é expressada em um nível muito elevado na cartilagem normal, é dramaticamente regulada para baixo na cartilagem osteoartrítica média e severa. Os ligantes LXR induzem a expres-

são de ApoD através de um elemento responsivo a LXR presente na região promotora de ApoD. De acordo com os dados da expressão, os níveis de proteína da proapolipoproteína D são também reduzidos nas amostras de cartilagem osteoartrítica quando comparados à cartilagem normal. Como

5 ApoD é uma proteína de ligação de lipídeo (ácido araquidônico e colesterol), sua redução na cartilagem osteoartrítica pode contar para o aumento dos níveis lipídicos que são observados na cartilagem osteoartrítica. Espera-se que o ácido araquidônico aumentado na cartilagem resulte em níveis aumentados de mediadores lipídicos de inflamação (PGE2, leucotrienos, e afins) no

10 tecido afetado. A cartilagem osteoartrítica também demonstra atividade aumentada de enzimas degradantes de cartilagem (agrecanases e metaloproteases).

Os requerentes também mostram pela primeira vez que o ligante LXR inibe a atividade das agrecanases em explantes de tecido de cartilagem articular de osteoartrite humana. Os ligantes LXR também inibem a expressão de TNF $\alpha$ , e um número de outras citocinas pró-inflamatórias. Consequentemente, se espera que um ligante LXR seja terapêuticamente eficaz na osteoartrite, e mais eficaz que a atual, assim como próximas terapias osteoartríticas, normalizando o defeito lipídico, inibindo a expressão e/ou a atividade de agrecanases/metaloproteases, e inibindo a elaboração de citocinas pró-inflamatórias em lesões osteoartríticas. Ainda, os ligantes LXR induzem a família c-jun/c-fos de proteínas e, em consequência, aumentam a atividade de AP1, que é exigida para a formação da cartilagem. Consequentemente, com ligantes LXR, pela primeira vez, um tratamento de osteoartrite pode não

15

20

25

somente inibir a degradação da cartilagem, mas também induzir a regeneração da cartilagem.

### I. Definições

No contexto deste documento, em umerosos termos serão utilizados.

30 Como aqui usado, o termo “cerca” ou “aproximadamente” significa que está dentro de 20%, preferivelmente dentro de 10%, e mais preferivelmente dentro de 5% de um valor ou de uma faixa dada.

O termo “atividade de agrecanase” refere-se a pelo menos um processo celular interrompido ou iniciado por uma enzima agrecanase ligando-se a um agrecano. Geralmente, a atividade se refere a clivagem proteolítica de um agrecano por agrecanase. Outras atividades de agrecanase incluem, mas não são limitadas a, ligação da agrecanase a agrecano e uma resposta biológica resultante da ligação a ou clivagem de agrecanos por agrecanases.

O termo “elaboração de citocina” refere-se à produção de citocinas por tecidos cartilagosos ou condrócitos.

Os termos “quantidade eficaz”, “quantidade terapeuticamente eficaz”, “quantidade de indução de expressão de gene responsivo a LXR”, “quantidade de inibição de atividade de agrecanase”, e “dosagem eficaz” como aqui usados, referem-se à quantidade de uma molécula efetora que, ao ser administrada a um mamífero em caso de necessidade, é eficaz para pelo menos melhorar parcialmente ou pelo menos impedir parcialmente as condições relativas à osteoartrite.

Como aqui usado, o termo “expressão” inclui o processo pelo qual o DNA é transcrito em mRNA e traduzido em polipeptídeos ou proteínas.

O termo “induzir” ou “indução” da expressão da apolipoproteína D (ApoD) refere-se a um aumento, uma indução, ou de outra maneira acréscimo de mRNA da apolipoproteína D e/ou expressão de proteína. O aumento, a indução, ou o acréscimo podem ser medidos por um dos ensaios aqui relatados. A indução da expressão da apolipoproteína D não indica necessariamente a expressão máxima de apolipoproteína D. Um aumento na expressão de ApoD pode ser, por exemplo, de pelo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais. Em uma modalidade, a indução é medida comparando níveis de expressão de mRNA ApoD da cartilagem normal àqueles níveis de expressão de mRNA ApoD da cartilagem osteoartrítica.

O termo “inibir” ou “inibição” de agrecanase ou de atividade de agrecanase refere-se a uma redução, inibição, ou de outra maneira diminui-

ção de pelo menos uma atividade de agrecanase. A redução, inibição, ou diminuição da ligação pode ser medida por um dos ensaios aqui relatados. A inibição de atividade da agrecanase não indica necessariamente uma completa negação da atividade da agrecanase. Uma redução na atividade pode ser, por exemplo, de pelo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais. Em uma modalidade, a inibição é medida por uma redução na detecção de produtos de clivagem de agrecano.

O termo “inibir” ou “inibição” da elaboração de citocinas pró-inflamatórias refere-se a uma redução, inibição, ou de outra maneira diminuição da atividade de uma citocina como, por exemplo, iNOS, MCP-3, COX-2, MIP1 $\beta$ , MMP-9, IP-10, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , G-CSF, TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-6. A redução, inibição, ou diminuição da elaboração da citocina podem ser medidas por um dos ensaios aqui relatados. A inibição de elaboração de citocina pró-inflamatória não indica necessariamente uma completa negação de elaboração de citocina pró-inflamatória. Uma redução na elaboração pode ser, por exemplo, de pelo menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais. Em uma modalidade, a inibição é medida comparando níveis de expressão de mRNA TNF $\alpha$  da cartilagem normal à-queles níveis de expressão de mRNA TNF $\alpha$  da cartilagem osteoartrítica.

“Receptor X do fígado” ou “LXR” refere-se tanto a LXR $\alpha$  quanto LXR $\beta$ , e variantes, isoformas, e fragmentos ativos destes. LXR $\beta$  é ubiqüamente expressado, enquanto a expressão de LXR $\alpha$  é limitada ao fígado, rim, intestino, baço, tecido adiposo, macrófagos, músculo esquelético, e, como aqui demonstrado, à cartilagem. Os números de acesso representativos do GenBank® para sequências de LXR $\alpha$  incluem o seguinte: ser humano (*Homo sapiens*, Q13133), camundongo (*Mus musculus*, Q9Z0Y9), rato (*Rattus norvegicus*, Q62685), vaca (*Bos taurus*, Q5E9B6), porco (*Sus scrofa*, A-AY43056), galinha (*Gallus gallus*, AAM90897). Os números representativos de acesso do GenBank® para LXR $\beta$  incluem o seguinte: ser humano (*Homo sapiens*, P55055), camundongo (*Mus musculus*, Q60644), rato (*Rattus norvegicus*, Q62755), vaca (*Bos taurus*, Q5BIS6).

O termo “mamífero” refere-se a um ser humano, um primata

não-humano, canino, felino, bovino, ovino, suíno, murino, ou outro animal ou mamífero de laboratório. Aqueles versados na técnica reconhecem que uma terapia que reduza a severidade da patologia em uma espécie de mamífero é preditiva do efeito da terapia em outras espécies de mamífero.

5 O termo “modular” abrange ou uma diminuição ou um aumento na atividade ou expressão dependendo da molécula alvo. Por exemplo, um modulador ApoD é considerado para modular a expressão de ApoD se a presença de tal modulador ApoD resulta em um aumento ou diminuição da expressão de ApoD.

## 10 II. Agonistas LXR

Os agonistas LXR utilizados na presente invenção incluem oxiesteróis naturais, oxiesteróis sintéticos, não-oxiesteróis sintéticos, e não-oxiesteróis naturais. Os exemplos de oxiesteróis naturais incluem 20 (S) hidroxicolesterol, 22 (R) hidroxicolesterol, 24 (S) hidroxicolesterol, 25-  
15 hidroxicolesterol, 24 (S), 25 epoxicolesterol, e 27-hidroxicolesterol. Os exemplos de oxiesteróis sintéticos incluem N, N-dimetil-3 $\beta$ -hidroxicolenamida (DMHCA). Os exemplos de não-oxiesteróis sintéticos incluem N- (2,2,2-trifluoroetil) – N-{4-[2,2,2-trifluór-1-hidróxi-1-(trifluorometil)etil]fenil} benzeno sulfonamida (TO901317; Tularik 0901317), ácido [3 (3 (2-cloro-  
20 trifluorometilbenzil-2,2-difeniletilamino)propóxi) feniácético] (GW3965), N-metil-N-[4 (2,2,2-trifluór-1-hidróxi-1-trifluorometil-1-etil) - fenil] - benzenosulfonamida (TO314407), ácido 4,5 di-hidro-1- (3 (3-trifluorometil-7-propil-benzisoxazol-6-ilóxi) propil)-2,6-pirimidinediona, 3 cloro-4-(3 (7-propil-3-trifluorometil-6- (4.5)-isoxazolil)propiltio)- fenil acético (F<sub>3</sub>MetilAA), e dímero  
25 acetil-podocárpico. Os exemplos de não-oxiesteróis naturais incluem paxilina, desmosterol, e stigmasterol.

Outros importantes agonistas LXR são relatados, por exemplo, nos pedidos de patentes americanas US2006/0030612, 2005/0131014, 2005/0036992, 2005/0080111, 2003/0181420, 2003/0086923,  
30 2003/0207898, 2004/0110947, 2004/0087632, 2005/0009837, 2004/0048920, e 2005/0123580; patentes americanas US 6.316.503, 6.828.446, 6.822.120, e 6.900.244; WO01/41704; Menke JG ET al., Endocri-

nology 143:2548-58 (2002); Joseph SB et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:7604-09 (2002); Fu X et al., J. Biol. Chem. 276:38378-87 (2001); Schultz JR et al., Genes Dev. 14:2831-38 (2000); Sparrow CP et al., J. Biol. Chem. 277:10021-27 (2002); Yang C et al., J. Biol. Chem., Manuscript M603781200  
5 (July 20, 2006); Bramlett KS et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 307:291-96 (2003); Ondeyka JG et al., J. Antibiot (Tokyo) 58:559-65 (2005).

### III. Métodos de Tratamento/Prevenção

De acordo com um método modulatório, a atividade de LXR é estimulada em uma célula ao conectar a célula com um agonista LXR. Exemplos de tais agonistas LXR são descritos acima na seção II. Outros agonistas LXR que podem ser usados para estimular a atividade de LXR, podem ser identificados usando uma prospecção de ensaios para tais compostos, como aqui descrito em detalhe (seção V).  
10

Os métodos modulatórios podem ser executados *in vitro* (por exemplo, cultivando a célula com um agonista LXR ou introduzindo um agonista de LXR nas células em cultura) ou, alternativamente, *in vivo* (por exemplo, administrando um agonista LXR a um sujeito ou introduzindo um agonista LXR em células de um sujeito). Para praticar um método modulatório *in vitro*, as células podem ser obtidas de um sujeito através de métodos padrão e incubadas (isto é, cultivadas) *in vitro* com um agonista LXR para modular a atividade de LXR nas células.  
15  
20

#### 1. Métodos Profiláticos

Em um aspecto, a invenção fornece um método de prevenir a osteoartrite em um sujeito administrando a este sujeito um agonista LXR que induz a expressão de ApoD e/ou inibe a atividade da agreganase e/ou inibe a elaboração de citocinas pró-inflamatórias em lesões osteoartíticas. A administração de um agonista profilático LXR pode ocorrer antes da manifestação de sintomas da osteoartrite, de forma que a osteoartrite é impedida ou, alternativamente, atrasada em sua progressão.  
25

#### 2. Métodos Terapêuticos

  
30

Outro aspecto da invenção relaciona-se aos métodos de modular a atividade de LXR para finalidades terapêuticas da osteoartrite. Conse-

quentemente, em uma modalidade exemplar, um método modulatório da invenção envolve conectar a célula com um agonista LXR que module a expressão de ApoD e/ou a atividade da agrecanase e/ou iniba a elaboração de citocinas pró-inflamatórias em lesões osteoartríticas. Estes métodos modulatórios podem ser executados *in vitro* (por exemplo, cultivando a célula com um agonista LXR) ou, alternativamente, *in vivo* (por exemplo, administrando agonista LXR a um sujeito). Assim, a presente invenção fornece métodos de tratar um indivíduo afligido com a osteoartrite que tiraria proveito da modulação da expressão de ApoD e/ou da atividade da agrecanase e/ou da elaboração pró-inflamatória da citocina em lesões osteoartríticas.

#### IV. Administração de agonistas LXR

Os agonistas LXR são administrados aos sujeitos em uma forma biologicamente compatível apropriada para a administração farmacêutica *in vivo* para aumentar a expressão de ApoD e/ou suprimir a atividade da agrecanase e/ou suprimir a elaboração de citocinas pró-inflamatórias. A sentença “forma biologicamente compatível apropriado para ser administrado de maneira que todos os efeitos tóxicos sejam compensados pelos efeitos terapêuticos do agonista. O termo “sujeito” é pretendido incluir os organismos vivos nos quais uma resposta imune pode ser induzida, por exemplo, mamíferos. A administração dos agonistas LXR como aqui descrita pode estar em qualquer forma farmacológica incluindo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agonista LXR sozinho ou em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agonista LXR pode variar de acordo com fatores tais como o estágio da doença, a idade, sexo, e peso do indivíduo, e da habilidade do agonista de LXR induzir uma resposta desejada no indivíduo. O regime de dosagem pode ser ajustado para fornecer a melhor resposta terapêutica. Por exemplo, várias doses divididas podem ser administradas diariamente, ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida como indicado pelas exigências da situação terapêutica. As composições terapêuticas ou farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas por qualquer rota apropriada conhecida na técnica incluín-

do, por exemplo, oral, intravenosa, subcutânea, intramuscular, transdermal, intratecal, ou intracerebral ou na administração às células em protocolos de tratamento *ex vivo*. A administração pode ser tanto rápida por injeção ou durante um período de tempo por infusão lenta ou administração lenta de liberação da formulação. Para tratar ou impedir a osteoartrite, a administração das composições terapêuticas ou farmacêuticas da presente invenção pode ser executada, por exemplo, pela administração oral ou pela injeção intra-articular.

Além disso, os agonistas LXR podem ser estavelmente ligados a um polímero tal como o polietileno glicol para obter propriedades desejáveis de solubilidade, estabilidade, de meia-vida, e de outras propriedades farmacêuticas vantajosas (veja, por exemplo, Davis et al, *Enzyme Eng.* 4:169 - 73 (1978); Burnham NL, *Am. J. Hosp. Pharm.* 51:210 - 18 (1994)).

Os agonistas LXR podem estar em uma composição que auxilie a distribuição para o citosol de uma célula. Por exemplo, um agonista LXR pode ser conjugado com uma fração do veículo tal como um lipossoma que seja capaz de entregar o agonista no citosol de uma célula. Tais métodos são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Amselem S et al, *Chem. Phys.Lipids* 64:219-37 (1993)). Além disso, um agonista LXR pode ser distribuído diretamente para uma célula por meio de microinjeção.

Os agonistas LXR podem ser empregados sob a forma de preparações farmacêuticas. Tais preparações são feitas de uma maneira conhecida na técnica farmacêutica. Uma preparação preferida utiliza um veículo de solução fisiológica salina, mas contempla-se que outros veículos farmacêuticos aceitáveis, tais como concentrações fisiológicas de outros sais não-tóxicos, cinco por cento de solução de glicose aquosa, água esterilizada ou afins podem igualmente ser usados. Como aqui usado, "o veículo farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e de absorção retardada, e afins. O uso de tal meio e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio convencional ou agente é incompatível com

agonista LXR, o uso destes em composições terapêuticas é contemplado. Os compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições. Pode também ser desejável que um tampão apropriado esteja presente na composição. Tais soluções podem, se desejado, ser liofilizadas e armazenadas em uma ampola estéril pronta para reconstituição pela adição de água esterilizada para uma pronta injeção. O solvente primário pode ser aquoso ou alternativamente não-aquoso. Os agonistas LXR podem também ser incorporados em uma matriz biologicamente sólida ou semi-sólida compatível com a matriz a qual possa ser implantada nos tecidos que necessitem de tratamento.

O veículo pode também conter outros excipientes farmacêuticamente aceitáveis para modificar ou manter o pH, osmolaridade, viscosidade, clareza, cor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução, ou odor da formulação.

A administração da dose pode ser repetida dependendo dos parâmetros farmacocinéticos da formulação da dosagem e da via de administração usada.

É também afirmado que determinadas formulações contendo agonistas LXR devem ser administradas oralmente. Tais formulações são preferencialmente encapsuladas e formuladas com veículos apropriados em formas de dosagem sólidas. Alguns exemplos de veículos, excipientes, e diluentes adequados apropriados incluem lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, fosfato de cálcio, alginatos, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, gelatina, xarope, metil celulose, metil- e propil hidroxibenzoatos, talco, magnésio, estearato, água, óleo mineral, e afins. As formulações podem adicionalmente incluir agentes lubrificantes, agentes umedecedores, emulsificação e agentes de suspensão, agentes de conservação, agentes adoçantes, ou agentes aromatizantes. As composições podem ser formuladas para fornecer a liberação rápida, sustentada, ou atrasada dos ingredientes ativos após administração ao paciente empregando procedimentos conhecidos na técnica. As formulações podem também conter as substâncias que diminuem a degra-

dação proteolítica e/ou as substâncias que promova a absorção tal como, por exemplo, agentes de superfície ativa.

É especialmente vantajoso formular composições na forma de dosagem unitária para facilitar a administração e uniformidade de dosagem.

5 A forma de dosagem unitária como aqui usado refere-se às unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para que sujeitos mamíferos sejam tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico exigido. A especificação para

10 as formas de dosagem unitária da invenção é ditada por e diretamente dependente (a) das características exclusivas do agonista LXR e do efeito terapêutico particular a ser alcançado e (b) das limitações inerentes na técnica de combinar tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade nos indivíduos. A dose específica pode prontamente ser calculada por alguém ver-

15 sado na técnica, por exemplo, de acordo com o peso aproximado do corpo ou a área de superfície do corpo do paciente ou o volume de espaço do corpo a ser ocupado. A dose será também calculada dependente da via de administração particular selecionada. Um refinamento adicional dos cálculos necessários para determinar a dosagem apropriada para o tratamento é feito

20 rotineiramente por aqueles versados na técnica. Tais cálculos podem ser feitos sem experimentação imprópria por pessoas qualificadas com base nas atividades do agonista LXR aqui divulgadas em preparações de ensaios de células-alvo. As dosagens exatas são determinadas conjuntamente com estudos padrão de dose-resposta. Compreender-se-á que a quantidade da

25 composição realmente administrada será determinada por um médico, à vista das circunstâncias relevantes incluindo a circunstância ou as circunstâncias a serem tratadas, a escolha da composição a ser administrada, a idade, peso, e resposta do paciente individual, a severidade dos sintomas do paciente, e a via da administração escolhida.

30 A toxicidade e a eficácia terapêutica de tais agonistas LXR podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrões em culturas de células ou em animais experimentais, por exemplo, para determinar o

LD<sub>50</sub> (a dose letal para 50% da população) e o ED<sub>50</sub> (a dose terapêutica eficaz em 50% da população). A taxa da dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressa como a relação LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Os agonistas LXR que exibem grandes índices terapêuticos são preferidos.

5 Embora agonistas LXR que exibem efeitos colaterais tóxicos possam ser usados, deve-se tomar cuidado para projetar um sistema de distribuição que alveje tais agonistas ao local do tecido afetado a fim de minimizar o dano potencial para as células não-infectadas e, dessa forma, reduzir os efeitos colaterais.

10 Os dados obtidos de ensaios de cultura de células e dos estudos de animais podem ser usados para formular uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem de tais agonistas de LXR encontra-se preferivelmente dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem o ED<sub>50</sub> com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. Para todo o agonista LXR usado em um método da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios da cultura celular. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir uma faixa de concentração no plasma em circulação que inclua o IC<sub>50</sub> (isto é, a concentração de agonista LXR que alcança uma inibição meio máxima de sintomas) como determinado na cultura celular. Tal informação pode ser usada para mais exatamente determinar as doses úteis nos seres humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alta performance.

25 Monitoração da influência dos agonistas LXR na expressão de ApoD e/ou na atividade da agreganase e/ou na elaboração de citocinas pró-inflamatórias pode ser aplicada não somente na seleção básica da fármaco, mas também em ensaios clínicos. Por exemplo, a eficácia de um agonista de LXR pode ser monitorada em triagem clínica de sujeitos que exibem a expressão de gene ApoD diminuída em condrócitos e/ou a atividade aumentada de agreganase e/ou a elaboração aumentada de citocinas pró-inflamatórias em lesões osteoartríticas. Em tais triagens clínicas, a expres-

30

são de ApoD e/ou a atividade de agrecanase e/ou a elaboração de citocinas pró-inflamatórias podem ser usadas como “leitores” ou marcadores do fenótipo de estágios diferentes da osteoartrite.

Assim, para estudar o efeito dos agonistas LXR na osteoartrite, por exemplo, em um ensaio clínico, as células podem ser isoladas e o RNA preparado e analisado para os níveis de expressão de ApoD e outros genes implicados na osteoartrite (por exemplo, TNF $\alpha$ ). Os níveis de expressão de gene (isto é, um padrão de expressão de gene) podem ser quantificados pela análise Northern blot ou RT-PCR, medindo a quantidade de proteína produzida, ou medindo os níveis de atividade de ApoD ou outros genes, todos por métodos conhecidos aos versados na técnica. Desta maneira, o padrão de expressão de gene pode servir como um marcador, indicativo da resposta fisiológica das células ao agonista LXR. Dessa forma, este estado de resposta pode ser determinado antes, e em vários pontos durante o tratamento do indivíduo com o agonista LXR.

A presente invenção também fornece um método para monitorar a eficácia do tratamento de um sujeito com um agonista LXR compreendendo as etapas (i) obter uma amostra de pré-administração de um sujeito antes da administração do agonista LXR; (ii) detectar o nível de expressão de ApoD e/ou do nível de atividade da agrecanase e/ou o nível de elaboração de citocinas pró-inflamatórias na amostra de pré-administração; (iii) obter uma ou várias amostras pós-administração do sujeito; (iv) detectar o nível de expressão ou da atividade de ApoD e/ou o nível de atividade da agrecanase e/ou o nível de elaboração de citocinas pró-inflamatórias nas amostras de pós-administração; (v) comparar o nível de expressão de ApoD e/ou o nível de atividade da agrecanase e/ou o nível de elaboração de citocinas pró-inflamatórias na amostra de pré-administração com a expressão de ApoD e/ou atividade da agrecanase e/ou o nível de elaboração de citocinas pró-inflamatórias na amostra ou amostras de pós-administração; e (vi) alterar a administração do agonista LXR ao sujeito adequadamente. Por exemplo, a administração aumentada do agonista LXR pode ser desejável para aumentar a expressão de ApoD a níveis mais elevados do que detectado e/ou re-

duzir a atividade da agrecanase a níveis inferiores aos detectados e/ou reduzir a elaboração de citocinas pró-inflamatórias a níveis inferiores aos detectados, isto é, para aumentar a eficácia do agonista LXR. Alternativamente, a administração diminuída do agonista LXR pode ser desejável para diminuir a expressão de ApoD a níveis inferiores aos detectados ou atividade e/ou para aumentar a atividade da agrecanase a níveis mais elevados do que os detectados e/ou para aumentar a elaboração de citocinas pró-inflamatórias a níveis mais elevados do que detectados, isto é, para diminuir a eficácia do agonista LXR. De acordo com tal modalidade, a expressão de ApoD e/ou a atividade da agrecanase e/ou a elaboração das citocinas pró-inflamatórias podem ser usadas como um indicador da eficácia de um agonista LXR, mesmo na ausência de uma resposta fenotípica perceptível.

Além disso, no tratamento da osteoartrite, as composições que contêm os agonistas LXR podem ser administradas exogenamente, e seria provavelmente desejável conseguir determinados níveis alvo de agonista LXR nos soros, em qualquer compartimento de tecido desejado, e/ou no tecido afetado. Seria conseqüentemente vantajoso poder monitorar os níveis de agonista LXR em um paciente ou em uma amostra biológica que inclui uma amostra da biópsia do tecido obtida de um paciente e, em alguns casos, também monitorar os níveis de expressão de ApoD e/ou da atividade da agrecanase e/ou da elaboração das citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, a presente invenção também fornece métodos para detectar a presença do agonista LXR em uma amostra de um paciente.

#### V. Ensaios de Seleção

Em uma modalidade, os níveis da expressão de genes responsáveis LXR ou os níveis de atividade de proteínas destes podem ser usados para facilitar o projeto e/ou a identificação dos compostos que tratam a osteoartrite através de um mecanismo baseado em LXR. Assim, a invenção fornece métodos (também aqui denominados como "ensaios de seleção") para identificar moduladores, isto é, os agonistas LXR, que têm um efeito estimulatório ou inibitório sobre, por exemplo, a expressão de ApoD e/ou atividade da agrecanase e/ou elaboração da citocina. Os compostos assim identifica-

dos podem ser usados no tratamento da osteoartrite como descritos aqui em outra parte.

Os compostos de teste podem ser obtidos, por exemplo, usando algumas das aproximações em uméricas na biblioteca de métodos combina-  
5 tórios conhecida na técnica, incluindo bibliotecas paralelas espaciais de fase sólida ou bibliotecas de fase líquida; biblioteca de métodos sintéticos que exigem a deconvolução; o método da biblioteca de um grânulo e um composto; e métodos da biblioteca sintéticos usando a seleção através da cromatografia de afinidade.

10 Os exemplos dos métodos para a síntese de bibliotecas moleculares podem ser encontrados em, por exemplo, DeWitt SH et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6909-13 (1993); Erb E et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422-26 (1994); Zuckermann RN et al., J. Med. Chem. 37:2678-85 (1994); Cho CY et al., Science 261:1303-05 (1993); Carrell et al., Angew.  
15 Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059 (1994); Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061 (1994); Gallop MA et al., J. Med. Chem. 37:1233-51 (1994).

As bibliotecas dos compostos podem estar presentes na solução (por exemplo, Houghten RA et al., Biotechniques 13:412-21 (1992)), ou em grânulos (Houghten RA et al., Nature 354:82-84 (1991)), chips (Fodor SA et  
20 al., Nature 364:555-56 (1993)), bactéria (U.S. Patent Nº 5,223,409), esporos (U.S. Patent Nº 5,223,409), plasmídeos (Cull MG et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-69 (1992)) ou em fagos (Scott JK & Smith GP, Science 249:386-90 (1990); Devlin JJ et al., Science 249:404-06 (1990); Cwirla SE et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-82 (1990); Felici F et al., J. Mol. Biol.  
25 222:301-10 (1991); U.S. Patent Nº 5,223,409.).

Um ensaio de triagem exemplar é um ensaio baseado em células no qual uma célula que expressa LXR é contatada com um composto de teste, e a habilidade do composto de teste de modular a expressão de ApoD e/ou a atividade da agreganase e/ou elaboração da citocina através de um  
30 mecanismo baseado em LXR. A determinação da habilidade do composto de teste em modular a expressão de ApoD e/ou a atividade da agreganase e/ou a elaboração citocina pode ser realizada pelo monitoramento, por e-

xemplo, dos níveis de DNA, mRNA, ou proteína, ou medindo os níveis de atividade de ApoD, agrecanase, e/ou de TNF $\alpha$ , todos por métodos conhecidos aos versados na técnica. A célula, por exemplo, pode ser de origem mamífera, por exemplo, humana.

5 Os moduladores novos identificados pelos ensaios de seleção descritos acima podem ser usados para tratamentos como aqui descritos.

### Exemplos

A presente invenção é definida mais adiante nos seguintes exemplos. Deve-se compreender que estes exemplos, embora indiquem modalidades preferidas da invenção, são dados de forma ilustrativa somente. A partir da discussão acima e dos exemplos, um versado na técnica pode verificar as características designadas desta invenção, e sem fugir do espírito e escopo desta, pode fazer várias alterações e modificações na invenção para adaptá-la a vários usos e condições.

#### 15 Exemplo 1

Para identificar os transcritos expressos tanto na cartilagem articular artrítica ou normal, as amostras de tecido foram obtidas de pacientes com artrite com substituição de joelho de estágio final e indivíduos amputados não-artríticos. A presença ou a ausência de artrite foram confirmadas pela histologia.

20 O Genoma Humano U95Av2 (HG-U95Av2) GeneChip® Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) foi usada para a perfilagem da expressão. O chip HG-U95Av2 contém sondas de oligonucleotídeo 25-mer que representam aproximadamente 12.000 sequências primariamente de comprimento completo (~16 pares de sonda/sequência) derivadas do genoma humano. Para cada sonda projetada para ser perfeitamente complementar a uma sequência-alvo, uma sonda parceira é gerada, que é idêntica exceto por uma não coincidência na base única em seu centro. Estes pares de sonda permitem a quantificação do sinal e a subtração do ruído não-específico.

30 O RNA foi extraído do tecido da cartilagem articular do indivíduo, convertido em cRNA biotinilado, e fragmentado de acordo com o protocolo de Affymetrix. Os cRNAs fragmentados foram diluídos em tampão 1x MES

que contém 100 µg/ml de DNA de esperma de arenque e 500 µg/ml de BSA acetilado e desnaturado por 5 minutos à 99°C seguido imediatamente por 5 minutos à 45°C. O material insolúvel foi removido das misturas hibridizadas através de uma breve centrifugação, e a mistura hibridizada foi adicionada a cada conjunto e incubada a 45°C por 16 horas com rotação contínua a 60 rpm. Após a incubação, a mistura de hibridização foi removida e os chips foram lavados extensivamente com 6 x SSPET e tingidos com solução de SAPE como descrito no protocolo de Affymetrix.

O valor bruto da intensidade fluorescente de cada transcrito foi medido em uma definição de 6 milímetros com um Hewlett-Packard Gene Array Scanner. O software GeneChip® 3.2 (Affymetrix), que usa um algoritmo para determinar se um gene está “presente” ou “ausente”, assim como os valores ou “diferenças médias” de intensidade de hibridização específica de cada gene no conjunto foi usado para avaliar os dados fluorescentes. A diferença média para cada gene foi normalizada para valores de frequência por referência às diferenças médias de 11 transcritos controle de abundância conhecida que foram colocados em cada mistura da hibridização de acordo com o procedimento de Hill AA et al, Science 290:809- 12 (2000). A frequência de cada gene foi calculada e representa um valor igual ao número total de transcritos individuais do gene por 10<sup>6</sup> de transcritos totais.

A figura 1A descreve os níveis do mRNA na cartilagem osteoartrítica severa (expressado como partes por milhão (ppm)) para 19 membros diferentes da superfamília de receptores nucleares hormonais (LXRα, LXRβ, Rev-erβα, Rev-erβ, GR, EAR2, COUP,TF-I, COUP TF-II, CAR, PXR, MR, SF-1, TR-2, TR-4, NOR-1, Nurr1, Nur77, SHP, FXR). O limite de detecção quantitativo mais baixo para estes estudos de chips de genes foi determinado em aproximadamente 5 ppm. Os dados mostrados na figura 1 fornecem evidência que LXRβ, Rev-erβα, e GR parecem ser expressados pela cartilagem articular ao nível de sensibilidade dos chips dos genes. Na figura 1B, os níveis da expressão dos seis membros da família dos receptores retinoides (Receptores de Ácido Retinoico (RARs) e Receptores de Retinoide X (RXRs)) são mostrados. Estes dados mostram que RXRα está expressado no tecido

da cartilagem articular a níveis que são facilmente detectáveis. RXR $\alpha$  é um coadjuvante heterodimérico de LXR e a unidade biologicamente ativa de ação do ligante LXR é o heterodímero LXR-RXR. Estes dados forneceram um ímpeto olhar para os efeitos funcionais da expressão de LXR na cartilagem articular.

### Exemplo 2

A figura 2A mostra a comparação de níveis de mRNA ApoD na cartilagem normal e na cartilagem obtida de pacientes com osteoartrite média e severa (expressos como partes por milhão (ppm)). O limite de detecção quantitativo mais baixo para estes estudos dos chips de gene foi determinado ser aproximadamente 5 ppm. Os dados mostrados na figura 2A fornecem a evidência que a expressão da mensagem de ApoD está reduzida dramaticamente na cartilagem osteoartrítica suave e severa quando comparada à cartilagem normal. A figura 2B mostra a comparação de níveis de TNF $\alpha$  mRNA na cartilagem normal e na cartilagem obtida de pacientes osteoartríticos médios e severos (expressos como partes por milhão (ppm)). O limite de detecção quantitativo mais baixo para estes estudos de chips de gene foi determinado ser aproximadamente 5 ppm. Os dados mostrados na figura 2B fornecem a evidência que a expressão de TNF $\alpha$  é induzida significativamente na cartilagem osteoartrítica suave e severa quando comparada à cartilagem normal.

### Exemplo 3

Os recentes explantes da cartilagem (~20 partes, um total de ~200 mg/cavidade) de um doador humano com OA (número 154, do National Disease Research Interchange) foram cultivados por 10 dias em 1 ml de DMEM/F12 contendo 1% Nutridoma® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Durante os 10 dias, os explantes foram expostos às citocinas (1 ng/ml IL1 $\beta$  mais 5 ng/ml Oncostatina M) com ou sem agonistas LXR (2  $\mu$ m GW3965, um agonista LXR relatado, ou 2  $\mu$ m da fórmula I abaixo, um agonista LXR).



horas mais tarde, o meio foi removido e o meio livre de soro fresco (1 ml) foi adicionado, seguido pelo tratamento do agonista T0901317 LXR (2 $\mu$ M). IL1 $\beta$ /Oncostatina M (10 ng/ml cada) foram adicionados 8 horas mais tarde. Os explantes foram cultivados então na presença ou na ausência do agonista T0901317 e IL1 $\beta$ /Oncostatina M de LXR por 20 horas adicionais. 180  $\mu$ l do meio de cultura associado com cada grupo de tratamento foi deglicosilado com condroitinase ABC, queratanase, queratanase II na presença de EDTA a 50 mM a 37°C por 3 horas. As amostras foram então concentradas e separadas em um gel de 4-12% SDS-PAGE. A análise por Western blot foi executada usando ou o anticorpo neoepítotope do camundongo BC3 (1:1500), ou anticorpo anti-AGEG do coelho (1:1000) como o anticorpo primário, e anticorpo IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase alcalina (1:5000) como o anticorpo secundário. A figura 4A mostra o resultado usando o anticorpo BC3, e a figura 4B mostra o resultado usando o anticorpo AGEG. No experimento usando a cartilagem do doador número 259, o tratamento da citocina induziu a liberação de ambos BC3 e AGEG que contêm fragmentos de agregano no meio de cultura. O tratamento com T0901317 bloqueou a indução da liberação de BC3 e AGEG por citocinas. No experimento com o doador número 261, fragmentos de agregano contendo BC3 e AGEG foram liberados no meio de cultura dos explantes de cartilagem não-tratada. O tratamento T0901317 reduziu a quantidade destes fragmentos no meio de cultura. A liberação do fragmento contendo AGEG dos explantes foi também induzida pelo tratamento com citocina, e bloqueada pelo tratamento T0901317.

#### 25 Exemplo 5

Os explantes novos da cartilagem (~20 partes, um total de ~200 mg/cavidade) de um doador humano com OA (fornecido pelo National Disease Research Interchange) foram cultivados por 21 dias em 1 ml de DMEM/F12 contendo 1% Nutridoma® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Durante os 21 dias, os explantes foram expostos à citocinas (10 ng/ml IL1  $\beta$  mais 10 ng/ml Oncostatina M) com ou sem agonistas LXR (2  $\mu$ M GW3965 ou fórmula I). A cada 2-3 dias o meio de cultura foi substituído com

citocinas frescas e agonistas LXR. As quantidades totais da prostaglandina E2 (PGE2) nas amostras do meio de cultura coletadas no dia 7, 14, 21 foram medidas usando um ensaio da EIA (Cayman).

5 A figura 5 mostra que ambos os agonistas LXR inibem fortemente a síntese da citocina PGE2-(IL1  $\beta$  /Oncostatina M) induzida em todos os 3 pontos de tempo. Os resultados da análise do perfilamento lipídico (Lipomics Inc.) mostra que as quantidades de duas formas da membrana fosfolipídicas onde a maioria do ácido araquidônico (AA) são reduzidos pela ativação de LXR, sugerindo que a diminuição de PGE2 total esteja mediada pelo menos  
10 em parte pelo índice total do AA reduzido na cartilagem OA. A expressão das enzimas envolvidas na síntese PGE2 pode também ser inibida pela atividade de LXR.

PGE2 é o principal pro-inflamatório prostanóide encontrado nas juntas com artrite reumatoide (RA) ou OA. PGE2 aumentada na cartilagem  
15 pode também desenvolver um papel nos danos estruturais mediados por inflamação que caracteriza doenças artríticas. Mais importante, PGE2 contribui a uma das características chaves da inflamação, hipersensibilidade da dor. Consequentemente, os agonistas LXR têm o grande potencial de ser a terapia de OA que aliviará a dor bloqueando a produção PGE2 em juntas  
20 com OA, assim como impedir a progressão da doença bloqueando a degradação da matriz da cartilagem.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento de um mamífero que sofre de osteoartrite compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade do mesmo uma quantidade de para modulação da expressão de gene responsável a LXR de um agonista LXR.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agonista de LXR é um oxisterol natural, um oxisterol sintético, um nonoxisterol sintético, ou um nonoxisterol natural.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o agonista LXR é 20(S) hidroxicolesterol, 22(R) hidroxicolesterol, 24(S) hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 24(S),25 epoxicolesterol, 27-hidroxicolesterol, N,N-dimetil-3 $\beta$ -hidroxicolanamida, N-(2,2,2-trifluoroetil)-N-{4-[2,2,2-trifluor-1-hidróxi-1-(trifluorometil)etil]fenil} benzeno sulfonamida, ácido [3-(3-(2-cloro-trifluorometilbenzil-2,2-difeniletilamino)propóxi) fenilacético], N-metil-N-[4-(2,2,2-trifluor-1-hidróxi-1-trifluorometil-1-etil)-fenil]-benzeno sulfonamida, 4,5 di-hidro-1-(3-(3-trifluorometil-7-propil-benzisoxazol-6-ilóxi)propil)-2,6-pirimidinediona, ácido 3-cloro-4-(3-(7-propil-3-trifluorometil-6-(4,5)-isoxazolil)propilítio)-fenil acético, dímero acetil-podocárpico, paxilina, desmosterol, ou estigmasterol.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o agonista LXR é N-(2,2,2-trifluoroetil)-N-[4-(2,2,2-trifluor-1-hidróxi-1-trifluorometil-1-etil)-fenil]-benzeno sulfonamida.

5. Método de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, em que o tratamento com o agonista LXR inibe a degradação da cartilagem e induz a regeneração da cartilagem.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o agonista LXR inibe a atividade da agreganase.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que o agonista LXR inibe a elaboração de citocinas pró-inflamatórias e/ou de mediadores inflamatórios em juntas osteoartíticas.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que o mediador inflamatório é a prostaglandina E2.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o tratamento com o agonista LXR fornece o alívio da dor nas juntas osteoartíticas.

5 10. Método de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, em que o gene responsivo LXR é apolipoproteína D.

11. Método de induzir expressão da apolipoproteína D em um mamífero que tem a cartilagem osteoartítica compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade eficaz de um agonista LXR.

10 12. Método de impedir a osteoartrite que compreende:

(a) determinar um nível de expressão de linha de base de apolipoproteína D na cartilagem normal de um sujeito; e

(b) manter o nível de expressão de linha de base de apolipoproteína D na cartilagem do sujeito através do tratamento com um agonista LXR.  
15

13. Método para o tratamento de um mamífero que sofre da osteoartrite, que compreende administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade de um agonista LXR para inibição da atividade da agreganase.

20 14. Método de inibir a atividade da agreganase em um mamífero que tem a cartilagem osteoartítica compreendendo administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade eficaz de um agonista LXR.

25 15. Método para o tratamento de um mamífero que sofre da osteoartrite que compreende administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade eficaz de um agonista LXR para inibir a elaboração de citocinas e lipídeos pró-inflamatórios em juntas osteoartíticas.

30 16. Método para o tratamento de um mamífero que sofre da osteoartrite que compreende administrar ao mamífero em caso de necessidade uma quantidade eficaz de um agonista LXR para aliviar a dor em juntas osteoartíticas.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o agonista LXR inibe a expressão de TNF $\alpha$ .

18. Método para detectar um fenótipo osteoartrítico em um sujeito compreendendo:

(a) determinar um nível de expressão de linha de base de apolipoproteína D na cartilagem normal;

5 (b) obter uma amostra da cartilagem de um sujeito suspeito de estar com a osteoartrite; e

(c) detectar o nível de expressão de apolipoproteína D na amostra; em que uma quantidade mais baixa de expressão de apolipoproteína D na amostra comparada à expressão da linha de base da apolipoproteína D é  
10 indicativa de osteoartrite.

19. Método para identificar um ligante LXR capaz de reduzir um efeito osteoartrítico na cartilagem compreendendo:

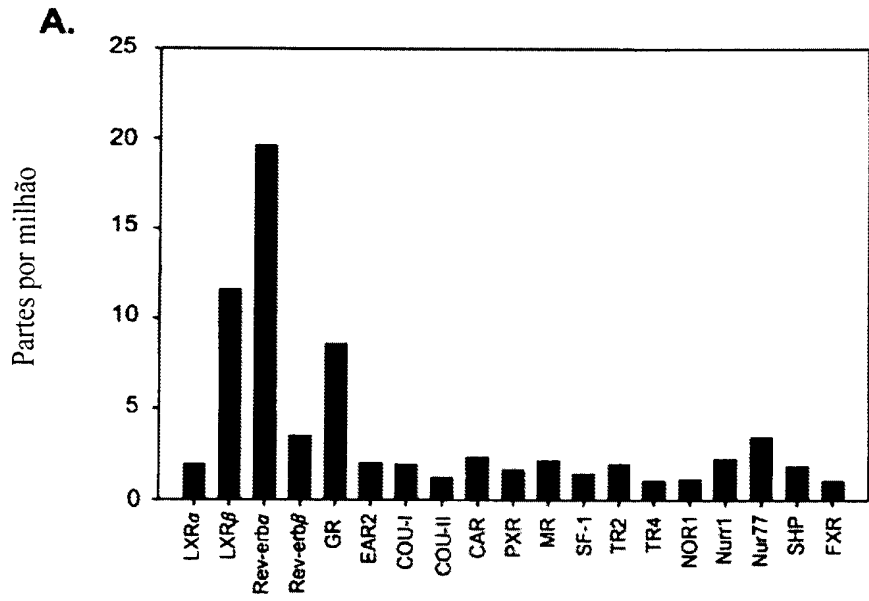
(a) fornecer uma amostra que contém um LXR;

(b) contatar a amostra com um composto de teste; e

15 (c) determinar se o composto de teste induz a expressão da apolipoproteína D, inibe a atividade do agreganase, inibe a elaboração de citocinas pró-inflamatórias, ou uma combinação destas.

20. Uso de um agonista de LXR na produção de um medicamento para o tratamento ou a prevenção da osteoartrite.

FIG.1



**B.**

Receptores Retinóides

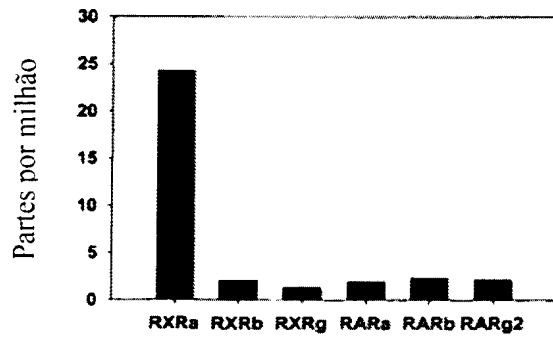
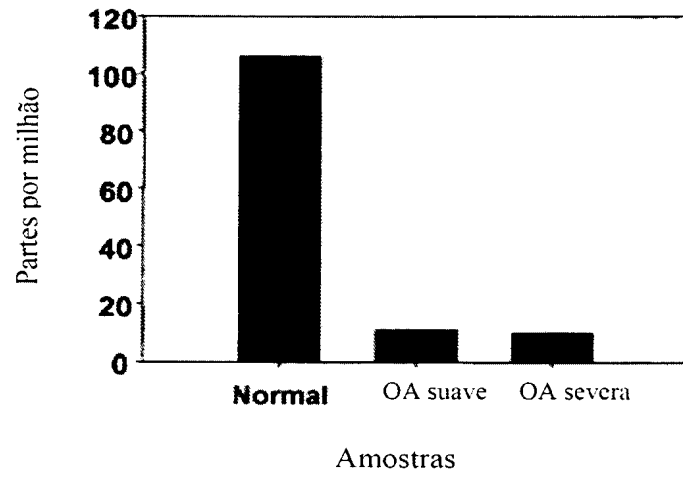


FIG. 2

**A.**

Expressão de ApoD em Amostras normais e OA



**B.**

Expressão TNF $\alpha$  em Amostras normais e OA

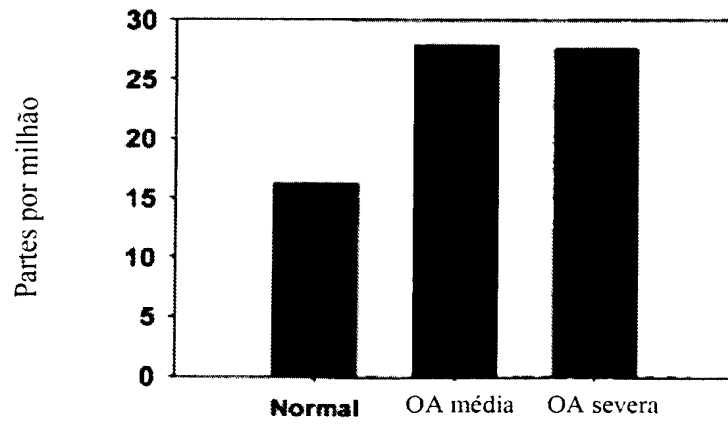


FIG. 3

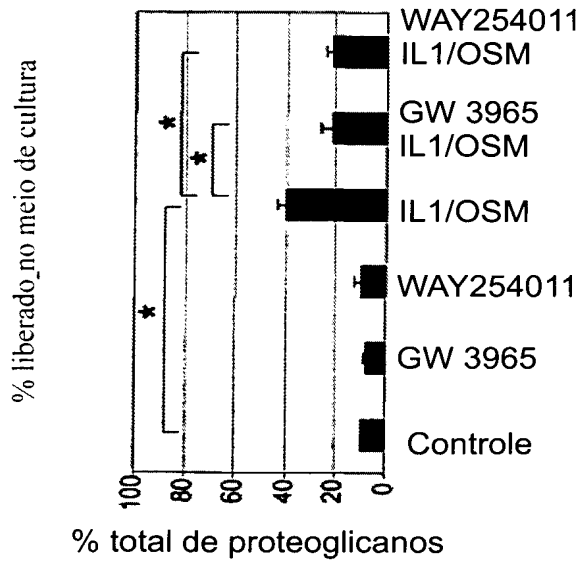
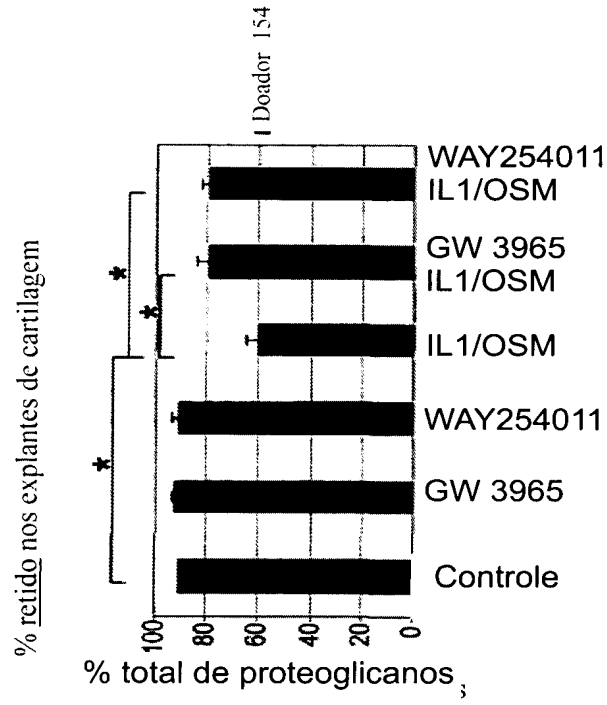
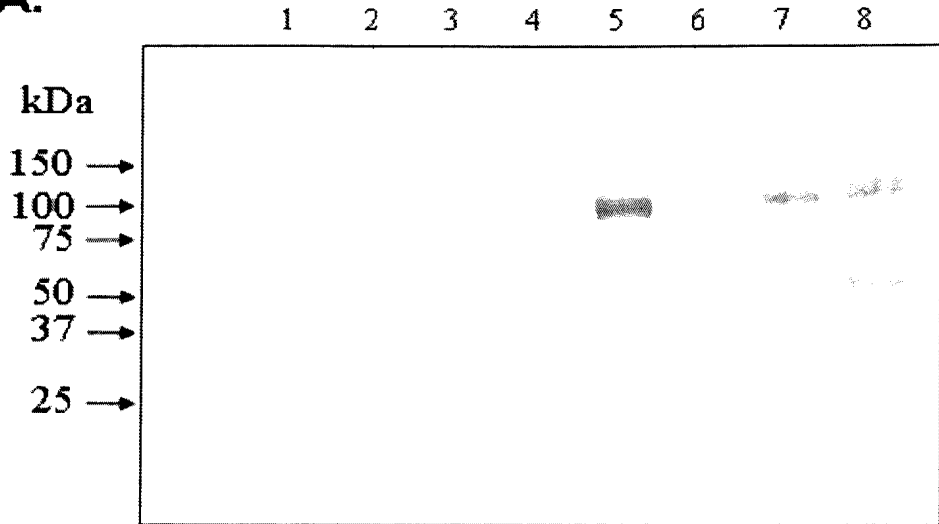


FIG. 4

**A.**



**B.**

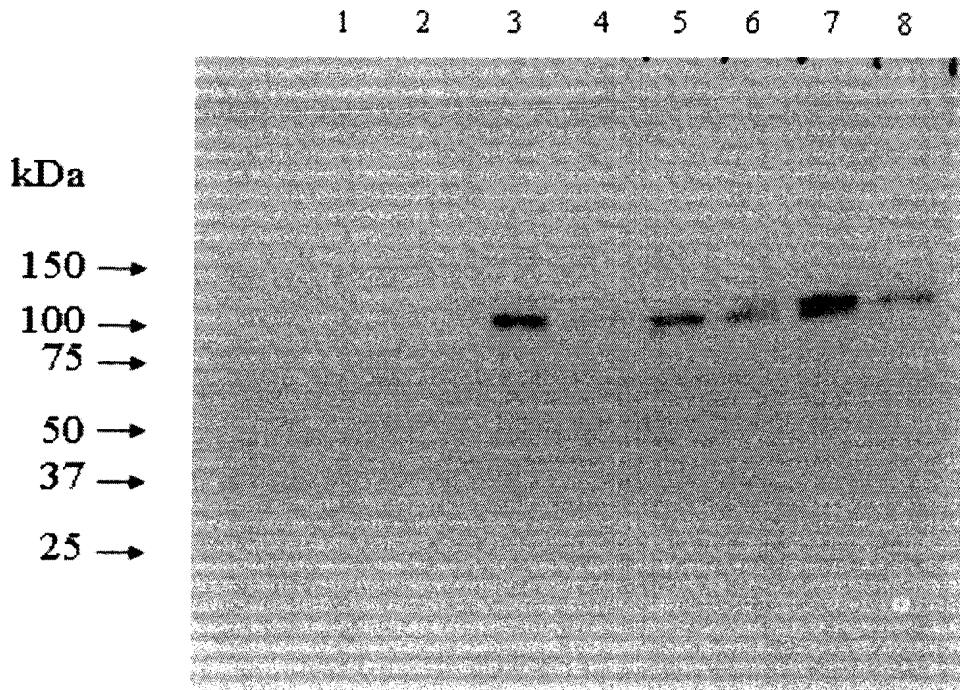
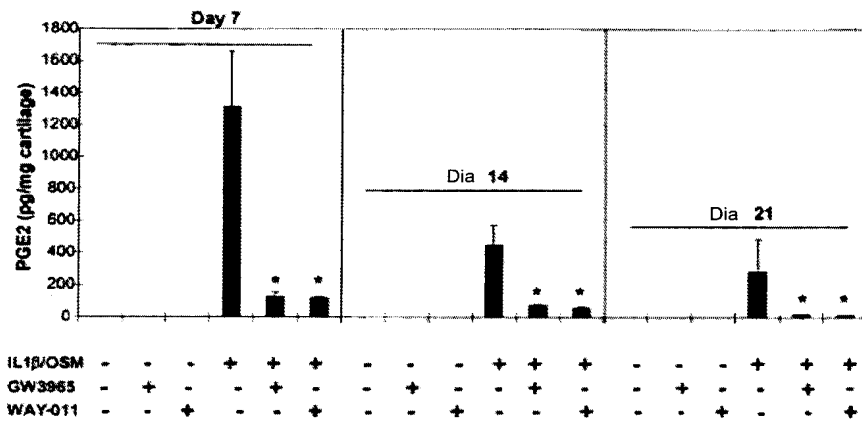
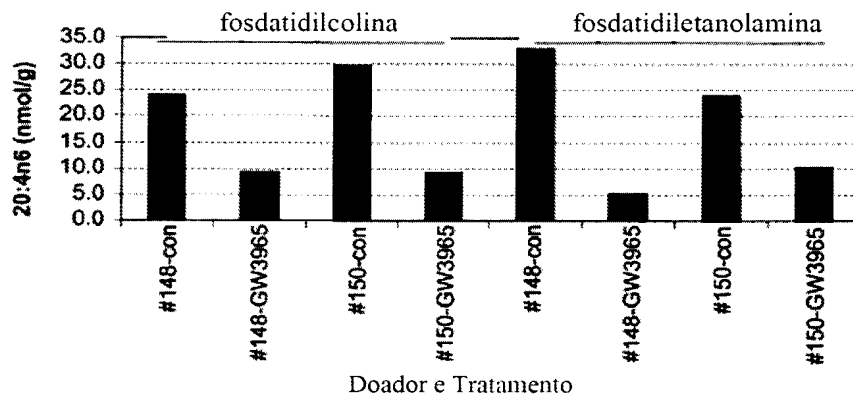


FIG. 5

A.



B.



## RESUMO

Patente de Invenção: "**USO DE AGONISTAS DE LXR PARA O TRATAMENTO DE OSTEOARTRITE**".

5 A presente invenção refere-se a métodos de prevenção e tratamento de osteoartrite através do uso de antagonistas de LXR.