



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 929**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07704693 .6**
96 Fecha de presentación : **21.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1987066**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **Método para tratar enfermedades desmielinizantes.**

30 Prioridad: **22.02.2006 EP 06110301**
18.04.2006 US 792795 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73 Titular/es: **University of Zürich**
Office Vice President of Research
Rámistrasse 71
8006 Zürich, CH

72 Inventor/es: **Becher, Burkhard**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 929 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

La presente invención se refiere a un nuevo tratamiento terapéutico o profiláctico en sujetos humanos. La presente invención surge en parte del descubrimiento de que los antagonistas de IL-18R α son eficaces *in vivo* para tratar enfermedades.

5 De acuerdo con esto, la invención proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de enfermedades desmielinizantes (tales como la esclerosis múltiple) en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-18R α . La invención también se refiere al uso de un antagonista de IL-18R α en la fabricación de un medicamento
10 para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes (tales como la esclerosis múltiple).

ANTECEDENTES

Las enfermedades desmielinizantes son un grupo de patologías que implican anomalías en las capas de mielina del sistema nervioso. Muchos trastornos metabólicos congénitos afectan al desarrollo de las capas de mielina, principalmente en el SNC, y la desmielinización es una característica de muchos trastornos neurológicos.
15

La enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica más conocida del sistema nervioso central en humanos es la esclerosis múltiple. El inicio de la esclerosis múltiple (EM) sucede típicamente de los 20 a los 40 años. A las mujeres les afecta aproximadamente dos veces más a menudo que a los hombres. A lo largo del tiempo, la EM puede originar la acumulación de
20 diversas discapacidades neurológicas. Se piensa que la discapacidad clínica en la EM es la consecuencia de un daño inflamatorio repetido que resulta en la consecuente pérdida de mielina y axones, lo que conduce a una atrofia de los tejidos.

La EM se manifiesta con síntomas físicos (recaídas y progreso en la discapacidad), inflamación del sistema nervioso central (SNC), atrofia cerebral y deficiencia cognitiva. Los
25 síntomas que se presentan incluyen déficits focales sensoriales, debilidad focal, problemas visuales, desequilibrio y fatiga. Pueden aparecer disfunción sexual y disfunción del esfínter. Aproximadamente la mitad de los pacientes con EM pueden experimentar deficiencia cognitiva o depresión.

La EM está considerada en la actualidad como una enfermedad multi-fásica y en la que
30 aparecen periodos de latencia clínica (remisiones) entre los brotes. Las remisiones varían en su extensión y pueden durar algunos años pero frecuentemente no son permanentes.

Se separan en cuatro los cursos de la enfermedad: esclerosis múltiple con recaídas y remisiones (RR), progresiva secundaria (SP), progresiva primaria (PP) y con recaída progresiva (RP). Más del 80% de los pacientes con EM muestran inicialmente un curso RR con brote
35 clínico de síntomas neurológicos, seguido de una recuperación que puede ser completa o no (*Lublin and Reingold, Neurology, 1996, 46:907-911*).

Durante la EM-RR, la acumulación de discapacidad origina una recuperación incompleta de las recaídas. Aproximadamente, la mitad de los pacientes con EM-RR cambian a un curso progresivo, denominado EM-SP, 10 años después del inicio de la enfermedad.
40 Durante la fase PS, el empeoramiento de la discapacidad origina la acumulación de síntomas residuales después del brote, aunque también de la continua progresión entre los brotes (*Lublin and Reingold, más arriba*). El 10% de los pacientes con EM tienen EM-PP que está caracterizada por la progresión continua de los síntomas desde el inicio de la enfermedad. Menos del 5% de los pacientes tienen EM-PR y se considera a menudo que tienen la misma
45 prognosis que la EM-PP. Se piensa que pueden estar implicados diferentes mecanismos patógenos en diferentes sub-grupos de pacientes y tener un amplio rango de implicaciones para la clasificación de la enfermedad (*Lassmann et al, 2001, Trends Mol. Med., 7, 115-121; Lucchinetti et al, Curr. Opin. Neurol., 2001, 14, 259-269*).

El inicio de la EM se define por la aparición de los primeros síntomas neurológicos de la disfunción del SNC. Los avances en el análisis del fluido cerebroespinal (FCE) y la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) han simplificado el procedimiento diagnóstico y
50 facilitado el diagnóstico precoz (*Noseworthy et al, The New England Journal de Medicine, 2000, 343, 13, 938-952*). El Panel Internacional sobre el Diagnóstico de la EM se focalizó en la

revisión de criterios que facilitaran el diagnóstico de la EM y que se incluyera la MRI con los métodos de diagnóstico clínico y para-clínico (*Mc Donald et al, 2001, Ann. Neurol, 50:121-127*).

Los documentos WO 2006/009114 y WO 02/32374 describen un anticuerpo contra IL-18R α , y consideran el tratamiento de la enfermedad desmielinizante con estos anticuerpos, entre otras enfermedades. Los documentos WO 03/008452 y B. Sergi et al, "Interleukin 18 receptor", *Journal of Biological regulators and homeostatic agents* 2004, 18: 35-61 presentan resultados contradictorios que no incitan a continuar con el tratamiento de enfermedades desmielinizantes con anticuerpos contra IL-18R α .

Los tratamientos actualmente disponibles para el tratamiento de la esclerosis múltiple actúan esencialmente contra los síntomas de la enfermedad. Consecuentemente, hay una gran necesidad de terapias alternativas que proporcionen mejores beneficios clínicos a los pacientes.

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo tratamiento terapéutico o profiláctico en sujetos humanos. La presente invención surge en parte del descubrimiento de que los antagonistas de IL-18R α son eficaces *in vivo* para tratar enfermedades.

De acuerdo con esto, la invención proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de enfermedades desmielinizantes en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-18R α . En un aspecto particular, la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple. La invención también se refiere al uso de un antagonista de IL-18R α en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante. En un aspecto particular, la enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple.

En un aspecto particular, la invención se basa en el método o el uso que se define anteriormente en el que el sujeto está afectado por esclerosis múltiple con recaídas y remisiones (RR), esclerosis múltiple progresiva secundaria (PS), esclerosis múltiple progresiva primaria (PP) o esclerosis múltiple con recaída progresiva (RP).

En un aspecto particular, el antagonista es un anticuerpo que se une selectivamente a IL18-R α , en particular al dominio extra-celular de IL18-R α . Más específicamente, el anticuerpo se une selectivamente al polipéptido de SEQ ID NO: 2, e incluso más específicamente, el anticuerpo se une selectivamente a los residuos 1-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos de 330 a 350 de SEQ ID NO: 2 o los residuos de 351 a 541 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto particular, el anticuerpo se une selectivamente a los residuos 19-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2. En otro aspecto particular, el anticuerpo se une selectivamente a los residuos 19-132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2.

Otro objeto de la presente invención se basa en el método o el uso que se define anteriormente en el que el anticuerpo se une selectivamente a un epítipo localizado en el dominio extracelular de IL-18R α humano. En un aspecto particular, el epítipo está localizado dentro de los aminoácidos 19 a 329 de SEQ ID NO: 2, o dentro de los residuos de aminoácidos 19 a 219 de SEQ ID NO: 2, o dentro de los residuos de aminoácidos 122 a 329 de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto particular, el epítipo está localizado dentro de los aminoácidos 19-132 de SEQ ID N: 2, o 122-219 de SEQ ID N: 2, o 213-329 de SEQ ID N: 2.

Otro objeto de esta invención se basa en el método o el uso que se define anteriormente en el que el anticuerpo tiene un dominio de unión de antígeno que comprende CDR con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: SEC ID NO: 5, de la SEQ ID NO: 6, de la SEQ ID NO: 7, de la SEQ ID NO: 8, de la SEQ ID NO: 9 y la SEC ID NO: 10. En un aspecto particular, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Más específicamente, el anticuerpo comprende un dominio VH que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio VL que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Todavía más

específicamente, el anticuerpo comprende una IgG1 humana como región pesada constante de Ig; una región ligera constante de Ig seleccionada entre el grupo que consiste en un dominio constante de kappa de Ig humana y un dominio constante de lambda de Ig humana; una región ligera variable de Ig con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y una región ligera variable de Ig con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En un aspecto muy específico, la presente invención se basa en el método o el uso que se define anteriormente en el que el anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en el clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal 70614, clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal 70625, clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal B-E43 y clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal H44.

La invención se basa además en el método o el uso que se define anteriormente en el que el anticuerpo es un anticuerpo que compite con AM, clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal 70614, clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal 70625, clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal B-E43 y/o clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal H44 para unirse al IL-18R α humano.

La invención también se refiere al método o el uso que se define anteriormente en el que el anticuerpo es obtenible por el procedimiento que comprende la etapa de:

- inmunizar un animal huésped con un agente inmunizante que comprende los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos 19-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2, o los residuos 19-132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2.

- fusionar los linfocitos producidos por dicho animal huésped con una línea celular inmortalizada para formar células de hibridoma,

- seleccionar clones de células de hibridoma que producen anticuerpos dirigidos contra el péptido inmunizante,

- analizar la actividad de los anticuerpos producidos por los diferentes clones de células de hibridoma en un modelo animal de EAE y seleccionar un anticuerpo que inhiba la progresión de la EAE en dicho modelo animal,

- producir el anticuerpo monoclonal secretado.

Más específicamente, el agente inmunizante puede consistir en los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos 19-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2, o los residuos 19-132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2 o su proteína de fusión.

La invención se basa además en el método o el uso que se define anteriormente en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o su fragmento.

La invención se basa además en el método o el uso que se define anteriormente en el que el antagonista inhibe la actividad de IL18R α en células que presentan el antígeno. En un aspecto particular, las células que presentan el antígeno se seleccionan entre el grupo que consiste en fagocitos monomorfonucleados, fagocitos polimorfonucleados, células dendríticas y linfocitos naturales.

La invención se basa además en el método o el uso que se define anteriormente en el que la inhibición de IL-18R α conduce a la disminución de linfocitos T coadyuvantes productores de IL-17.

La invención también se refiere al método o el uso que se define anteriormente en el que el antagonista de IL-18R α se administra junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir la EM. En un aspecto particular, el antagonista de IL-18R α se administra junto con corticosteroides, fármacos inmunodepresivos, agentes neuro-protectores, fármacos inmunomoduladores o interferones.

Otros aspectos de esta invención incluyen un producto que comprende un antagonista

de IL-18R α y un corticosteroide, un fármaco inmunodepresivo, un agente neuroprotector, un fármaco inmunomodulador o un interferón como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de la EM en un mamífero, preferiblemente un sujeto humano. Un antagonista de IL-18R α para uso como medicamento. Y un anticuerpo que se une selectivamente a IL18-R α , en particular al dominio extra-celular de IL18-R α , para uso como medicamento.

LEYENDA DE LAS FIGURAS

Figura 1: Se requiere la señalización de IL-18R, independiente de IL-18, para la inducción de EAE. Se inmunizaron activamente ratones con MOG₃₅₋₅₅ en CFA y se les inyectó la toxina pertussis i.p. los días 0 y 2. (a) progresión de EAE en ratones p35 \cdot \times IL-18 \cdot transgénicos dobles y wt. Se muestra uno representativo de 2 experimentos ($n = 5$ ratones/grupo).

(b) progresión de EAE en ratones wt, IL-18 \cdot y IL-18R α \cdot . Se muestra uno representativo de 3 experimentos ($n = 5$ ratones/grupo).

Figura 2: Se requiere la señalización de IL-18R, independiente de IL-18, para la inducción de EAE. Se inmunizaron activamente ratones con MOG₃₅₋₅₅ en CFA y se les inyectó la toxina pertussis i.p. los días 0 y 2. (a) Tinciones H&E, (b) LFB, (c) CD3, (d) MAC3 y (e) B220 de médulas espinales fijadas con PFA de ratones wt (valoración 2), IL-18 \cdot (valoración 2), IL-18R α \cdot (valoración 0) EAE y un ratón sin tratamiento que muestra infiltración respecto a la valoración de la enfermedad.

Figura 3: Las células IL-18 \cdot LN no producen IL-18 de acuerdo con su genotipo propuesto. ELISA que evalúa la secreción de IL-18 por células de wt sin tratamiento y IL-18 \cdot LN, estimuladas durante 16 horas con las mezclas indicadas de 1 μ g/ml LPS, 100 Unidades/ml de IFN γ , 5 μ g/ml de Concanavalina A (ConA) y 2,5 ng/ml de IL-12.

Figura 4: Se requieren IL-18 y IL-18R α para la activación de linfocitos T estimulados con mitógeno pero no para el desarrollo de Th1, (a) ELISA que evalúa la secreción de IFN γ por células wt sin tratamiento, IL-18 \cdot y IL-18R α \cdot LN, estimuladas durante 16 horas con 5 μ g/ml de Concanavalina A (ConA).

(b,c) Se inmunizaron ratones con 200 μ g KLH y 7 días después se aislaron LN y se estimularon de nuevo.

(b) ELISA de IFN γ en sobrenadante de ratones inmunizados con KLH re-estimulados dos veces con 50 μ g/ml de KLH o 5 μ g/ml de ConA durante 48 horas.

(c) Ensayo de proliferación de células LN de ratones inmunizados con KLH re-estimulados tres veces con 50 μ g/ml de KLH, 5 μ g/ml de ConA o medio durante 48 horas. Se añadió 3 H-timidina al cultivo 24 horas antes de medir la proliferación en cuentas por minuto (CPM).

(d) Se generaron CD derivadas de ME de ratones wt, IL-18 \cdot y IL18R \cdot , madurados con LPS y posteriormente pulsados con 1 μ g/ml de péptido SMARTA, p11. Se obtuvieron células CD4 $^+$ T p11-específicas de ratones SMARTA-Tg sin tratamiento y se cultivaron conjuntamente con las CD péptido-pulsadas, se irradiaron (2000 rads) durante 72h cuando se evaluó la proliferación por la incorporación de timidina en cuentas por minuto (CPM).

Figura 5: Un ligando de unión de IL-18R α alternativo induce la EAE en ratones IL-18 \cdot . (a) Se trataron ratones IL-18 \cdot con 450 μ g de anticuerpo anti-IL-18R α (cuadrado blanco) o IgG control (rombo negro) 1 día antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅ y con 300 μ g de anticuerpo cada 3 días después de esto. Se muestra uno representativo de 2 experimentos ($n = 5$ ratones/grupo).

(b) Se inmunizaron ratones IL-18 \cdot ($n = 6$ ratones/grupo) con MOG₃₅₋₅₅ y se trataron con 300 μ g de anticuerpo anti-IL-18R α (cuadrado blanco) o IgG control (rombo negro) en el primer signo de enfermedad.

Figura 6: Se activaron células CD4 $^+$ T IL-18R \cdot similar a las células wt y CD4 $^+$ T IL-18 \cdot . FACS de esplenocitos derivados de ratones wt inmunizados con KLH, IL-18 \cdot y IL-18R \cdot , re-estimulados *in vitro* durante 2 días con 50 μ g/ml de KLH o medio. Después de 2 días, se tñieron esplenocitos con CD4-FITC y (a) CD5-APC, (b) CD62L-bio-SA-PerCP-Cy5.5 o (c)

CD44-PE.

Figura 7: Las células CD4₊ T IL-18R α _{-/-} se infiltran en el SNC en el mismo grado que las células CD4₊ T de wt y IL-18_{-/-} antes del inicio de la enfermedad, los ratones wt, IL-18_{-/-} y IL-18R α _{-/-} se inmunizaron activamente con MOG₃₅₋₅₅ y el día 7 después de la inmunización los ratones se sometieron a perfusión con PBS y el SNC se aisló. Se realizó un gradiente para aislar células de microglia y la infiltración de células inflamatorias en esta porción se evaluó por citometría de flujo. Las células se tiñeron con CD45-PerCP y CD4-APC. Las células CD4₊ T IL-18R α _{-/-} invaden el SNC y lo hacen así igual que las células CD4₊ T de wt y IL-18_{-/-} el día 7 después de la inmunización.

Figura 8: La lesión de IL-18R α afecta a la producción de IL-17 y al desarrollo de células T_HIL-17. Los ratones Wt, IL-18_{-/-} y IL-18R α _{-/-} se inmunizaron con KLH y 7 días después, se aislaron los esplenocitos y se estimularon de nuevo con 50 μ g/ml de KLH. (a) Comparación de PCR a tiempo real de la expresión de mRNA de IL-17 por linfocitos de wt, IL-18_{-/-} y IL-18R α _{-/-} después de una re-estimulación de 2 días *in vitro* con KLH. Los resultados se normalizan frente a la expresión de β -actina y se analizan dos veces, (b) ELISA de expresión de proteína de IL-17 por linfocitos re-estimulados durante 2 días con KLH *in vitro* dos veces. Los datos combinan al menos 2 ratones por grupo.

Figura 9: La ausencia de IL-18R α no lesiona a las células T o células B. Se generaron ratones ME-quiméricos transfiriendo 12-25 $\times 10^6$ ME-células en ratones wt letalmente irradiados. 6 semanas más tarde, se inmunizaron activamente con péptido MOG₃₅₋₅₅ ratones quiméricos de médula espinal reconstituida de IL-18R α _{-/-} \rightarrow wt (triángulo gris), IL-18R α _{-/-} + RAG α _{-/-} \rightarrow wt (cuadrado blanco) y wt \rightarrow wt (rombo negro) y se evaluó la valoración clínica. La presencia de IL-18R α sobre células no T y ni B derivadas de la médula espinal de RAG α _{-/-} rescató la susceptibilidad de ratones IL-18R α _{-/-} \rightarrow wt frente a EAE.

Figura 10: Los ratones IL-18R α _{-/-} son resistentes frente a la transferencia pasiva de EAE. Se generaron linfocitos reactivos de MOG inmunizando activamente ratones wt, aislando esplenocitos y células LN después de 11 días y re-estimulándolos durante 4 días *in vitro* con 20 μ g/ml de MOG₃₅₋₅₅ y 2,5 ng/ml de IL-12. La EAE se indujo en ratones receptores por la transferencia adoptiva de 20-30 $\times 10^6$ linfocitos reactivos de MOG en ratones IL-18R α _{-/-} (triángulo gris) y wt (rombo negro). Se muestra uno representativo de 2 experimentos (n = 5 ratones/grupo).

Figura 11: El tratamiento inmunológico con anti-IL-18R α no altera la composición de células inmunes periféricas. Se trataron ratones IL-18_{-/-} con 300 μ g de anticuerpo anti-IL-18R α o IgG control 1 día antes de la inmunización con MOG₃₅₋₅₅. 7 días después, se aislaron los bazo, se homogenizaron y la composición de las células inmunes se evaluó por citometría de flujo. Las células se tiñeron para CD8-FITC, CD4-APC, NK1.1-bio-SA-PerCP y B220-PE o CD11b-FITC, CD11c-APC y GR1-bio-SA-PerCP. No hay diferencia en la composición de células inmunes en ratones anti-IL-18R α tratados con anticuerpo IL-18_{-/-}. Se muestra un FACS representativo de 2 ratones/grupo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que el tratamiento de animales con agentes que antagonizan IL-18R α reduce los síntomas en un modelo animal para EM. De acuerdo con esto, la invención proporciona métodos para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de enfermedades desmielinizantes (tales como la EM) en un sujeto humano administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-18R α al sujeto.

El receptor de IL-18 se ha descrito como un heterodímero que consiste en una subunidad de IL-18R α de unión de ligando (también denominada IL-1R ρ o IL-1 R5 en la bibliografía) y una señalización corriente abajo de la subunidad IL-18R β de señalización de IL-18R, como el de la ruta de TLR, activa IRAK4 y MyD88. IL-18R α se expresa en linfocitos y se ha encontrado más recientemente que se expresa en células accesorias (Kaser, A. *et al.* Blood 103, 648-655 (2004), Tomura, M. *et al.* Immunol. 160, 3759-3765 (1998), Xu, D. *et al.* J. Exp. Med. 188, 1485-1492 (1998), Yoshimoto, T. *et al.* J. Immunol. 161, 3400-3407 (1998)).

Aunque se ha establecido que IL-18 puede unirse al complejo IL-18R, su afinidad frente a IL-18R α solo es solamente débil (Boraschi, D. et al. Eur. Cytokine Netw. 9, 205-212 (1998), Torigoe, K. et al. J. Biol. Chem. 272, 25737-25742 (1997)). IL-18 participa con IL-12 en estimular la producción de IFN- γ por células T y puede estimular independientemente la actividad citotóxica de las células NK. IL-18 y IL-12 actúan sinérgicamente para polarizar células T hacia una respuesta de citoquina de T_H1, que se pensaba que era un pre-requisito de la encefalitogenicidad.

Se ha descrito que los ratones IL-18 $^{-/-}$ son resistentes a la EAE y se creía que la insuficiente activación de las células NK en ratones IL-18 $^{-/-}$ era la causa de la incapacidad de generar una respuesta inmune encefalitogénica (Shi, F.D., et al., J. Immunol. 165, 3099-3104 (2000)). Sin embargo, la función propuesta de IL-18 en EAE causa un dilema dada la clara actividad protectora de IL-12 (Cua, D.J. et al. Nature 421, 744-748 (2003), Becher, B., et al., J. Clin. Invest 110, 493-497 (2002)).

Los inventores han demostrado ahora que, en contraste con los anteriores datos publicados, IL-18 no ejerce un visible efecto patogénico en EAE según se deduce de la susceptibilidad de los ratones IL-18 $^{-/-}$ frente a EAE. Sin embargo, la delección de su receptor (IL-18R α) propuesto causa una completa resistencia frente a la inducción de EAE, sugiriendo la presencia de un ligando alternativo (IL-18RL) con propiedades encefalitogénicas. Como la afinidad de IL-18 frente a IL-18R α es bastante baja y requiere la heterotrimerización con IL-18R β para una mayor afinidad, la posibilidad de que haya otro ligando con mayor afinidad para IL-18R α es muy alta. Hay varios receptores poco frecuentes dentro de la superfamilia de IL-1R y dado el hecho de que estas subunidades del receptor forman heterodímeros con las otras, lo más probable es que IL-18R α no sólo tenga diferentes parejas de unión, sino que también diferentes ligandos.

Los inventores han demostrado en este documento la potencia de este supuesto ligando atenuando significativamente el desarrollo de la enfermedad en ratones IL-18 $^{-/-}$ usando anticuerpos anti-IL-18R α . Dado que el ligando de IL-18R α aceptado, IL-18, no estaba presente en estos ratones y que sus constituyentes celulares no estaban afectados por el hecho de inyectar los anticuerpos, estos resultados proporcionan pruebas sustanciales de la existencia de dicho otro ligando de IL-18R α .

A pesar de la importancia de las células T durante la EAE, los inventores han demostrado en este documento que la delección de IL-18R α no afecta al cebado de las células T con respecto a la expansión y polarización de Th1. De forma alternativa, tanto IL-18 como IL-18R α ambos son requeridos para que haya una activación de células T eficiente cuando se estimula con el mitógeno ConA, lo que coincide con el hecho de que los ratones IL-18 $^{-/-}$ tienen un defecto en la estimulación de la secreción de IFN γ , como se observa en diversos modelos infecciosos bacterianos y virales. De acuerdo con la falta de afectación al nivel de la activación de células T, los inventores demuestran en este documento que la lesión de IL-18R α no afecta a las funciones activadoras de las Células que Presentan el Antígeno (CPA) ya que las células TcR Tg T proliferaron en la misma cantidad cuando se cultivaron con Células Dendríticas (CD) de wt (tipo silvestre), IL-18 $^{-/-}$ o IL-18R α $^{-/-}$.

En contraste con la ausencia de células inflamatorias en el SNC en el punto final de EAE, los inventores podrían detectar una infiltración de células T CD4 $^{+}$ comparable en el SNC de IL-18R α $^{-/-}$ antes del inicio de la enfermedad. También se infiltraron en el SNC otras células inflamatorias en la misma cantidad que en los ratones wt y IL-18 $^{-/-}$. Por lo tanto, la deficiencia de IL-18R α no afecta a la invasión de células inmunes en el SNC aunque debe afectar a su capacidad de persistir. De forma sorprendente, la presencia de infiltrados inflamatorios en el SNC de IL-18R α $^{-/-}$, sin susceptibilidad de EAE concomitante, imita la respuesta que aparece en los ratones IL-23 $^{-/-}$.

Los inventores analizan la producción de IL-17 por linfocitos recuerdo de KLH de IL-18R α $^{-/-}$ y demuestra que de hecho hay una disminución significativa en la producción de IL-17 a nivel de tanto del ARN como proteico. Por lo tanto, la resistencia de los ratones IL-18R α $^{-/-}$ frente a EAE podría explicarse como consecuencia de un insuficiente desarrollo de T_HIL-17.

Parecía probablemente que la falta de células T_HIL-17 causaba la ausencia de la

expresión de IL-18R α en esta subpoblación de células T. Este no fue el caso, sin embargo, ya que la generación de quimeras de ME demostró que sólo en presencia de células de ME RAG $_{-/-}$ podía ser recuperada la susceptibilidad de ratones IL-18R $\alpha_{-/-}$ (RAG $_{-/-}$ + IL-18R $\alpha^{-/-}$ > wt) frente a la EAE. Por otra parte, los ratones IL-18R $\alpha_{-/-}$ > wt fueron resistentes a la inducción de la enfermedad. Por lo tanto, se requiere la presencia de IL-18R α en los leucocitos no linfocíticos y no se localiza directamente en células pre-T_HIL-17. Además, la importancia de IL-18R α en una célula accesoria fue acentuada en un experimento de transferencia adoptiva por el que células T de wt encefalitogénicas no pudieron inducir la EAE en ratones IL-18R $\alpha_{-/-}$.

En resumen, los inventores muestran pruebas que refutan la hipótesis de T_H1 de EM y EAE demostrando una función no patogénica para IL-18 en la EAE. Por el contrario, sin embargo, el denominado IL-18R α es crítico para el desarrollo de la EAE implicando así la presencia de un ligando de unión de IL-18R α alternativo, lo que los inventores pudieron confirmar tratando a ratones IL-18 $_{-/-}$ con anticuerpos anti-IL-18R α disminuyendo con esto la severidad de la EAE. De forma alternativa, los inventores demuestran que la señalización de IL-18R α es crucial para el desarrollo de células T_HIL-17 encefalitogénicas, lo que explica por esto la resistencia de los ratones IL-18R $\alpha_{-/-}$ frente a la EAE MOG₃₅₋₅₅-inducida.

Fundamental, en parte, para la invención son los resultados descritos en este documento más arriba y en los ejemplos de la presente solicitud. Como se explica en este documento, los inventores de la presente invención han descubierto que los antagonistas de IL-18R α son eficaces *in vivo* para tratar enfermedades. Específicamente se encontró que un anticuerpo, que se une al dominio extracelular de IL-18R α , era útil en la prevención de la EM inducida experimentalmente en un modelo de ratón de esta enfermedad. Además, el antagonista de IL-18R α también inhibió la progresión de una enfermedad previamente establecida en el mismo modelo animal. Por esto, estos datos *in vivo* indican que la inhibición de IL-18R α es eficaz para tratar la EM. Cualquier método que neutralice la actividad de IL-18R α o inhiba la expresión del gen de IL-18R α (tanto su transcripción como su traducción) puede usarse para reducir los síntomas de la EM.

De acuerdo con esto, la invención proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad desmielinizante (en particular la EM), en un sujeto, en particular un sujeto humano, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-18R α . Como se usa en este documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto significa la mínima cantidad del compuesto que es eficaz para tratar, mejorar o prevenir la enfermedad desmielinizante (en particular la EM) o sus síntomas. La invención también se refiere al uso de un antagonista de IL-18R α en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante (en particular la EM).

En algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad que se trata es EM con recaídas y remisiones (RR), EM progresiva secundaria (PS), EM progresiva primaria (PP) o EM con recaída progresiva (RP).

La expresión "antagonista de IL-18R α " dentro del contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo contra IL-18R α en el que el anticuerpo tiene un dominio de unión de antígeno que comprende seis CDR con una secuencia de aminoácidos que consiste en: SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, modulando la producción de IL-18R α y/o la acción de tal modo que la producción de IL-18R α y/o la acción es atenuada, reducida, o parcialmente, substancialmente o completamente bloqueada. En una realización particular, el antagonista reduce o previene la producción de IL-18R α . En otra realización particular el antagonista bloquea parcialmente, substancialmente o completamente la actividad de IL-18R α .

Cualesquiera antagonistas que inhiban la producción de IL-18R α y/o la acción de tal modo que la producción de IL-18R α y/o la acción es atenuada, reducida, o parcialmente, substancialmente o completamente bloqueada puede usarse para tratar la enfermedad desmielinizante (en particular la EM) de acuerdo con los métodos de la invención. De acuerdo con esto, pueden usarse anticuerpos que se unan selectivamente a IL-18R α o anticuerpos que se unan selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α para tratar o prevenir una

enfermedad desmielinizante (en particular la EM).

De acuerdo con esto, la invención proporciona un método para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad desmielinizante (en particular la EM), en un sujeto, en particular un sujeto humano, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-18R α . La invención también se refiere al uso de un antagonista de IL-18R α en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante (en particular la EM).

Como se explica en este documento, los inventores de la presente invención han descubierto que los antagonistas de IL-18R α son eficaces *in vivo* para tratar enfermedades. Los datos obtenidos por los inventores indican que la inhibición de IL-18R α es eficaz para tratar la EM, de forma independiente a IL-18. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, los antagonistas de IL-18R α usados para tratar la enfermedad desmielinizante (en particular la EM) no inhiben solamente la actividad de IL-18.

La invención también se refiere a cualquiera de los antagonista anteriormente o posteriormente descritos de IL-18R α para uso como medicamento.

En una realización específica de la invención, el antagonista es capaz de inhibir la actividad de IL18R α en células que presentan el antígeno y más específicamente en las células que presentan el antígeno seleccionadas entre el grupo que consiste en fagocitos monomorfonucleados, fagocitos polimorfonucleados, células dendríticas y linfocitos naturales.

En una realización de la invención, el antagonista de IL-18R α es capaz de inhibir el desarrollo de células TH que producen IL-17.

Un cADN que codifica IL-18R α humano se presenta en SEQ ID NO: 1. Este cADN codifica una proteína de 541 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que incluye un dominio extracelular de 329 (residuos de aminoácidos 1-329 de SEQ ID NO: 2) que incluye un péptido señal de 18 aminoácidos (residuos 1-18 de SEQ ID NO: 2), una región transmembrana de 21 aminoácidos (residuos de 330 a 350 de SEQ ID NO: 2), y, un dominio citoplásmico de los aminoácidos 351 a 541 de SEQ ID NO:2.

1) Anticuerpos:

En una realización preferida de la presente invención, los antagonistas para uso en los métodos de la presente invención son anticuerpos que se unen selectivamente a IL-18R α . Dichos anticuerpos se usan para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad desmielinizante (en particular la EM), en un sujeto, preferiblemente un sujeto humano. Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, inmunoconjugados y fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dia-cuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple; mono-cuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos) como será descrito en este documento más adelante. En una realización preferida, los anticuerpos se unen al dominio extracelular de IL-18R α .

En realizaciones más específicas, el anticuerpo usado en los métodos de la presente invención se une selectivamente al polipéptido de SEQ ID NO: 2, y más específicamente a los residuos 1-329 de SEQ ID NO: 2, residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2, residuos de 330 a 350 de SEQ ID NO: 2 o los residuos de 351 a 541 de SEQ ID NO: 2. En un aspecto particular, el anticuerpo se une selectivamente a los residuos 19-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2. En otro aspecto particular, el anticuerpo se une selectivamente a los residuos 19-132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2. En una realización preferida, el anticuerpo se une selectivamente a un epítipo localizado en el dominio extracelular de IL-18R α humano. Aún más preferiblemente, este epítipo está localizado dentro de los aminoácidos 19 a 329 de SEQ ID NO: 2. En otra realización, este epítipo está localizado dentro de los residuos de aminoácidos 19 a 219 de SEQ ID NO: 2, o dentro de los residuos de aminoácidos 122 a 329 de SEQ ID NO: 2. En otro aspecto particular, el epítipo está localizado dentro de los aminoácidos 19-132 de SEQ ID N: 2, o 122-219 de SEQ ID N: 2, o 213-329 de SEQ ID N: 2.

Dentro del contexto de esta invención, el término unión "selectiva" indica que los anticuerpos se unen preferencialmente al polipéptido diana o epítipo, es decir, con mayor afinidad que cualquier unión a cualquier otro antígeno o epítipo. En otras palabras, la unión al polipéptido diana puede discriminarse de la unión no específica a otros antígenos. Se prefiere que los anticuerpos de acuerdo con la presente invención exhiban una afinidad de unión (K_a) frente al polipéptido diana o epítipo de $10^6 M^{-1}$ o mayor, preferiblemente $10^7 M^{-1}$ o mayor, más preferiblemente $10^8 M^{-1}$ o mayor y lo más preferiblemente $10^9 M^{-1}$ o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede fácilmente determinarse por cualquier experto en la técnica, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard (Scatchard G., Ann NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Los anticuerpos adecuados para uso en los métodos de la presente invención incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, inmunoconjugados y fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; dia-cuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple; monocuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos) como será descrito en este documento más adelante.

A. *Anticuerpos policlonales:*

Se han descrito métodos para preparar anticuerpos policlonales de diversas especies, incluyendo roedores, primates y caballos, por ejemplo en Vaitukaitis *et al.* (J Clin Endocrinol Metab. 33 (1971) p. 988). Pueden generarse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se le inyectará en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido de SEQ ID NO: 2, o, más específicamente, los residuos 1-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos de 330 a 350 de SEQ ID NO: 2 o los residuos de 351 a 541 de SEQ ID NO: 2, o su proteína de fusión, incluso más específicamente, los residuos 19-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2, o los residuos 19-132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2, o su proteína de fusión). Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida que sea inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, aunque no se limitan, a hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de semilla de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato trehalosa sintética). Pueden realizarse inyecciones repetidas. Se recogen las muestras de sangre y se separan las inmunoglobulinas o el suero.

B. *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos pueden ser, de forma alternativa, anticuerpos monoclonales. La expresión "anticuerpo monoclonal" según se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, siendo los anticuerpos individuales que comprenden la población idénticos excepto por las posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un sitio antigénico único. El adjetivo "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que es obtenido de una población substancialmente homogénea de anticuerpos, y no se entiende que se requiera la producción del anticuerpo mediante ningún particular método.

Pueden encontrarse métodos para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, en Harlow et al (Antibodies: A laboratory Manual, CSH Press, 1988) o en Kohler et al (Nature 256 (1975) 495)

En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal huésped apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante (el agente inmunizante típicamente incluirá el polipéptido de SEQ ID NO: 2, o, más específicamente, los residuos 1-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos de 330 a 350 de SEQ ID NO: 2 o los residuos de 351 a 541 de SEQ ID NO: 2, o su proteína de fusión; incluso más específicamente los residuos 19-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2, o los residuos 19-

132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2, o su proteína de fusión) para generar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. De forma alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Generalmente, se usan o bien linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o esplenocitos o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada usando un adecuado agente de fusión, tal como polietilenglicol, para formar células de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células de mamíferos transformadas, particularmente células de mieloma de roedores, bovinos y de origen humano. Normalmente, se usan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contenga preferiblemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células no fusionadas e inmortalizadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes de HGPR. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, ayudan a un alto y estable nivel de expresión del anticuerpo por las células productoras del anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murinas, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la Colección de Cultivos Tipo Americana, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede analizarse entonces según se detecte la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido inmunizante. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente de enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son muy conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitantes y hacerlos crecer mediante métodos estándar (Goding, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, el Medio Eagle Modificado de Dulbecco y el medio RPMI- 1640. De forma alternativa, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como ascitos en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o del fluido ascético mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sepharose, hidroxilapatito, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EE.UU. N°. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención pueden aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez que se aísla, el ADN puede ponerse en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células huésped tales como células COS de simios, células (CHO) de ovario de hámster chino, o células de mieloma que no produzcan por otro lado la proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 [1991] y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc de modo que se prevenga la reticulación de la cadena pesada. De forma alternativa, los residuos de cisteína relevantes son sustituidos con otro residuo de aminoácido o son delecionados para que se prevenga la reticulación.

También son adecuados métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir sus fragmentos, particularmente, fragmentos Fab, puede lograrse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

También pueden producirse anticuerpos por selección de genotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se describe, por ejemplo, en Ward et al (Nature 341 (1989) 544).

C. Anticuerpos humanos y humanizados:

Preferiblemente, los anticuerpos para uso en la presente invención son anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión de antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por los residuos de una CDR de especies no humanas (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo con la especificidad deseada, afinidad y capacidad. En algunos casos, los residuos marco de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias CDR o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. Nº. 4.816.567), en el que se ha sustituido substancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana.

En algunos casos, la transferencia de un CDR a un marco humano conduce a la pérdida de la especificidad para el anticuerpo humanizado. En estos casos, puede introducirse una mutación invertida en las regiones marco de la porción humana del anticuerpo. Los métodos para preparar mutaciones invertidas son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Co et al., PNAS USA 88; 2269-2273 (1991) y el documento WO 90/07861.

También pueden producirse anticuerpos humanos usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo genotecas de exposición a fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol, 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol, 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole et al., y Boerner et al, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies y Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al, J. Immunol, 147(1):86-95 (1991)). De forma similar, pueden hacerse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcialmente o completamente inactivados. Bajo su exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, lo cual imita de forma muy parecida lo que es observado en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reagrupación de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque es descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al, Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93 (1995)).

D. Inmunoconjugados:

La invención también se refiere al uso de inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a restos heterólogos, tales como agentes citotóxicos, marcadores, fármacos u otros agentes terapéuticos, covalentemente unidos o no, tanto directamente o a través del uso de agentes de acoplamiento o enlazantes. El agente citotóxico incluye agentes quimioterapéuticos, toxinas (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, o sus fragmentos), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que pueden usarse incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos de unibles de la toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrin A, cadena de modeccin A, alfa-sarcin, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenes. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re .

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en células prediana en las que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido desde la circulación usando un agente diluyente y entonces la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Además, pueden PEGilarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la presente invención usando los métodos de la técnica y los descritos en este documento. Los anticuerpos descritos en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las patentes de EE.UU. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Se describen liposomas con mayor tiempo de circulación en la patente de EE.UU. N°. 5.013.556.

E. Fragmentos de anticuerpos:

La invención también se refiere al uso de "fragmentos de anticuerpos" que comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la unión de antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dia-cuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena simple; mono-cuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

"Fv" es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de unión y de reconocimiento de antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y ligera en una fuerte asociación no covalente. Es en esta configuración que los tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión de antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. De forma colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno frente al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que la del sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CHI) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de la cadena pesada CHI incluyendo una o más cisteínas de la región oculta del anticuerpo. La Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en la que el residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas ocultas entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos. Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, según las secuencias de

aminoácidos de sus dominios constantes.

Las "moléculas de anticuerpo de cadena sencilla" son fragmentos de un anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL de dicho anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido simple. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazante polipeptídico entre los dominios VH y VL lo que permite que la molécula de anticuerpo de cadena sencilla forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, véase, Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

La expresión "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión de antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH - VL). Preferiblemente, usando un enlazante que sea demasiado corto para producir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión de antígeno. Los diacuerpos son descritos más detalladamente, por ejemplo, en el documento EP 404,097; documento WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993).

La expresión "monocuerpos" como se usa en este documento, se refiere a moléculas de unión a antígenos con un dominio variable de cadena pesada y sin dominio variable de cadena ligera. Un monocuerpo puede unirse a un antígeno en ausencia de cadena ligera y típicamente tiene tres regiones CDR denominadas CDRH1, CDRH2 y CDRH3. Los monocuerpos incluyen "monocuerpos de camélidas" obtenidos de una fuente animal de la familia de las camélidas, incluyendo animales con pies con dos dedos y plantas curtidas. Los animales, de la familia de las camélidas incluyen camellos, llamas y alpacas. Se ha publicado que los camellos (*Camelus dromedaries* y *Camelus bactrianus*) a menudo carecen de dominios variables de cadena ligera cuando se analizaba su material procedente de su suero, sugiriendo que puede derivarse suficiente especificidad y afinidad del anticuerpo de los dominios VH (tres bucles CDR) solos. Los monocuerpos también incluyen VH modificadas de diversas fuentes animales, en particular mamíferos (por ejemplo ratón, rata, conejo, caballos, burros, bovinos o humanos), que pueden unirse a un antígeno en ausencia de VL. Preferiblemente, la VH se modifica m posiciones en la interfase VL para proporcionar la unión del VH al antígeno en ausencia de la VL. Davies y Riechmann han demostrado por ejemplo que pueden generarse los "monocuerpos camelizados" con alta afinidad (afinidad de unión (K_a) al polipéptido diana de $10^7 M^{-1}$ o mayor) y alta especificidad (Davies & Riechmann, 1995, *Biotechnology (N Y)*, 13(5):475-9). La unión no específica de la VH a través de su interfase para el dominio variable de cadena ligera (VL) fue prevenida a través tres mutaciones (G44E, L45R y W47G) en esta interfase. Estas mutaciones se introdujeron en las cadenas pesadas de anticuerpos camélidos imitadores naturalmente carentes de parejas de cadena ligera.

F. Otros anticuerpos para uso en los métodos de la presente invención:

En una realización preferida de la presente invención, los antagonistas para uso en los métodos de la presente invención son anticuerpos como se describen en este documento más arriba que se unen selectivamente a IL-18R α . Los anticuerpos para uso en los métodos de la presente invención se describen por ejemplo en la solicitud PCT WO97/31010 o en la solicitud europea EP0850952.

Preferiblemente, los anticuerpos para uso en los métodos de la presente invención se unen selectivamente a IL-18R α humano e incluso más preferiblemente a un epítipo localizado en el dominio extracelular de IL-18R α humano. Dichos anticuerpos se usan para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de enfermedades desmielinizantes (tales como la EM) en un sujeto humano.

En una realización más específica, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o humanizados, inmunoconjugados o fragmentos de anticuerpos (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dia-cuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple; mono-cuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos) como se describen en este documento más arriba.

En un aspecto particular de la invención, dichos anticuerpos se unen selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α humano. Más específicamente, dicho anticuerpo tiene un dominio de unión de antígeno que comprende seis CDR con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, de la SEQ ID NO: 6, de la SEQ ID NO: 7, de la SEQ ID NO: 8, de la SEQ ID NO: 9 y la SEC ID N°: 10.

En otra realización de la invención, dichos anticuerpos comprenden un dominio VH. Preferiblemente el dominio VH comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En todavía una realización más, el anticuerpo comprende un dominio VL. Preferiblemente el dominio VL comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En una realización preferida el anticuerpo comprende a un dominio VH y VL. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio VL que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

En otra realización, el anticuerpo comprende un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de IgG1 humano; un dominio constante de IgG2 humano; un dominio constante de IgG3 humano ; un dominio constante de IgG4 humano; un dominio constante de IgM humano; un dominio constante de IgE humano y un dominio constante de IgA humano. Preferiblemente, el dominio de la región constante de la inmunoglobulina de cadena pesada es un dominio constante de IgG1 humano. En otra realización, el anticuerpo comprende además un dominio constante de inmunoglobulina de cadena ligera seleccionado entre el grupo que consiste en un dominio constante de kappa de Ig humana; y un dominio constante de lambda de Ig humana.

En otra realización, el anticuerpo comprende una IgG1 humana como región pesada constante de Ig; una región ligera constante de Ig seleccionada entre el grupo que consiste en un dominio constante de kappa de Ig humana; y un dominio constante de lambda de Ig humana; una región ligera variable de Ig con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: ; y una región ligera variable de Ig con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (denominada Ab1 de aquí en adelante en este documento).

Las realizaciones particularmente preferidas de los anticuerpos descritos en este documento son anticuerpos humanos o humanizados, fragmentos de anticuerpos tales como: fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, monocuerpos, o anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos como se definen en este documento más arriba. Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

Otros anticuerpos adecuados para uso en el método de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos monoclonales: clon de IL-18R α anti-humano monoclonal 70614 (comercializado por R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU., número de catálogo: MAB8401), clon de IL-18R α anti-humano monoclonal 70625 (comercializado por R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU., número de catálogo: MAB840), clon de IL-18R α anti-humano monoclonal B-E43 (anticuerpo número 80232 (comercializado por Diaclone, Besancon, Francia, número de catálogo: 854 900 000)), clon de IL-18R α anti-humano monoclonal H44 (anticuerpo número 80438 (comercializado por Diaclone, Besancon, Francia)). Se prefiere una forma humanizada de dichos anticuerpos.

En una realización, los anticuerpos para uso en los métodos de la invención son anticuerpos que compiten con Ab1, clon 70614, clon 70625, clon B-E43 y/o clon H44 como se describen en este documento más arriba para unirse a IL-18R α humano. Pueden usarse ensayos de unión competitivos para identificar anticuerpos que compiten con Ab1, clon 70614, clon 70625, clon B-E43 y/o clon H44 para unirse a IL-18R α humano. Cualquiera de un número de ensayos de unión competitivos conocidos en la técnica puede usarse para medir la competición entre dos anticuerpos frente al mismo antígeno. En pocas palabras, se prueba la capacidad que tienen diferentes anticuerpos de inhibir la unión de otro anticuerpo. Por ejemplo, pueden diferenciarse anticuerpos por el epítipo al que se unen usando un ensayo ELISA sándwich. Esto se lleva a cabo usando un anticuerpo de captura para cubrir la superficie de un pocillo (el anticuerpo de captura puede ser, por ejemplo: Ab1, clon 70614, clon 70625, clon B-E43 y/o clon H44). Se añade entonces una concentración subsaturante de antígeno marcado a

la superficie de captura (por ejemplo IL-187R α humano o una parte de éste (por ejemplo, el dominio extracelular de IL-187R α humano). Esta proteína se unirá al anticuerpo a través de una interacción específica de anticuerpo:epítipo. Después de lavar un segundo anticuerpo, que se ha unido a un resto detectable (por ejemplo, HRP, estando el anticuerpo marcado definido como el anticuerpo de detección) se añade al ELISA. Si este anticuerpo reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo de captura será incapaz de unirse a la proteína diana como el epítipo particular ya que no estará más disponible para unirse. Sin embargo, si este segundo anticuerpo reconoce a un epítipo diferente en la proteína diana será capaz de unirse y esta unión puede detectarse cuantificando el nivel de actividad (y por lo tanto el anticuerpo unido) usando un sustrato relevante. La línea de fondo se define usando un anticuerpo sencillo tanto como anticuerpo de captura como de detección, mientras que la señal máxima puede establecerse capturando con un antígeno el anticuerpo específico y detectándolo con un anticuerpo al marcador en el antígeno. Usando la línea de fondo y las señales máximas como referencias, pueden evaluarse anticuerpos de forma emparejada para determinar la especificidad del epítipo. Un primer anticuerpo se considera que inhibe competitivamente la unión de un segundo anticuerpo, si la unión del segundo anticuerpo al antígeno se reduce por al menos 30%, usualmente al menos aproximadamente 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o 85%, y a menudo por al menos aproximadamente 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, en presencia del primer anticuerpo usando cualquiera de los ensayos descritos anteriormente. Como se describe en este documento más arriba, los anticuerpos que compiten con Ab1, clon 70614, clon 70625, clon B-E43 y/o clon H44 para la unión a IL-18R α humano, y en particular al dominio extracelular de IL-187R α humano, tal como reduciendo al menos 30%, usualmente al menos aproximadamente 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% o 85%, y a menudo por al menos aproximadamente 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, en presencia de Ab1, clon 70614, clon 70625, clon B-E43 y/o clon H44, usando cualquiera de los ensayos descritos más arriba, representan los anticuerpos para uso en los métodos de la invención. Las realizaciones particularmente preferidas de estos anticuerpos competitivos son anticuerpos humanos o humanizados, fragmentos de anticuerpos tales como: fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, monocuerpos, o anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos como se definen en este documento más arriba. Lo más preferiblemente, estos anticuerpos competitivos son anticuerpos humanos o humanizados.

En una realización de la presente invención, los anticuerpos para uso en los métodos de la invención son anticuerpos obtenibles u obtenidos por las siguientes técnicas. Se inmuniza un animal huésped (por ejemplo un ratón, hámster, conejo, cabra, burro, mono u otro huésped apropiado) con un agente inmunizante que comprende o que consiste en el polipéptido de SEQ ID NO: 2 o su proteína de fusión, o más específicamente que comprende o que consiste en los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2 o su proteína de fusión; incluso más específicamente los residuos 19-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2, o los residuos 19-132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2, o su proteína de fusión; para producir linfocitos que producen anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. De forma alternativa, los linfocitos se inmunizan *in vitro*. En tal caso se usan o bien linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o esplenocitos o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes mamíferas no humanas. Los linfocitos se fusionan entonces con una línea celular inmortalizada usando un adecuado agente de fusión (tal como polietilenglicol), para formar células de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se analiza entonces según se detecte la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido inmunizante. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente de enzima (ELISA). Un análisis ELISA para la unión de IL-18R α se ha descrito por ejemplo en Vermot-Desroches C, et al Cell Immunol. 2005. 236(1-2):101-4. Después de que se identifiquen las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitantes y hacerlos crecer mediante métodos estándar (Goding, supra). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, el Medio Eagle Modificado de Dulbecco y el medio RPMI- 1640. De forma alternativa, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como ascitos en un mamífero. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones

pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o del fluido ascético mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sepharose, hidroxilapatito, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

5 Opcionalmente, el anticuerpo obtenido puede ser humanizado. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo secuencias CDR o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. N^o. 4.816.567), en el que se ha sustituido substancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En algunos casos, la transferencia de un CDR a un marco humano conduce a la pérdida de la especificidad para el anticuerpo humanizado. En 10 estos casos, puede introducirse una mutación invertida en las regiones marco de la porción humana del anticuerpo. Los métodos para preparar mutaciones invertidas son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Co et al, PNAS USA 88; 2269-2273 (1991) y el documento WO 90/07861. De forma alternativa, pueden hacerse anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones 15 en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcialmente o completamente inactivados. Bajo su exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, lo cual imita de forma muy parecida lo que es observado en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reagrupación de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos. Este enfoque es descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 20 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al, Bio/Technology, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature, 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature, 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology, 14:845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol, 13 :65-93 (1995).

25 En una realización, la invención se refiere a un método para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de enfermedades desmielinizantes (tales como la esclerosis múltiple) en un sujeto humano, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de IL-18R α , en el que el antagonista es un anticuerpo que se une selectivamente al dominio extra-celular de IL18-R α y en el que el anticuerpo es obtenible por el procedimiento que comprende la etapa o que consiste en:

30 - inmunizar un animal huésped con un agente inmunizante que comprende los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2 (o que consiste en los residuos 19-329 de SEQ ID NO: 2, o los residuos 122-329 de SEQ ID N: 2, o los residuos 19-132 de SEQ ID N: 2, o los residuos 122-219 de SEQ ID N: 2, o los residuos 213-329 de SEQ ID N: 2, o su proteína de fusión),

35 - fusionar los linfocitos producidos por dicho animal huésped con una línea celular inmortalizada para formar células de hibridoma,

40 - seleccionar clones de células de hibridoma que producen anticuerpos dirigidos contra el péptido inmunizante,

45 - analizar la actividad de los anticuerpos producidos por los diferentes clones de células de hibridoma en un modelo animal de EAE y seleccionar un anticuerpo que inhiba la progresión de la EAE en dicho modelo animal,

- producir el anticuerpo monoclonal secretado.

Opcionalmente, en una etapa más, el anticuerpo obtenido puede humanizarse. De forma alternativa, el animal huésped inmunizado es un animal transgénico en el que los genes de inmunoglobulina endógena se han sustituido por inmunoglobulina humana, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcialmente o completamente, como se describe en este documento más arriba. Bajo su exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, lo cual imita de forma muy parecida lo que es observado en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reagrupación de genes, ensamblaje y repertorio de anticuerpos.

En otra realización de la presente invención, los anticuerpos para uso en los métodos de la invención son anticuerpos obtenibles u obtenidos por expresión de fagos. En tal caso, los "anticuerpos monoclonales" se aíslan de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352:624-628 [1991] y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Preferiblemente, los anticuerpos como se describen en este documento más arriba y usados en los métodos de la presente invención son humanos o están humanizados; técnicas para crear dichos anticuerpos humanos o humanizados también son muy conocidas y están comercialmente disponibles en, por ejemplo, Protein Design Labs, Inc. (Fremont, CA), Medarex Inc, (Princeton, NJ) y Abgennix Inc.(Fremont, CA).

2) Usos farmacéuticos de los antagonistas de IL-18R α descritos en este documento más arriba:

La invención se refiere a cualquiera de los antagonistas anteriormente o posteriormente descritos de IL-18R α para uso como medicamento. Preferiblemente, cualquiera de los antagonistas anteriormente o posteriormente descritos de IL-18R α tiene la capacidad de reducir los síntomas de una enfermedad desmielinizante (tal como la esclerosis múltiple). Por lo tanto, preferiblemente, todas las modificaciones de los antagonistas de IL-18R α descritas en este documento no afectan significativamente a su capacidad para reducir los síntomas de la EM. Incluso más preferiblemente, las modificaciones frente a antagonistas de IL-18R α descritas en este documento potencian su capacidad para reducir los síntomas de EM (por ejemplo potenciando su semivida, etc...).

La invención también se refiere a métodos para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad desmielinizante (tal como la esclerosis múltiple) en un sujeto humano administrando una cantidad eficaz de un antagonista de IL-18R α al sujeto. Cualesquiera antagonistas que inhiban la producción de IL-18R α y/o la acción de tal modo que la producción de IL-18R α y/o la acción es atenuada, reducida, o parcialmente, substancialmente o completamente bloqueada puede usarse para tratar la enfermedad desmielinizante (tal como la esclerosis múltiple) de acuerdo con los métodos de la invención. Los métodos de la presente invención incluyen administrar un antagonista de IL-18R α a un individuo afligido con EM, durante un periodo de tiempo suficiente para inducir una mejora sostenible en la condición del paciente. La invención también proporciona, en parte, el uso de un antagonista de IL-18R α en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes (tal como la esclerosis múltiple). En algunas realizaciones, los antagonistas son los descritos en este documento anteriormente. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen selectivamente a IL-18R α , anticuerpos que se unen selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α pueden usarse para tratar o prevenir la EM. En algunas realizaciones, la enfermedad que se trata es EM con recaídas y remisiones (RR), EM progresiva secundaria (PS), EM progresiva primaria (PP) o EM con recaída progresiva (RP).

Fundamental, en parte, para la invención es el descubrimiento de que los inhibidores de IL-18R α son eficaces *in vivo* para tratar enfermedades. Específicamente se encontró que un anticuerpo, que se une al dominio extracelular de IL-18R α , era útil en la prevención de la EM inducida experimentalmente en un modelo de ratón de esta enfermedad. Además, el antagonista de IL-18R α también inhibió la progresión de una enfermedad previamente establecida en el mismo modelo animal. Por esto, estos datos *in vivo* indican que la inhibición de IL-18R α es eficaz para tratar la EM. Cualquier método que neutralice la actividad de IL-18R α o inhiba la expresión del gen de IL-18R α (tanto su transcripción como su traducción) puede usarse para reducir los síntomas de la EM.

Los métodos objetos implican administrar al paciente un antagonista de IL-18R α que sea capaz de reducir la cantidad eficaz de IL-18R α endógeno biológicamente activo, tal como reduciendo la cantidad del IL-18R α producido, o previendo su actividad biológica. Dichos antagonistas incluyen los descritos en este documento más arriba.

En un aspecto preferido, pueden usarse terapias a base de proteínas para inhibir la actividad de la proteína IL-18R α . Por ejemplo, los métodos preferidos de la invención utilizan anticuerpos que se unen selectivamente a IL-18R α o anticuerpos que se unen selectivamente

al dominio extracelular de IL-18R α como se definen en este documento más arriba.

En una realización preferida de la invención, se usan formas de liberación sostenida del antagonista de IL-18R α como se describen en este documento más arriba, y en particular, los anticuerpos que se unen selectivamente a IL-18R α , anticuerpos que se unen selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α como se describen en este documento más arriba. Las formas de liberación sostenida adecuadas para uso en los métodos descritos incluyen, aunque no se limitan a, antagonistas de IL-18R α que son encapsulados en un polímero biocompatible de disolución lenta, mezclado con dicho polímero, y/o incorporado en un implante semi-permeable biocompatible. Se han diseñado microesferas de polímeros degradables para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan con polímeros degradables tales como poli(lactida-co-glicólido) (PLG), polianhidridas, poli(orto ésteres), polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en los que la proteína se atrapan en el polímero (Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en *Drug Delivery Systems*, Ranade y Hollinger (eds.), págs. 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders y Hendren (eds.), págs. 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus et al., *Science* 281:1161 (1998); Putney y Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Las nanoesferas revestidas de polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref et al, *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)). Además, el antagonista de IL-18R α puede conjugarse con polietilenglicol (pegilado) para prolongar su semivida en suero o potenciar la liberación de la proteína.

Para tratar la EM, el antagonista de IL-18R α , preferiblemente un anticuerpo que se una selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se una selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , se administra al paciente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para inducir una mejora sostenida en al menos un indicador que refleje la severidad del trastorno. El grado de mejora se determina según los signos o síntomas, y también pueden emplearse cuestionarios que sean proporcionados al paciente, tales como cuestionarios de calidad de vida. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista IL-18R α es la que es suficiente para lograr dicha mejora sostenida.

La mejora podría inducirse por la administración repetida de una dosis del antagonista de IL-18R α hasta que el paciente manifieste una mejora sobre una línea de base para el indicador elegido o indicadores. Aunque puede parecer que mejore el grado de enfermedad del paciente después del tratamiento de acuerdo con uno o más indicadores, el tratamiento puede continuarse indefinidamente en el mismo nivel o a una dosis reducida o frecuencia. Una vez que se ha reducido o interrumpido el tratamiento, después puede resumirse en el nivel original si los síntomas reaparecieran.

Las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos de la presente invención pueden contener, en combinación con el antagonista de IL-18R α como ingrediente activo, diluyentes, vehículos, vehículos biológicamente compatibles adecuados farmacéuticamente aceptables y aditivos que sean adecuados para su administración en un animal (por ejemplo, solución salina fisiológica) y opcionalmente que comprende adyuvantes (como excipientes, estabilizantes o adyuvantes) que faciliten el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de una manera aceptable para satisfacer las necesidades del modo de administración. Por ejemplo, en la bibliografía se describe el uso de biomateriales y otros polímeros para la administración de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo de administración específico (Luo, B. y Prestwich, G.D., 2001; Cleland JL et al., *Curr Opin Biotechnol.* (2001), 12(2):212-9). La definición de "farmacéuticamente aceptable" significa que incluye cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedante al cual se administra. Por ejemplo, para la administración por vía parenteral, los anteriores ingredientes activos se pueden formular en formas de dosificación unitaria para la inyección, en el seno de vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, seroalbúmina y solución de Ringer. Los vehículos se pueden seleccionar también de entre almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato magnésico, estearato

sódico, monoestearato de glicerol, cloruro sódico, lecha desnatada deshidratada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y diversos aceites, entre ellos aceites procedentes del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de ajonjolí).

5 La composición farmacéutica puede estar en una forma líquida o liofilizada y comprende un diluyente (tampones Tris, citrato, acetato o fosfato) con diversos valores de pH y fuerzas iónicas, solubilizador tal como Tween o Polisorbato, vehículos tales como albúmina de suero humano o gelatina, conservantes tales como timerosal, parabens, cloruro de bencilalconio o alcohol bencílico, antioxidantes tales como ácido ascórbico o metabisulfito de sodio, y otros componentes tales como lisina o glicina. La selección de una composición particular dependerá de un número de factores, incluyendo la afección que se trate, la vía de administración y los parámetros farmacocinéticos deseados. Una fuente más extensiva de componentes adecuados para composiciones farmacéuticas se encuentra en el Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. A. R. Gennaro, ed. Mack, Easton, PA (1980).

15 En una realización preferida, se usan terapias a base de proteínas para inhibir la actividad de la proteína IL-18R α . Los métodos preferidos de la invención utilizan anticuerpos que se unen selectivamente a IL-18R α , o anticuerpos que se unen selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α como se definen en este documento más arriba. Dichas proteínas se administran en la forma de una composición fisiológicamente aceptable que comprende la proteína recombinante purificada junto con vehículos fisiológicamente aceptables, excipientes o diluyentes. Dichos vehículos no son tóxicos frente a los receptores en las dosis y concentraciones empleadas. Normalmente, la preparación de dichas composiciones comprende combinar el antagonista de IL-18R α con tampones, antioxidantes tales como el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (tales como los que tienen menos de 10 aminoácidos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos tal como glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatona y otros estabilizantes y excipientes. Una solución salina tamponada neutra o solución salina mixta con, albúmina de suero conespecífica son diluyentes ejemplarmente apropiados. El antagonista de IL-18R α preferiblemente se formula como un liofilizado usando las soluciones del excipiente apropiado (por ejemplo, 20 sacarosa) como diluyentes. Pueden determinarse las dosis apropiadas en ensayos de dosificación estándar, y puede variar de acuerdo con la ruta de administración elegida. De acuerdo con los estándares de industria apropiados, también pueden añadirse conservantes, tales como alcohol bencílico. La cantidad y frecuencia de administración dependerá, por supuesto, de factores tales como la severidad de la indicación que se trate, la respuesta deseada, la edad y la condición del paciente, etcétera.

Puede usarse cualquier modo de administración aceptado y determinarse por los expertos en la técnica para establecer los niveles de sangre deseados de los ingredientes activos. Por ejemplo, la administración puede realizarse por diversas vías parenterales tales como la vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, 40 transdérmica, rectal, oral o bucal. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran por inyección, tanto subcutánea como intravenosa. La vía de administración eventualmente elegida dependerá de diversos factores y puede ser averiguada por cualquier experto en la técnica.

45 Las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos de la presente invención también pueden administrarse en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada, entre ellas inyecciones de depósito, bombas osmóticas, para administrar de manera prolongada el antagonista de IL-18R α a un ritmo predeterminado, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración única de dosis exactas.

50 La administración parenteral se puede realizar por inyección en embolada o por una perfusión gradual a lo largo del tiempo. Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas, estériles, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica, y se pueden preparar de acuerdo con métodos rutinarios. Además, pueden administrarse suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los vehículos o disolventes lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, 55 ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, oleato de etilo o triglicéridos. Las

suspensiones acuosas para inyección que pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. Las composiciones farmacéuticas incluyen soluciones adecuadas para la administración por inyección y contienen de aproximadamente 0,01 a 99,99 por ciento, con preferencia de aproximadamente 20 a 75 por ciento de compuesto activo junto con el excipiente.

Debe entenderse que la dosificación administrada será dependiente de la edad, sexo, estado de salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, frecuencia de tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La dosificación se adaptará al sujeto individual, como se entiende y se determina por un especialista en la técnica. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse por múltiples dosis o en una sola dosis.

En una realización de la invención, el antagonista de IL-18R α descrito en este documento más arriba se administra una vez por semana para tratar la EM, en otra realización se administra al menos dos veces por semana, y en otra realización se administra al menos una vez al día. La dosis puede ser de 0,1 a 10 mg/kg, preferiblemente dada intravenosamente como de 15 minutos a 3 horas de infusión. La dosis se administra de forma repetida bisemanalmente, semanalmente o separada por diversas semanas (2-8 semanas).

Si se usa una ruta de administración del antagonista de IL-18R α distinta a la de inyección, la dosis se ajusta de forma apropiada de acuerdo con prácticas de medicina estándar. Por ejemplo, si la vía de administración es la inhalación, la administración puede ser de una a siete veces por semana en intervalos de dosis de 10 mg/dosis a 50 mg por dosis.

En muchos casos, se obtendrá una mejora en una afección del paciente inyectando una dosis de hasta aproximadamente 100 mg de un anticuerpo que se une selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se une selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba, de una a tres veces por semana durante un periodo de al menos tres semanas, aunque el tratamiento durante periodos más largos puede ser necesario para inducir el grado deseado de mejora. El régimen puede continuarse indefinidamente.

3) Terapia de combinación:

En algunas realizaciones, se administra un antagonista de IL-18R α , como se define en este documento más arriba, junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir la EM. Por ejemplo, puede administrarse un antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se une selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se une selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) junto con cualquiera de los tratamientos estándar para la EM incluyendo, por ejemplo, corticosteroides, fármacos inmunodepresivos, agentes neuro-protectores, fármacos inmunomoduladores o interferones.

En una realización de la presente invención, se administra un antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se une selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se une selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) junto con un corticosteroide. Por "corticosteroide" se entiende cualquier hormona esteroidea natural o sintética que puede derivarse del colesterol y se caracteriza por un sistema de anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno hidrogenado. Los corticosteroides naturales se producen generalmente por la corteza suprarrenal. Los corticosteroides sintéticos pueden halogenarse. Los corticosteroides pueden tener actividad glucocorticoide y/o mineralocorticoide.

Los ejemplos de corticosteroides incluyen, por ejemplo, dexametasona, betametasona, triamcinolona, triamcinolona acetona, triamcinolona diacetato, triamcinolona hexacetona, beclometasona, dipropionato, monohidrato de beclometasona dipropionato, flumetasona pivalato, diflorasona diacetato, fluocinolona acetona, fluorometolona, fluorometolona acetato, clobetasol propionato, desoximetasona, fluoximesterona, fluprednisolona, hidrocortisona, hidrocortisona acetato, hidrocortisona butirato, fosfato de hidrocortisona sodio, succinato de hidrocortisona sodio, cipionato de hidrocortisona, probutato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, acetato de cortisona, acetato de parametasona, metilprednisolona, metilprednisolona acetato, succinato de metilprednisolona sodio, prednisolona, acetato de

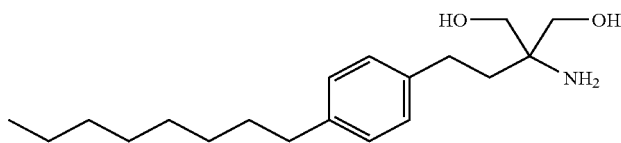
prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, tebutato de prednisolona, pivalato de clocortolona, flucinolona, dexametasono 21-acetato, betametasona 17-valerato, isoflupredona, 9-fluorocortisona, 6-hidroxidexametasona, diclorisona, meclorisona, flupredideno, doxibetasol, halopredona, halometasona, clobetasona, diflucortolona, isoflupredona acetato, fluorohidroxiandrostendiona, beclometasona, flumetasona, diflorasona, fluocinolona, clobetasol, cortisona, parametasona, clocortolona, ácido libre de prednisolona 21-hemisuccinato, prednisolona metasulfobenzoato, terbutato de prednisolona y triamcinolona acetona 21-palmitato.

Los ejemplos preferidos de corticosteroides administrados junto con un antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se una selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se una selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) son prednisona y/o IV metilprednisolona.

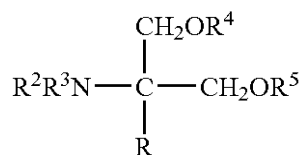
En una realización de la presente invención, se administra un antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se una selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se una selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) junto con un fármaco inmunodepresivo. En una realización de la presente invención, el fármaco inmunodepresivo se elige del grupo que consiste en metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida y cladribina, que se usan generalmente para formas progresivas severas de enfermedades desmielinizantes.

En otra realización de la presente invención, se administra un antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se una selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se una selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) junto con un agente neuroprotector. En una realización de la presente invención, el agente neuroprotector se elige del grupo que consiste en mielina oral, Copaxona (Glatiramer Acetato de Teva), Tysabri (Biogen/Elan), Novantrona (Serono), Teriflunomida (Aventis), Cladribina (Serono/IVAX), 683699 (T-0047) de GSK/Tanabe Seiyaku, Daclizumab (Roche), Laquinimod (Active Biotech) y ZK-117137 (Schering AG). Estos compuestos están todos en el mercado o en ensayos clínicos para tratar la EM.

En otra realización de la presente invención, se administra un antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se una selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se una selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) junto con un fármaco inmunomodulador. Respecto a esto, un fármaco inmunomodulador particular para uso en la presente invención incluye FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol, fingolimod). El FTY720 que está en fase II para tratar la EM (Novartis) tiene la siguiente fórmula:



Se ha identificado FTY720 como un agente inmunodepresor oralmente activo (véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/08943; WO 99/36065) obtenido por la modificación química de miriocina. Otros fármacos inmunomoduladores para uso en la presente invención incluyen los derivados de FTY720. Los derivados de FTY720 incluyen compuestos de 2-amino-1,3-propanodiol como se describe en el documento WO94/08943, que tiene la siguiente fórmula, así como cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables:



en la que R es una cadena carbonada lineal o ramificada opcionalmente sustituida que

puede tener, en la cadena, un enlace, un heteroátomo o un grupo seleccionado entre el grupo que consiste en un doble enlace, un triple enlace, oxígeno, azufre, sulfinilo, sulfonilo, -N(R6)- donde R6 es hidrógeno, alquilo, aralquilo, acilo o alcoxicarbonilo, carbonilo, arileno opcionalmente sustituido, cicloalquileo opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido y su aliciclo, y que puede sustituirse, en su extremo de cadena, por un doble enlace, un triple enlace, arilo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido o su aliciclo; un arilo opcionalmente sustituido, un cicloalquilo opcionalmente sustituido, un heteroarilo opcionalmente sustituido o su aliciclo; y

R2, R3, R4 y R5 son iguales o diferentes y cada uno representa un hidrógeno, un alquilo, un aralquilo, un acilo o un alcoxicarbonilo o, R4 y R5 pueden unirse para formar una cadena de alquileo que puede sustituirse por un alquilo, arilo o aralquilo.

Las anteriores cadenas carbonadas lineales o ramificadas opcionalmente sustituidas pueden tener un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alcoxi, alqueniilo, alquiniilo, aralquilo, alquilendioxi, acilo, alquilamino, alquiltio, acilamino, alcoxicarbonilo, alcoxicarbonilamino, aciloxi, alquilcarbamoilo, haloalquilo, haloalcoxi, nitro, halógeno, amino, hidroximino, hidroxilo, carboxilo, arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y su aliciclo; el arileno opcionalmente sustituido anteriormente mencionado, cicloalquileo opcionalmente sustituido, heteroarileno opcionalmente sustituido y su aliciclo pueden tener un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alcoxi, alqueniilo, alquiniilo, aralquilo, alquilendioxi, acilo, alquilamino, alquiltio, acilamino, alcoxicarbonilo, alcoxicarbonilamino, aciloxi, alquilcarbamoilo, haloalquilo, haloalcoxi, nitro, halógeno, amino, hidroxilo y carboxilo; y el arilo opcionalmente sustituido, ariloxi opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, heteroarilo opcionalmente sustituido y su aliciclo pueden tener un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo, alcoxi, alqueniilo, alquiniilo, aralquilo, alquilendioxi, acilo, alquilamino, alquiltio, acilamino, alcoxicarbonilo, alcoxicarbonilamino, aciloxi, alquilcarbamoilo, haloalquilo, haloalcoxi, nitro, halógeno, amino, hidroxilo y carboxilo.

Los ejemplos específicos de dichos compuestos de 2-amino-1,3-propanodiol incluyen 2-amino-2-[2-(4-heptilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-nonilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-decilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-undecilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-dodecilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-tridecilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-tetradecilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-hexiloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-heptiloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-octiloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-noniloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-deciloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-undeciloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-dodeciloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-trideciloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-(8-fluorooctil)fenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-(12-fluorododecil)fenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-(7-fluoroheptiloxi)fenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-(11-fluoroundeciloxi)fenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-(7-octeniloxi)fenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-heptilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-nonilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-decilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-undecilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-dodecilfenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-heptiloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-octiloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-noniloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, 2-amino-2-[2-(4-undeciloxifenil)etil]-1,3-propanodiol, o 2-amino-2-[2-(4-(7-octeniloxi)fenil)etil]-1,3-propanodiol, así como cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En otra realización de la presente invención, se administra un antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se una selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se una selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) junto con un interferón. Con relación a esto, un interferón particular para uso en la presente invención es el interferón-beta. La expresión "interferón (IFN)" e "interferón-beta (IFN-beta)", como se usa en este documento, se pretende que incluyan el interferón de fibroblastos, en particular de origen humano, obtenido mediante el aislamiento a partir de líquidos biológicos u obtenido mediante técnicas de ADN recombinante a partir de células hospedadoras procaríóticas o eucarióticas, así como sus sales, derivados funcionales, variantes, análogos y

fragmentos activos. Un tipo particular de interferón beta es el interferón beta-1a.

Se prefiere el uso de interferones de origen humano de acuerdo con la presente invención. El IFN-beta adecuado de acuerdo con la presente invención está disponible comercialmente, p.ej., como Rebif® (Serono), Avonex® (Biogen) o Bertaseron/Betaferon® (Schering). Rebif® (Interferón β humano recombinante) es el desarrollo más reciente en la terapia con interferón para la esclerosis múltiple (EM), y representa un avance significativo en el tratamiento. Rebif® es interferón (IFN)-beta 1a, producido a partir de líneas celulares mamíferas. Se estableció que el interferón beta-1a administrado de forma subcutánea tres veces por semana es eficaz en el tratamiento de la esclerosis múltiple recidivante-remitente (EMRR). El interferón beta-1a puede tener un efecto positivo sobre el curso a largo plazo de la EM reduciendo el número y la gravedad de las recaídas, y reduciendo la carga de la enfermedad y la actividad de la enfermedad medidas mediante IRM. Ejemplos particulares del interferón administrados junto con el antagonista de IL-18R α para uso en los métodos de la presente invención son por lo tanto Rebif® (Serono), Avonex® (Biogen) o Bertaseron/Betaferon® (Schering).

Un aspecto particular de la invención se refiere a un método para tratar la EM, particularmente EM con recaídas y remisiones (RR), EM progresiva secundaria (PS), EM progresiva primaria (PP) o EM con recaída progresiva (RP), en un sujeto necesitado de dicho tratamiento, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación de un antagonista de IL-18R α como se describe en este documento más arriba y un corticosteroide, un fármaco inmunodepresivo, un agente neuro-protector, un fármaco inmunomodulador o un interferón como se describe en este documento más arriba. En ciertas realizaciones, el corticosteroide es prednisona o IV metilprednisolona. En ciertas realizaciones, el fármaco inmunodepresivo es metotrexato, azatioprina, ciclofosfamida o cladribina. En ciertas realizaciones, el agente neuroprotector es mielina oral, Copaxona, Tysabri, Novantrona, Teriflunomida, Cladribina, 683699 (T-0047), Daclizumab, Laquinimod o ZK-117137. En ciertas realizaciones, el fármaco inmunomodulador es 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-1,3-propanodiol (FTY720). En ciertas realizaciones, el interferón es el interferón beta-1a (en particular Rebif® (Serono)).

El antagonista de IL-18R α (por ejemplo, un anticuerpo que se una selectivamente a IL-18R α , o un anticuerpo que se una selectivamente al dominio extracelular de IL-18R α , como se describe en este documento más arriba) y el segundo agente terapéutico como se describe en este documento más arriba puede administrarse simultáneamente, separadamente o secuencialmente. Por ejemplo, el antagonista de IL-18R α puede administrarse primero, seguido del segundo agente terapéutico. De forma alternativa, el segundo agente terapéutico puede administrarse primero, seguido del antagonista de IL-18R α . En algunos casos, el antagonista de IL-18R α y el segundo agente terapéutico se administran en la misma formulación. En otros casos, el antagonista de IL-18R α y el segundo agente terapéutico se administran en diferentes formulaciones. Cuando el antagonista de IL-18R α y el segundo agente terapéutico se administran en diferentes formulaciones, su administración puede ser simultánea o secuencial.

La invención se refiere además a un producto que comprende cualquiera de los antagonistas de IL-18R α anteriormente o posteriormente descritos, y un corticosteroide, fármaco inmunodepresivo, agente neuroprotector, fármaco inmunomodulador o interferón, como se describe en este documento más arriba, como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de la EM en un mamífero, preferiblemente un sujeto humano.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención serán descritos en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Los ratones transgénicos doble p35_l-IL-18_l son susceptibles a la EAE

Se ha demostrado anteriormente que la delección de 1L-12p35 produce ratones hipersusceptibles frente a la Encefalomielitis Autoinmune Experimental (EAE) inducida por el péptido MOG (glicoproteína de oligodendrocito de mielina) en ratones (Becher, B., et al. *J. Clin.*

Invest 110, 493-497 (2002)). El IL-18 actúa en sinergia con IL-12 para polarizar las células Th1 (células T adyuvantes tipo 1) y Shi *et al.* han producido pruebas que demuestran que los ratones deficientes en IL-18 son resistentes a EAE (Shi, F.D., et al., *J. Immunol* 165, 3099-3104 (2000)).

- 5 Para evaluar si IL-18 era capaz de compensar la pérdida de IL-12 en ratones p35_{-/-}, conduciendo así a su susceptibilidad frente a EAE, los inventores generaron ratones deficientes en ambos IL-12p35 y IL-18 (p35_{-/-} X IL-18_{-/-}).

10 Se inmunizaron subcutáneamente ratones ($n = 5$ ratones/grupo) con 200 μ g de péptido MOG₃₅₋₅₅ (secuencia de aminoácidos: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 11)), obtenido de GenScript, emulsionado en CFA (DIFCO, Detroit, MI). Los ratones recibieron 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich) intraperitonealmente en el momento de la inmunización y 48 horas más tarde.

15 Los ratones fueron valorados diariamente como sigue: 0) signos no detectables de EAE; 0,5) control cola distal; 1) control cola completa; 2) parálisis de pata posterior parcial unilateral; 2,5) parálisis de pata parcial bilateral; 3) parálisis de pata posterior bilateral completa; 3,5) parálisis de pata posterior completa y parálisis de pata anterior unilateral; 4) parálisis total de patas anteriores y posteriores (valoración > 4 que se eutanizan); 5) muerte. Cada punto de tiempo mostrado es la valoración de la enfermedad promedio de cada grupo. La significancia estadística se evaluó usando una prueba t de Student para datos no apareados.

20 La inmunización con MOG₃₅₋₅₅ emulsionado en CFA mostró que los ratones p35_{-/-} x IL-18_{-/-} son totalmente susceptibles a la EAE y tienen una valoración de enfermedad similar y un desarrollo como se produce en wt (véase Figura 1a). Por lo tanto, la falta de protección generada por la delección de IL-18 en ratones p35_{-/-} muestra que IL-18 no es responsable de inducir la susceptibilidad de EAE en ratones p35_{-/-} aunque también implica que el propio IL-18 es una citoquina que tiene poco efecto o ninguno en la patogénesis de EAE.

Ejemplo 2: Ratones de IL-18_{-/-}, pero no IL-18R α _{-/-}, son susceptibles a EAE

30 Como en los experimentos de los inventores en ratones p35_{-/-} x IL-18_{-/-} parecía contradictorio el papel patogénico anteriormente propuesto para IL-18 en EAE, los inventores inmunizaron activamente ratones wt y IL-18_{-/-} con el péptido MOG (como se describe en el ejemplo 1) y encontraron que los ratones IL-18_{-/-} eran completamente susceptibles a EAE y de hecho tuvieron una valoración clínica y una progresión de la enfermedad comparable a la de los ratones wt (véase Figura 1b y Tabla 1).

35 Se han descrito ratones deficientes en IL-18R α como con un fenotipo similar al de ratones IL-18_{-/-} en que se reduce la producción de IFN γ . De forma sorprendente, y en un fuerte contraste para ambos ratones wt y IL-18_{-/-}, los ratones IL-18R α _{-/-} fueron completamente resistentes frente a la inducción de EAE (véase la Figura 1b y la Tabla 1).

El análisis histológico de las médulas espinales de ratones wt, IL-18_{-/-} y IL-18R α _{-/-} obtenidas después de la inducción de EAE demostró que la infiltración de leucocitos en el SNC estaba bien correlacionada con la severidad clínica de la enfermedad.

40 Para hacer esto, los ratones fueron sometidos a eutanasia con CO₂, seguido de perfusión con PBS y posterior perfusión con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. La columna vertebral se retiró y se fijó en PFA al 4% en PBS. La columna vertebral se diseccionó entonces y se empapó en parafina antes de tefir con hematoxilina & eosina o anticuerpos CD3, B220 y MAC-3 (BD Pharmingen) para evaluar la infiltración de células inflamatorias o azul luxol rápido para
45 determinar el grado de desmielinización.

Los ratones wt y IL-18_{-/-} susceptibles a la EAE tuvieron una inflamación importante, caracterizada por la infiltración de células inflamatorias (Figura 2a) tales como células T (Figura 2c), macrófagos (Figura 2e) y células B (Figura 2d) y la desmielinización (Figura 2b), mientras que no había presencia de infiltrados inflamatorios o desmielinización en la columna vertebral
50 de ratones IL-18R α _{-/-} resistentes a EAE (Figura 2a-e).

Para verificar la incapacidad de ratones IL-18_{-/-} de secretar IL-18, los inventores verificaron extensivamente la estrategia de reconocimiento y genotipo de los ratones y pudieron establecer

claramente que los ratones IL-18^{-/-} no contienen mRNA de IL-18 o proteínas. Los inventores también analizaron si se podía detectar el IL-18 secretado de esplenocitos activados derivados de ratones wt y IL-18^{-/-}, lo que mostró que los ratones IL-18^{-/-} carecen, de hecho, completamente de IL-18 en contraste con los ratones wt (Véase la Figura 3).

5 Como se ha observado en muchos sistemas experimentales, la delección de IL-18 causa de forma consistente la rarefacción de una respuesta de IFN γ (Wei, X.Q. *et al J. Immunol.* 163, 2821-2828 (1999), Kinjo, Y. *et al J. Immunol.* 169, 323-329 (2002)), los inventores estimularon los linfocitos derivados de ratones wt, IL-18^{-/-} y IL-18R α ^{-/-} sin tratamiento *in vitro* con la lectina Concanavalina A (ConA) durante 16 horas y la producción de IFN- γ se midió posteriormente por ELISA.

10 Para hacer esto, se aislaron nodos linfáticos (LN) axilares e inguinales de ratones sin tratamiento. Se pusieron 2x10⁵ células como triplicados en una placa de 96 pocillos. Se usaron 5 μ g/ml de ConA para una estimulación durante 16 horas y la producción de IFN- γ se midió posteriormente por ELISA (Pharmingen, La Jolla, CA).

15 Consistente con el principio de que IL-18 tiene un efecto sobre la producción de IFN γ , las células LN de ambos ratones IL-18^{-/-} y IL-18R α ^{-/-} no secretaron IFN γ en contraste con las células LN de wt (Figura 4a).

Ejemplo 3: El bloqueo de IL-18R α previene EAE en ratones IL-18^{-/-}.

20 El comportamiento discordante de ratones deficientes de IL-18- y IL-18R α con respecto a EAE señala fuertemente a otro ligando de IL-18R α con poderosas propiedades encefalitogénicas. Con el fin de evaluar si IL-18R α y IL-18 tienen funciones biológicas independientes, los inventores bloquearon IL-18R α en ratones IL-18^{-/-} susceptibles de padecer EAE.

25 Se inmunizaron subcutáneamente ratones ($n = 5$ ratones/grupo) con 200 fig de péptido MOG₃₅₋₅₅ (secuencia de aminoácidos: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK (SEQ ID NO: 11)), obtenido de GenScript, emulsionado en CFA (DIFCO, Detroit, MI). Los ratones recibieron 200 ng de toxina pertussis (Sigma-Aldrich) intraperitonealmente en el momento de la inmunización y 48 horas más tarde. El anticuerpo monoclonal anti-IL-18R α (clon 112624) (R&D Systems) fue o no administrado tanto el 1 día de la pre-inmunización (450 μ g/ratón) y cada 3 días de éste en adelante (300 μ g/ratón) o cada 3 días comenzando desde el inicio de la enfermedad (300 μ g/ratón).

30 Los ratones fueron valorados diariamente como sigue: 0) signos no detectables de EAE; 0,5) control cola distal; 1) control cola completa; 2) parálisis de pata posterior parcial unilateral; 2,5) parálisis de pata posterior bilateral; 3) parálisis de pata posterior bilateral completa; 3,5) parálisis de pata posterior completa y parálisis de pata anterior unilateral; 4) parálisis total de patas anteriores y posteriores (valoración > 4 que se eutanizan); 5) muerte.

35 Cada punto de tiempo mostrado es la valoración de enfermedad promedio de cada grupo. La significancia estadística se evaluó usando una prueba t de Student para datos no apareados.

40 El tratamiento de ratones IL-18^{-/-} con anticuerpos anti-IL-18R α , dados 1 día pre-inmunización y cada 3 días desde éste en adelante hasta el final del experimento, redujo significativamente el desarrollo de la enfermedad (Figura 5a). La administración de anticuerpo anti-IL-18R α no condujo a la delección de células que expresaban IL-18R α ni cambió fuertemente la composición de los leucocitos periféricos en la sangre, LN o bazo (véase la Figura 11).

45 Combinando los hechos de que los antagonistas de IL-18R α previenen la EAE incluso en ratones en los que su ligando es completamente eliminado por reconocimiento génico y que se ha publicado IL-18 solo a baja afinidad frente a IL-18R α , los inventores proponen que otro ligando debe ser responsable de la unión, señalización y desarrollo inmune mediado por IL-18R α . De forma sorprendente, el tratamiento de ratones IL-18^{-/-} con anticuerpos antagonísticos después de la inmunización (día 10 p.i.) también interrumpió la progresión de EAE (Figura 5b) y esto ocurrió en el mismo grado que los anticuerpos que se administraban antes de la inmunización sugiriendo que la unión de IL-18R α es un importante acontecimiento durante la fase efectora de la EAE.

Ejemplo 4: Activación dirigida por mitógeno, pero no por Ag requiere IL-18 para la polarización de Th1

Dada la dicotomía entre ratones IL-18^{-/-} y IL-18R α ^{-/-} con respecto a la susceptibilidad de EAE, los inventores quisieron determinar la capacidad de ambos ratones para cebar apropiadamente y polarizar células T sin tratamiento hacia un fenotipo efector. Se inmunizaron subcutáneamente ratones wt, IL-18^{-/-} y IL-18R α ^{-/-} con KLH y 7 días después se aislaron los linfocitos y posteriormente se re-estimularon con KLH *in vitro*.

Para hacer esto, se aislaron nodos linfáticos axilares e inguinales de ratones cebados por inyecciones de 100 μ g/flanco de hemocianina de lapa californiana (KLH) (Sigma) emulsionada en CFA 7 días antes. Se pusieron 2x10⁵ células como triplicados en una placa de 96 pocillos. Las células con KLH se estimularon durante 48 horas con 50 μ g/ml KLH, 5 μ g/ml ConA o medio y 0,5 μ Ci/ml 3[H]-timidina se añadieron después de 24 horas para observar las respuestas proliferativas. La incorporación de timidina se evaluó usando una cosechadora Filtermate y un contador de centelleo y luminiscencia. Para el análisis de citoquina, el sobrenadante del cultivo de cultivos hermanos fue recolectado después de 48 horas y se analizó según la producción de IFN γ por ELISA (PharMingen, La Jolla, CA) y la secreción de citoquina/quimioquina global por un dispositivo de citoquina (Raybiotech).

Sorprendentemente, los inventores no observaron ninguna diferencia importante en la capacidad de producción de IFN γ de ratones IL-18^{-/-} y IL-18R α ^{-/-} y los niveles de IFN γ producidos por linfocitos derivados de ratones IL-18^{-/-} o IL-18R α ^{-/-} fueron idénticos al de las células obtenidas de ratones wt (Figura 4b). Además, la capacidad proliferativa de linfocitos dirigidos por Ag entre las diferentes cepas de ratón fue idéntica (Figura 4c). Los datos de los inventores apoyan la noción de que IL-18 es un co-factor crítico para la respuesta temprana de IFN γ de células T recientemente activadas policlonalmente (Figura 4a) aunque la polarización de Th1 conducida por Ag es más dependiente de IL-12 solo y así independiente de IL-18.

Aunque el desarrollo de T_H1 parecía no estar afectado en ratones IL-18R α ^{-/-}, los inventores a continuación quisieron evaluar la capacidad de células que presentaban el antígeno deficientes de IL-18R α (CPA) para cebar células T sin tratamiento.

Para hacer esto, los inventores co-cultivaron células dendríticas (CD) derivadas de (médula ósea) de wt, IL-18^{-/-} y IL-18R α ^{-/-}, pulsadas con péptido SMARTA maduro (p11)-con células T CD4₊ transgénicas SMARTA-TcR y se midió la proliferación mediante la incorporación de timidina (Figura 4d).

El protocolo usado fue el siguiente:

Generación de CD derivadas de ME: Se sometieron a eutanasia a ratones donantes de ME usando CO₂ y el fémur y la tibia fueron extirpados. Se aislaron células de ME infundiéndolo a los huesos PBS y se filtraron a través de un filtro celular de 100 μ m. Se cultivaron células (2-2,5x10⁶ en 10 ml) en RPMI completo con la adición de GM-CSF al 10%. Después de al menos 6 días, las CD derivadas de ME se maduraron con 10 μ g/ml de lipopolisacárido (LPS) toda la noche mientras que las CD derivadas de ME inmadura se mantuvieron en medio que contenía GM-CSF. Como mucho el día 7, las CD derivadas de ME fueron usadas experimentalmente.

Proliferación de células T transgénicas (Tg): Para la proliferación *in vitro* de células T transgénicas, se aislaron los bazo de ratones TcR Tg sin tratamiento y las células CD4₊ T se purificaron usando perlas magnéticas de BD Biomag. La pureza del aislamiento de células T se verificó por análisis FACS. Se cultivaron 1x10⁵ células T de Smarta en una placa de 96 pocillos junto con 300-30.000 células dendríticas derivadas de médula espinal inmadura o madura. Antes del co-cultivo, se pulsaron CD derivadas de ME con 1 μ g/ml del péptido p11 de SMARTA (GPDYKGVYQFKSVEFD (SEQ ID NO: 12)) (GenScript) en RPMI durante 3 horas, seguido del lavado y la irradiación con 2000 rads. Se usaron CD no pulsadas como control así como células T cultivadas solas. Las células se incubaron durante 4 días y se añadió ³[H]-timidina durante las últimas 18 horas de cultivo.

No se observó ninguna diferencia importante en el cebado de células T incluso cuando se usaron CD inmaduras para activar las células T de SMARTA.

Incluso aunque los datos anteriores impliquen que no había deficiencia en la capacidad de las CD de IL-18R $\alpha_{-/-}$ y las células T se volvieron activadas, los inventores decidieron confirmar el estado de activación de ambos tipos de células al nivel de expresión del marcador de activación. Los inventores observaron los marcadores de expresión de CD maduras de LPS así como de células T re-estimuladas con KLH por FACS, lo que mostró que no había diferencia en la sobre-regulación de CD80, CD86 y CD40 en CD de IL-18R $\alpha_{-/-}$ y que tampoco hubo diferencia en la expresión de CD5, CD62L y CD44 por las células T de IL-18R $\alpha_{-/-}$, en comparación con las células wt y IL-18 $\alpha_{-/-}$ (Figura 6). Por lo tanto, la lesión de IL-18R α no afecta a la activación de células T o CD, al menos no al nivel de sobre-regulación de los marcadores de superficie requeridos para la estimulación adecuada.

Ejemplo 5: Las células T CD4 $_{+}$ de IL-18R $\alpha_{-/-}$ invaden el SNC durante la EAE

La EAE se caracteriza por un influjo masivo de células inflamatorias en el SNC en el máximo de la enfermedad aunque las células inmunes también invadan el SNC antes del inicio de los síntomas clínicos (Hickey, W.F. *Brain Pathol.* 1, 97-105 (1991), Wekerle, H., *et al.*, *J. Exp. Biol.* 132, 43-57 (1987)). Por ejemplo, el reclutamiento de células T CD4 $_{+}$ en el SNC es crítico para la iniciación de la fase efectora de EAE aunque la infiltración de leucocitos polimorfonucleares en el SNC parece tener un papel en orquestar estos acontecimientos (McColl, S.R. *et al.*, *J. Immunol.* 161, 6421-6426 (1998)). Por lo tanto, para establecer si las células inflamatorias de IL-18R $\alpha_{-/-}$ están completamente ausentes del SNC en puntos de tiempo de la enfermedad pre-clínica, los inventores inmunizaron ratones y analizaron el SNC según los infiltrados inflamatorios los días 5, 7 y 9 después de la inmunización.

En contraste con la falta de células inmune en el punto final de la enfermedad en ratones IL-18R $\alpha_{-/-}$ (Figura 2a-e), las células CD4 $_{+}$ T de IL-18R $\alpha_{-/-}$ fueron capaces de infiltrarse en el SNC en el mismo grado que las de los ratones wt y IL-18 $\alpha_{-/-}$ los días 5, 7 y 9 después de la inmunización, según se analiza por citometría de flujo (Figura 7). También fueron comparables los números de granulocitos, macrófagos y células B presentes en el SNC. Sin embargo, como puede observarse de la figura 2, hay una diferencia importante en la presencia de células inflamatorias de IL-18R $\alpha_{-/-}$ en el SNC en los puntos de tiempo de la enfermedad clínica demostrando así su incapacidad de persistir durante la fase efectora de EAE. De forma sorprendente, estos resultados reflejan los datos obtenidos en ratones IL-23p19 $\alpha_{-/-}$, que son también resistentes a la EAE inducida por MOG₃₅₋₅₅ y en la que la deficiencia no previene la infiltración de células inflamatorias en el SNC, como se observa el día 7 después de la inmunización (Langrish, C.L. *et al.*, *J. Exp. Med.* 201, 233-240 (2005)).

Ejemplo 6: La falta de IL-18R α previene la producción de IL-17

Las similitudes entre ratones IL-18R $\alpha_{-/-}$ y IL-23 $\alpha_{-/-}$ con respecto a su resistencia frente a la EAE con la invasión de células inflamatorias concomitantes en el SNC, les provocó a los inventores evaluar el impacto de IL-18R α en la producción de IL-17 en los ratones de los inventores, las células T_H productoras de IL-17 (T_HIL-17) son aceptadas ahora por ser la principal población patogénica durante la inflamación autoinmune. Para definir las diferencias entre los ratones IL-18R $\alpha_{-/-}$ susceptibles a la EAE de IL-18 $\alpha_{-/-}$ y resistentes a la EAE con respecto a la secreción de citoquina, los inventores usaron un dispositivo de citoquina-proteína (Raybiotech) que permitía el análisis simultáneo de 62 citoquinas diferentes secretadas por los linfocitos en el encuentro de su repetición Ag cognada.

Los ratones wt, IL-18 $\alpha_{-/-}$ y IL-18R $\alpha_{-/-}$ se inmunizaron con KLH y 7 días después, se aislaron los linfocitos y se estimularon de nuevo con 50 μ g/ml de KLH (véase la figura 8).

En comparación con los linfocitos de IL-18 $\alpha_{-/-}$, los linfocitos de IL-18R $\alpha_{-/-}$ produjeron mucho menos IL-17. Para confirmar este hallazgo, los inventores analizaron los niveles de esta citoquina en ambos niveles de RNA y proteína. La PCR a tiempo real del ARN tomado de linfocitos bajo la re-estimulación con KLH mostró que la expresión de ambos ARN de IL-17 es significativamente menor en las células IL-18R $\alpha_{-/-}$ en comparación con las células de wt y IL-18 $\alpha_{-/-}$ (Figura 8a). Estos hallazgos fueron corroborados por ELISA de IL-17 usando el sobrenadante de las mismas células re-estimuladas con KLH (Figura 8b).

Ejemplo 7: La lesión de IL-18R α afecta a las células en el compartimento inmune de células accesorias

La falta de IL-18R α previene completamente el desarrollo de EAE vía la prevención del desarrollo de T_HIL-17, mientras que su supuesto ligando IL-18 parece ser irrelevante.

- 5 El tipo de célula en la que IL-18R α ejerce sus principales efectos queda desconocido. Esto es principalmente debido al hecho de que los IL-18R se expresan en diversos tipos de células y tejidos. Sin embargo, posiblemente se presume que la presencia de IL-18R α sobre las células CD4₊ T es absolutamente crítico para la posterior polarización de las células T_HIL-17. Con el fin de identificar la localización de la célula y del tejido de la lesión de IL-18R α en la EAE, los inventores expresaron selectivamente IL-18R α en células en el compartimento de leucocitos usando irradiación de quimeras de médula espinal (ME).

Irradiación de Médula Espinal (ME) de ratones quiméricos:

- 15 Se sometieron a eutanasia ratones donantes de ME usando CO₂ y se aislaron las células de ME insuflando los huesos de fémur, tibia, radio y cadera con solución tamponada de fosfato (PBS). Las células de ME se pasan entonces a través de un filtro celular de 100 μ m y las células se lavan con PBS. Los ratones receptores se irradiaron letalmente con 1100 rads (dosis de separación) y se inyectaron i.v. con 12-25x10⁶ células de ME. El injerto tuvo lugar a las 8 semanas de la recuperación.

- 20 Después de la irradiación y la reconstitución, el compartimento de CPA en los tejidos linfoides secundarios de los ratones receptores está comprendido enteramente de células ME derivadas de los ratones donantes (Becher, B., *et al*, *J. Exp. Med.* 193, 967-974 (2001)).

- 25 Los inventores generaron quimeras de ME transfiriendo tanto una relación 4:1 de ME de RAG_{-/-} como IL-18R α _{-/-} en receptores de wt (RAG_{-/-} + IL-18R α _{-/-} \rightarrow wt) o ME de IL-18R α _{-/-} solo en los receptores de wt (IL-18R α _{-/-} \rightarrow wt). La wt-ME fue transferida en los receptores de wt como control (wt \rightarrow wt) (Tabla 2).

Los ratones RAG_{-/-} no tienen linfocitos y la quimera resultante (RAG_{-/-} + IL-18R α _{-/-} \rightarrow wt) tiene así un compartimento de linfocitos deficiente de IL-18R α , mientras que la mayoría de todos los otros leucocitos tiene alelos de delección de IL-18R α .

- 30 Como se esperaba, los ratones IL-18R α _{-/-} \rightarrow wt eran resistentes a la EAE bajo la inmunización con el péptido MOG. De forma alternativa, la adición de ME de ratones RAG_{-/-}, que no tienen células T o B y que por lo tanto expresan IL-18R α solo en células accesorias, no en los linfocitos, fue capaz de superar la resistencia de ratones IL-18R α _{-/-} frente a la EAE (Figura 9). Por eso IL-18R α debe ejercer sus efectos primarios en el compartimento de las células accesorias (fagocitos mono- y poli-morfonucleados, células CD & NK). De nuevo, este hallazgo es altamente inesperado, dado que se piensa que IL-18 ejerce su efecto en células T y células NK, pero es completamente consistente con las observaciones de los inventores hasta el momento.

Ejemplo 8: La falta de IL-18R α sobre las células huésped previene el desarrollo de EAE inducida por la transferencia adoptiva de células T reactivas con MOG

- 40 Los anteriores datos indican que la falta de IL-18R α sobre las células accesorias no influye en el cebado de células T_H y la expansión. Además, las mezclas de quimeras de ME de RAG_{-/-} + IL-18R α _{-/-} \rightarrow wt (Figura 9) muestran claramente que la deficiencia de IL-18R α lesiona a la función vital de células accesorias para el desarrollo de EAE. Los inventores posteriormente realizaron un experimento de transferencia adoptiva para revelar el papel y la función de la señalización de IL-18R en células accesorias durante la EAE. Para hacer esto, los inventores transfirieron adoptivamente células T MOG-reativas encefalitogénicas derivadas de ratones donantes wt en grupos de tanto ratones receptores wt como IL-18R α _{-/-}. Como se esperaba, las células T completamente cebadas y activadas encefalitogénicas derivadas de ratones wt indujeron EAE en ratones receptores wt, aunque fueron incapaces de inducir la EAE clínica en huéspedes deficientes de IL-18R α (Figura 10). Este hallazgo resalta de nuevo que la deficiencia de IL-18R α lesiona los leucocitos no linfocíticos del huésped lo que es esencial para el desarrollo de EAE, independiente de la actividad de las células T.

Tabla 1

IL-18R es crítico para el desarrollo de la EAE activa en ratones			
Genotipos de ratón	Incidencia (%)	Día promedio del inicio de la enfermedad	Valoración clínica máxima promedio (+/- SEM)*
Wt	17/20 (85)	11,8	2,6 +/- 0,13
IL-18 ^{-/-}	20/22 (91)	12,8	2,35 +/- 0,13
IL-18R ^{-/-}	2/20 (10)	18,5	2,6 +/- 0,12
* de animales enfermos			

Tabla 2

Médula ósea de donante	Ratón receptor	Deficiencia de IL-18R
Wt	Wt	Sin lesión
IL-18R ^{-/-}	Wt	Todas las células
RAG ^{-/-} + IL-18R ^{-/-} (1:4)	Wt	Linfocitos

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zurich

5 <120> MÉTODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES AUTOINMUNES O
DESMIELINIZANTES

<130> EXT108 EP EPA

10 <160 > 12

<17u> PatentIn version 3.3

<210> 1

15 <2H> 1626

<212> ADN

<213 > Homo sapiens

<400> 1

ES 2 358 929 T3

```

atgaattgta gagaattacc cttgaccctt tgggtgctta tatctgtaag cactgcagaa      60
tcttgtactt cacgtcccca cttactgtg gttgaagggg aacctttcta tctgaaacat      120
tgctcgtgtt cacttgcaca tgagattgaa acaaccacca aaagctggta caaaagcagt      180
ggatcacagg aacatgtgga gctgaaccca aggagttcct cgagaattgc tttgcatgat      240
tgtgttttgg agttttggcc agttgagttg aatgacacag gatcttactt tttccaaatg      300
aaaaattata ctcagaaatg gaaattaaat gtcacagaa gaaataaaca cagctgtttc      360
actgaaagac aagtaactag taaaattgtg gaagttaaaa aattttttca gataacctgt      420
gaaaacagtt actatcaaac actggtcaac agcacatcat tgtataagaa ctgtaaaaag      480
ctactactgg agaacaataa aaacccaacg ataaagaaga acgccgagtt tgaagatcag      540
gggtattact cctgcgtgca tttccttcat cataatggaa aactatttaa taccacaaa      600
accttcaata taacaatagt ggaagatcgc agtaatatag ttccggttct tcttggacca      660
aagcttaacc atgttgcagt ggaattagga aaaaacgtaa ggctcaactg ctctgctttg      720
ctgaatgaag aggatgtaat ttattggatg ttcggggaag aaaatggatc ggatcctaata      780
atacatgaag agaagaaat gagaattatg actccagaag gcaaatggca tgcttcaaaa      840
gtattgagaa ttgaaaatat tggtgaaagc aatctaaatg ttttatataa ttgactgtg      900
gccagcacgg gaggcacaga caccaaaaagc ttcactcttg tgagaaaagc agacatggct      960
gatatcccag gccacgtctt cacaagagga atgatcatag ctgttttgat cttggtggca     1020
gtagtgtgcc tagtgactgt gtgtgtcatt tatagagttg acttggttct atttataga     1080
catttaacga gaagagatga aacattaaca gatggaaaaa catatgatgc ttttgtgtct     1140
tacctaaaag aatgccgacc tgaaaatgga gaggagcaca cctttgctgt ggagattttg     1200
cccagggtgt tggagaaca ttttgggtat aagttatgca ttttgaaag ggatgtagtg     1260
cctggaggag ctgttgttga tgaaatccac tactgatag agaaaagccg aagactaatc     1320
attgtcctaa gtaaaagtta tatgtctaata gaggtcaggt atgaacttga aagtggactc     1380
catgaagcat tgggtgaaag aaaaattaa ataacttaa ttgaatttac acctgttact     1440
gacttcacat tcttcccca atcactaaag cttttgaaat ctcacagagt tctgaagtgg     1500
aaggccgata aatctctttc ttataactca aggttctgga agaaccttct ttacttaatg     1560
cctgcaaaaa cagtcaagcc aggtagagac gaaccggaag tcttgcctgt tctttccgag     1620
tcttaa                                     1626

```

<210> 2

5 <211 > 541

<212 > PRT

<213 > Homo sapiens

<400> 2

ES 2 358 929 T3

Met Asn Cys Arg Glu Leu Pro Leu Thr Leu Trp Val Leu Ile Ser Val
 1 5 10 15
 Ser Thr Ala Glu Ser Cys Thr Ser Arg Pro His Ile Thr Val Val Glu
 20 25 30
 Gly Glu Pro Phe Tyr Leu Lys His Cys Ser Cys Ser Leu Ala His Glu
 35 40 45
 Ile Glu Thr Thr Thr Lys Ser Trp Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Gln Glu
 50 55 60
 His Val Glu Leu Asn Pro Arg Ser Ser Ser Arg Ile Ala Leu His Asp
 65 70 75 80
 Cys Val Leu Glu Phe Trp Pro Val Glu Leu Asn Asp Thr Gly Ser Tyr
 85 90 95
 Phe Phe Gln Met Lys Asn Tyr Thr Gln Lys Trp Lys Leu Asn Val Ile
 100 105 110
 Arg Arg Asn Lys His Ser Cys Phe Thr Glu Arg Gln Val Thr Ser Lys
 115 120 125
 Ile Val Glu Val Lys Lys Phe Phe Gln Ile Thr Cys Glu Asn Ser Tyr
 130 135 140
 Tyr Gln Thr Leu Val Asn Ser Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Cys Lys Lys
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Glu Asn Asn Lys Asn Pro Thr Ile Lys Lys Asn Ala Glu
 165 170 175
 Phe Glu Asp Gln Gly Tyr Tyr Ser Cys Val His Phe Leu His His Asn
 180 185 190
 Gly Lys Leu Phe Asn Ile Thr Lys Thr Phe Asn Ile Thr Ile Val Glu
 195 200 205
 Asp Arg Ser Asn Ile Val Pro Val Leu Leu Gly Pro Lys Leu Asn His
 210 215 220

ES 2 358 929 T3

Val Ala Val Glu Leu Gly Lys Asn Val Arg Leu Asn Cys Ser Ala Leu
 225 230 235 240

Leu Asn Glu Glu Asp Val Ile Tyr Trp Met Phe Gly Glu Glu Asn Gly
 245 250 255

Ser Asp Pro Asn Ile His Glu Glu Lys Glu Met Arg Ile Met Thr Pro
 260 265 270

Glu Gly Lys Trp His Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Glu Asn Ile Gly
 275 280 285

Glu Ser Asn Leu Asn Val Leu Tyr Asn Cys Thr Val Ala Ser Thr Gly
 290 295 300

Gly Thr Asp Thr Lys Ser Phe Ile Leu Val Arg Lys Ala Asp Met Ala
 305 310 315 320

Asp Ile Pro Gly His Val Phe Thr Arg Gly Met Ile Ile Ala Val Leu
 325 330 335

Ile Leu Val Ala Val Val Cys Leu Val Thr Val Cys Val Ile Tyr Arg
 340 345 350

Val Asp Leu Val Leu Phe Tyr Arg His Leu Thr Arg Arg Asp Glu Thr
 355 360 365

Leu Thr Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Ala Phe Val Ser Tyr Leu Lys Glu
 370 375 380

Cys Arg Pro Glu Asn Gly Glu Glu His Thr Phe Ala Val Glu Ile Leu
 385 390 395 400

Pro Arg Val Leu Glu Lys His Phe Gly Tyr Lys Leu Cys Ile Phe Glu
 405 410 415

Arg Asp Val Val Pro Gly Gly Ala Val Val Asp Glu Ile His Ser Leu
 420 425 430

Ile Glu Lys Ser Arg Arg Leu Ile Ile Val Leu Ser Lys Ser Tyr Met
 435 440 445

Ser Asn Glu Val Arg Tyr Glu Leu Glu Ser Gly Leu His Glu Ala Leu
 450 455 460

Val Glu Arg Lys Ile Lys Ile Ile Leu Ile Glu Phe Thr Pro Val Thr
 465 470 475 480

Asp Phe Thr Phe Leu Pro Gln Ser Leu Lys Leu Leu Lys Ser His Arg
 485 490 495

Val Leu Lys Trp Lys Ala Asp Lys Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Arg Phe

ES 2 358 929 T3

			500					505					510			
	Trp	Lys	Asn 515	Leu	Leu	Tyr	Leu	Met 520	Pro	Ala	Lys	Thr	Val 525	Lys	Pro	Gly
	Arg	Asp 530	Glu	Pro	Glu	Val	Leu 535	Pro	Val	Leu	Ser	Glu 540	Ser			
	<210>	3														
	<211>	119														
5	<212>	> PRT														
	<213>	Artificial														
	<220>															
	<223>	VH														
10	<400>	3														
	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Thr	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Ile
			20						25					30		
	Tyr	Ile	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35					40					45			
	Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Ala	Asn	Gly	Asp	Thr	Lys	Tyr	Gly	Pro	Asn	Phe
		50					55					60				
	Gln	Asp	Lys	Ala	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75				80	
	Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Arg	Arg	Gly	Asn	Tyr	Gly	Ala	Gly	Phe	Gly	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala									
			115													
	<210>	4														
15	<211>	108														
	<212>	> PRT														
	<213>	Artificial														

<220>

<223> VL

5 <400 > 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Gln Gly Lys Ser Pro Gln Ile Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Asn Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210 > 5

10 <211 > 10

<212 > PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Pesada de CDR1

<400 > 5

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Ile Tyr Ile Tyr
 1 5 10

20 <210 > 6

<211 > 18

<212 > PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Pesada de CDR2

5 <400 > 6

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Gly Pro Asn Phe Gln
 1 5 10 15

Asp Lys

<210 > 7

<211 > 10

10 <212 > PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Pesada de CDR3

15

<400 > 7

Arg Gly Asn Tyr Gly Ala Gly Phe Gly Tyr
 1 5 10

<210 > 8

20 <211 > 11

<212 > PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Ligera de CDR1

<400 > 8

Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

30 <210 > 9

<211 > 7

<212 > PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Ligera de CDR2

<400 > 9

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
 1 5

10

<210 > 10

<211 > 9

<212 > PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Ligera de CDR3

<400 > 10

Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Tyr Thr
 1 5

20

<210 > 11

<211> 21

<212 > PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> MOG 35-55

30 <400 > 11

ES 2 358 929 T3

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Leu
1 5 10 15

Tyr Arg Asn Gly Lys
20

<210 > 12

<211 > 17

5 <212 > PRT

<213> Artificial

<220>

<223> SMARTA p11

10

<400 > 12

Gly Pro Asp Ile Tyr Lys Gly Val Tyr Gln Phe Lys Ser Val Glu Phe
1 5 10 15

Asp

REIVINDICACIONES

1. El uso de un anticuerpo contra IL-18R α en el que el anticuerpo tiene un dominio de unión de antígeno que comprende seis CDR con una secuencia de aminoácidos que consiste en: SEQ ID NO: 5 que representa la cadena pesada de CDR1, SEQ ID NO: 6 que representa la cadena pesada de CDR2, SEQ ID NO: 7 que representa la cadena pesada de CDR3, SEQ ID NO: 8 que representa la cadena ligera de CDR1, SEQ ID NO: 9 que representa la cadena ligera de CDR2 y SEQ ID NO: 10 que representa la cadena ligera de CDR3 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad desmielinizante.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad desmielinizante es la esclerosis múltiple.
3. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el sujeto está afectado por esclerosis múltiple con recaídas y remisiones (RR), esclerosis múltiple progresiva secundaria (PS), esclerosis múltiple progresiva primaria (PP) o esclerosis múltiple con recaída progresiva (RP).
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se une selectivamente al polipéptido de SEQ ID NO: 2.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, internamente denominado Ab1 y compite con un anticuerpo seleccionado entre:

clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal 70614, clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal 70625, clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal B-E43 y/o clon de IL-18R α Anti-humano Monoclonal H44 para la unión a IL-18R α humano.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo contra IL-18R α se administra junto con un segundo agente terapéutico para tratar o prevenir la EM.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el anticuerpo contra IL-18R α se administra junto con corticosteroides, fármacos inmunodepresivos, agente neuroprotectores, fármacos inmunomoduladores o interferones.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo contra IL-18R α se administra junto con interferón-beta, preferiblemente con interferón beta-1a.
10. Un producto que comprende un anticuerpo contra IL-18R α en el que el anticuerpo tiene un dominio de unión de antígeno que comprende seis CDR con una secuencia de aminoácidos que consiste en: SEQ ID NO: 5 que representa la cadena pesada de CDR1, SEQ ID NO: 6 que representa la cadena pesada de CDR2, SEQ ID NO: 7 que representa la cadena pesada de CDR3, SEQ ID NO: 8 que representa la cadena ligera de CDR1, SEQ ID NO: 9 que representa la cadena ligera de CDR2 y SEQ ID NO: 10 que representa la cadena ligera de CDR3 y un corticosteroide, un fármaco inmunodepresivo, un agente neuroprotector, un fármaco inmunomodulador o un interferón como una preparación combinada para el uso simultáneo, separado o secuencial en la terapia de la esclerosis múltiple en un mamífero, preferiblemente un sujeto humano.
11. El producto de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el interferón es interferón-beta, preferiblemente el interferón beta-1a.

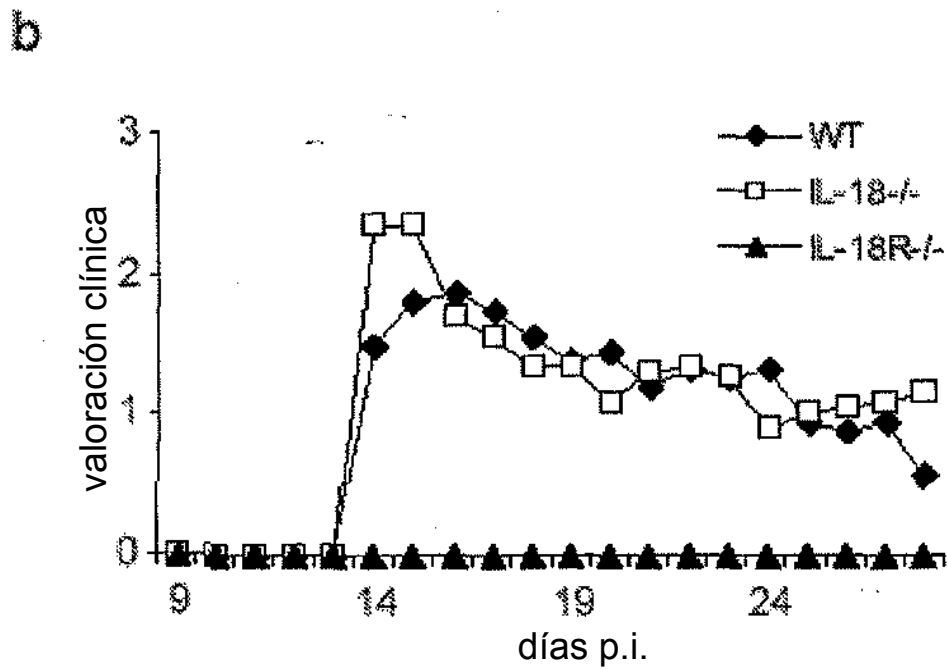
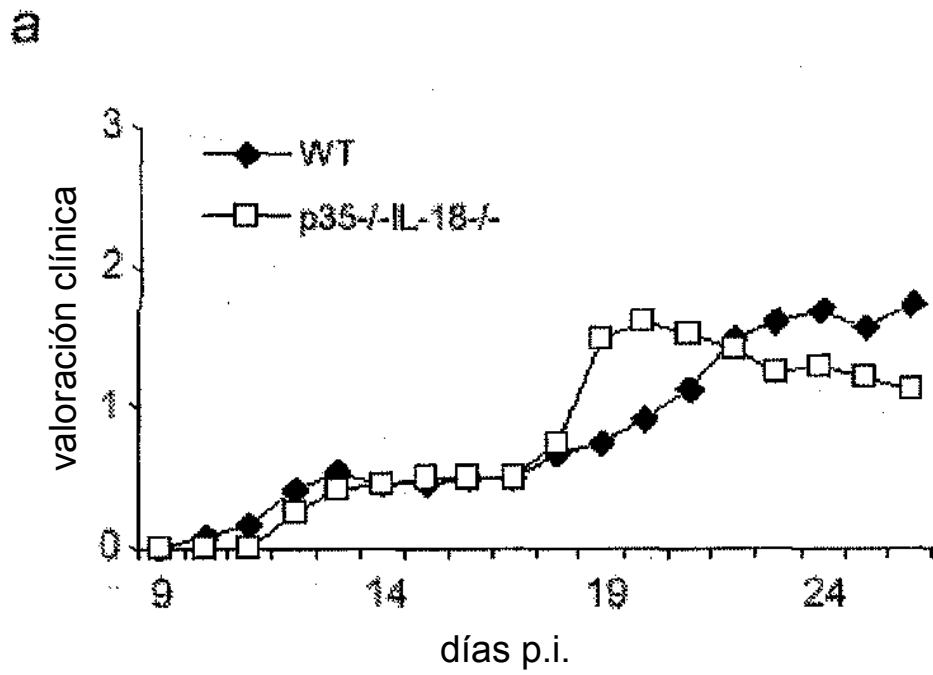


Figura 1

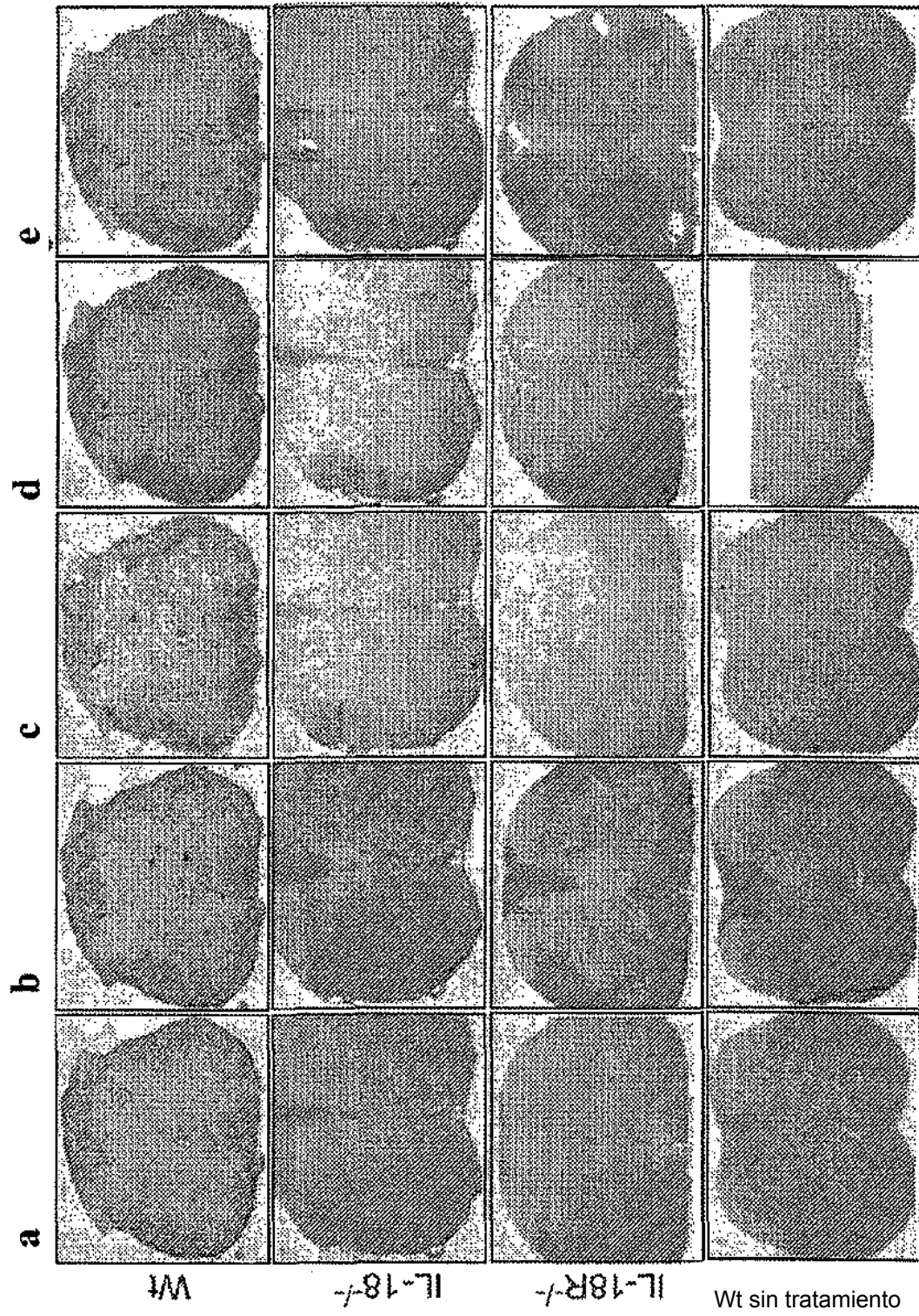


Figura 2

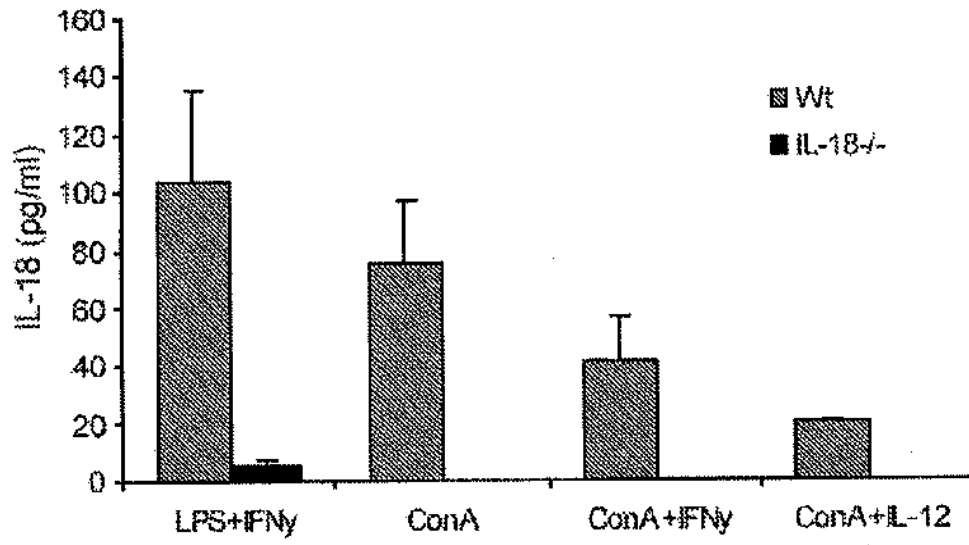


Figura 3

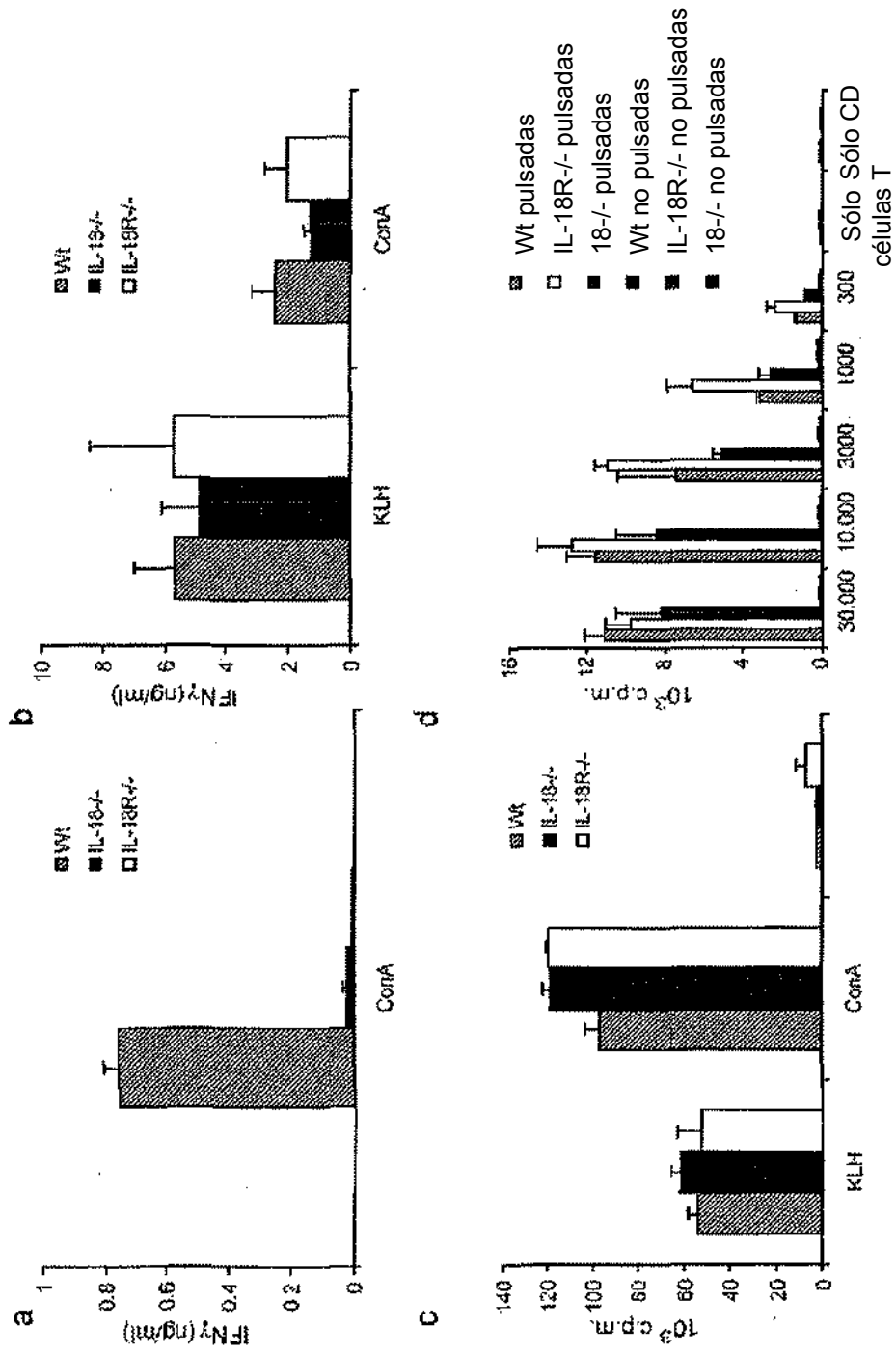


Figura 4

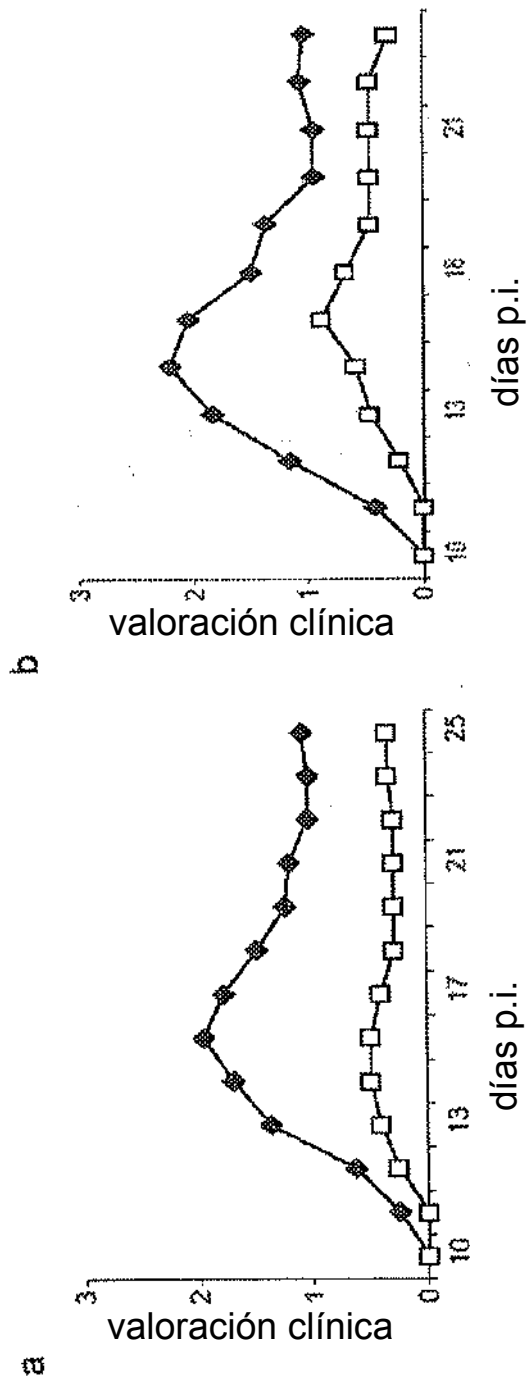


Figura 5

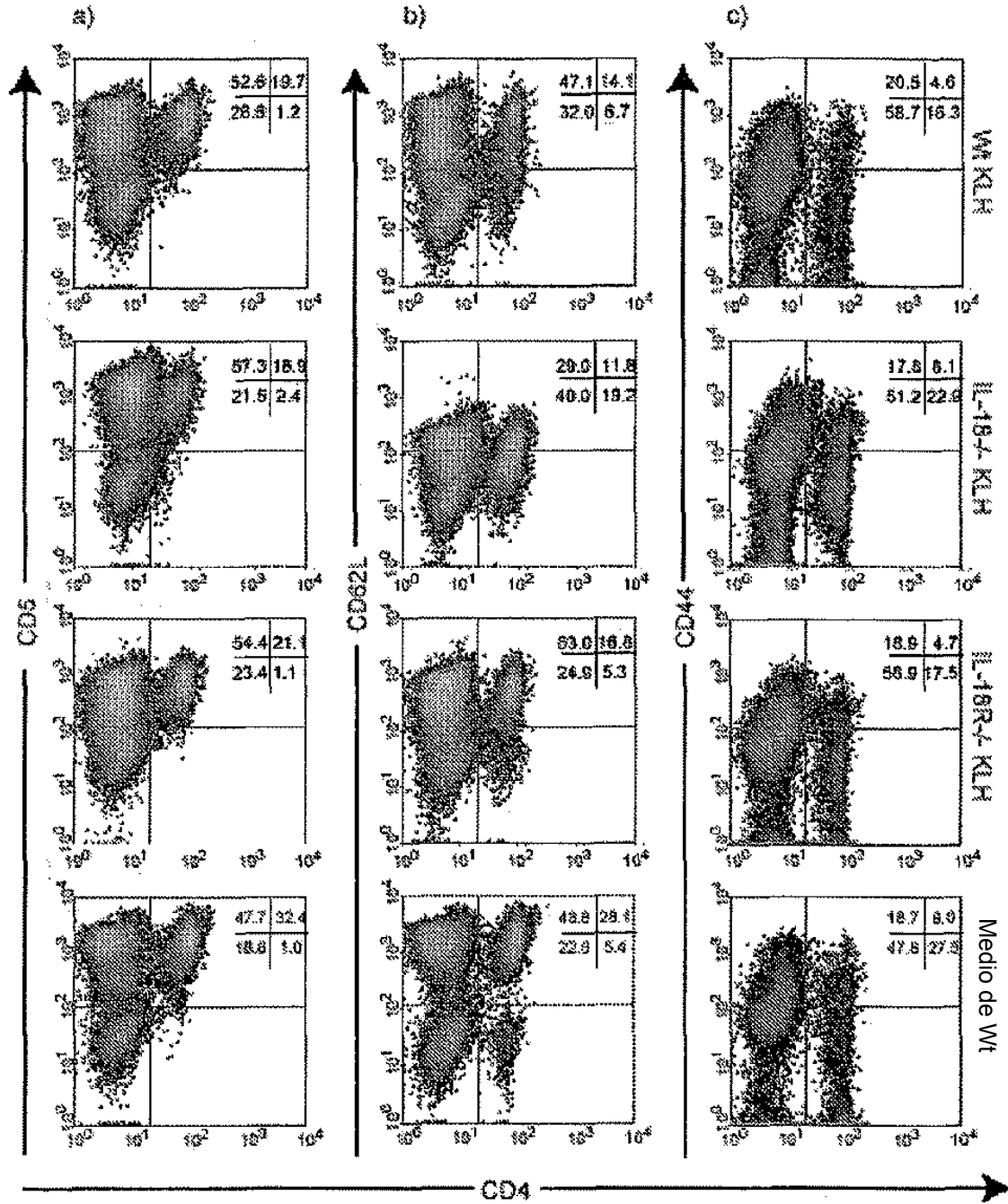


Figura 6

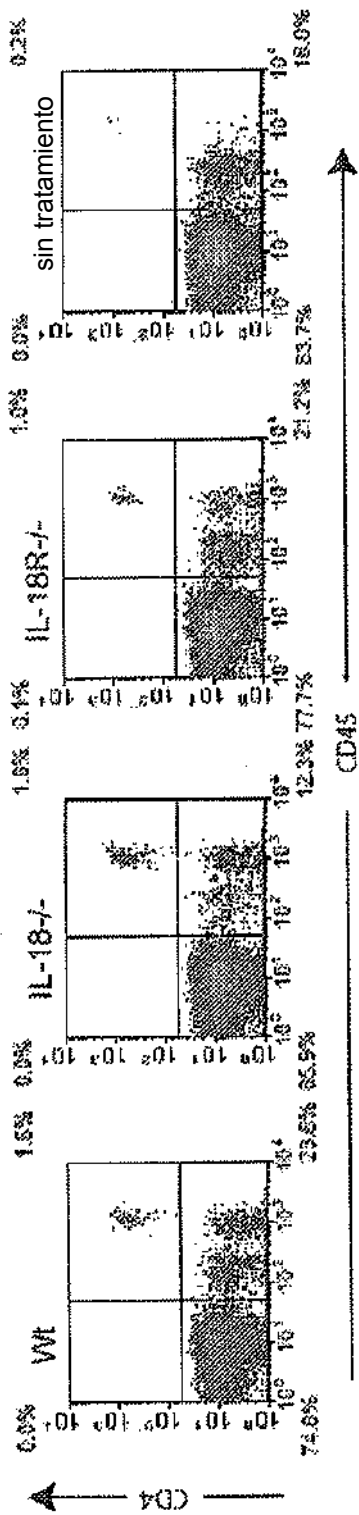


Figura 7

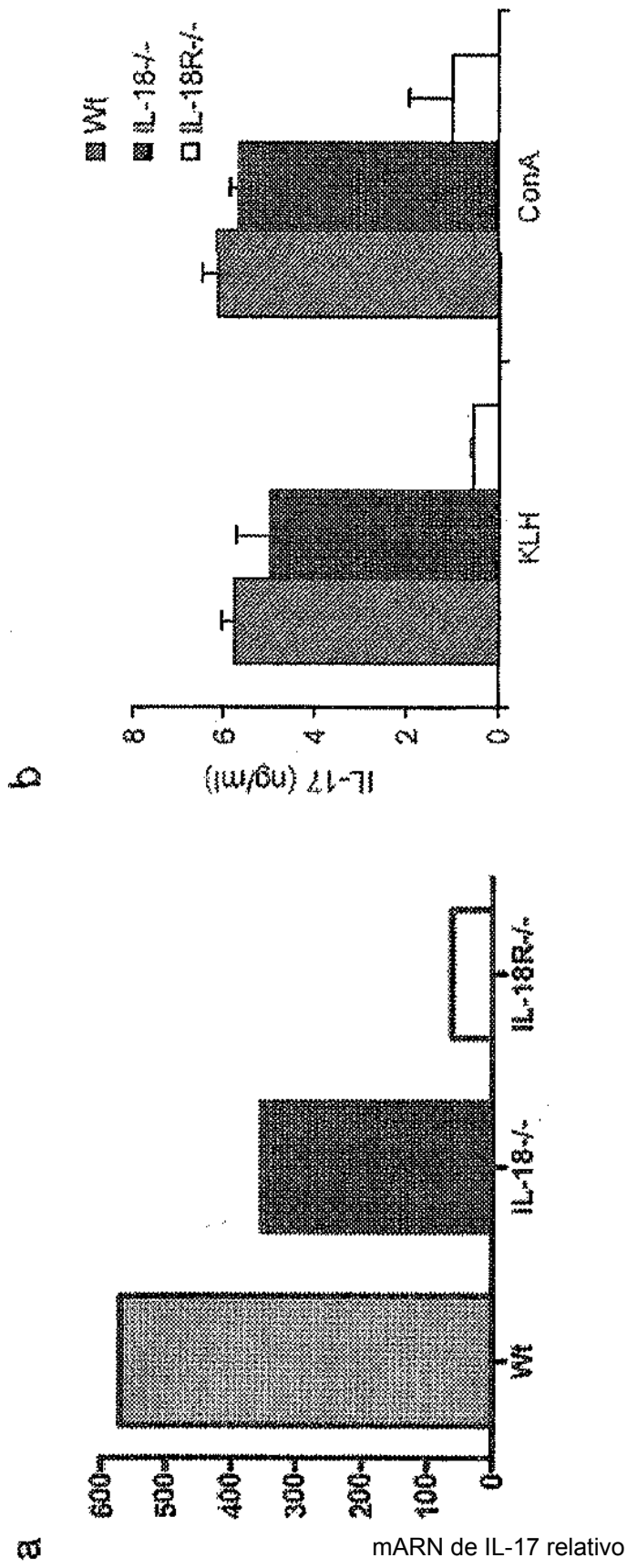


Figura 8

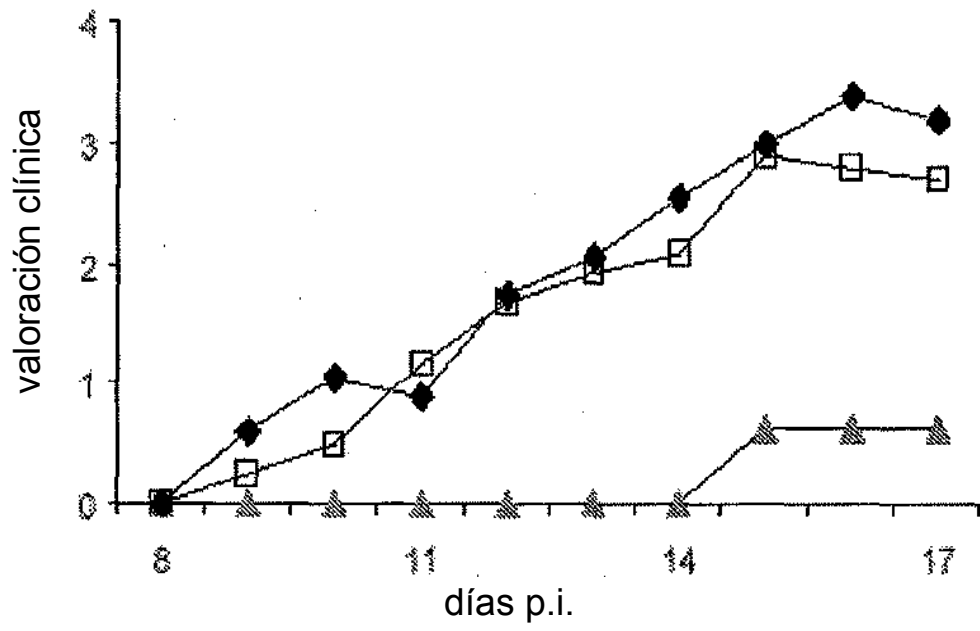


Figura 9

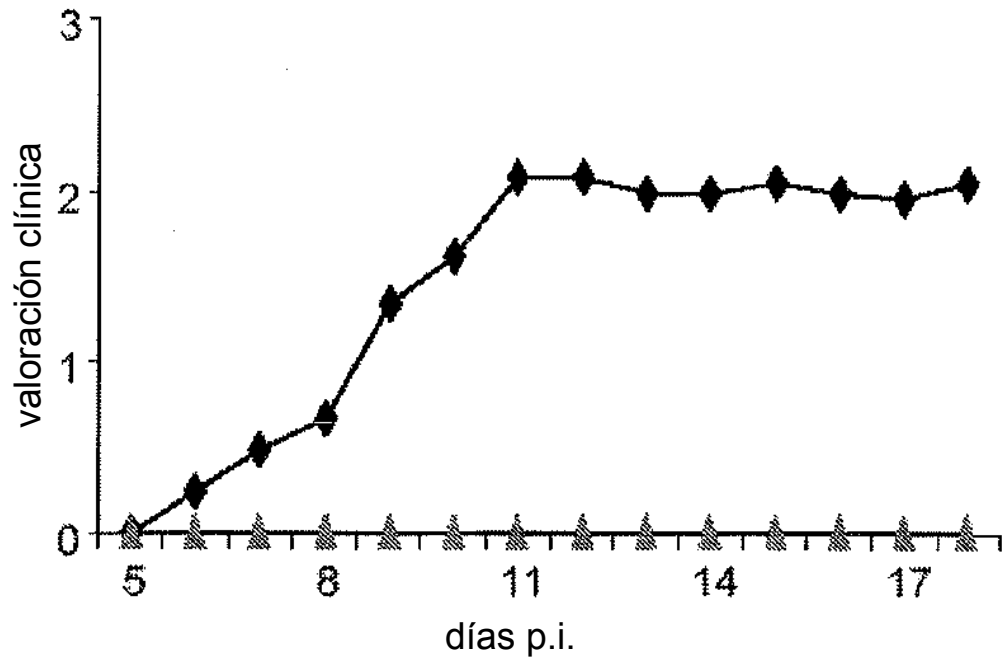


Figura 10

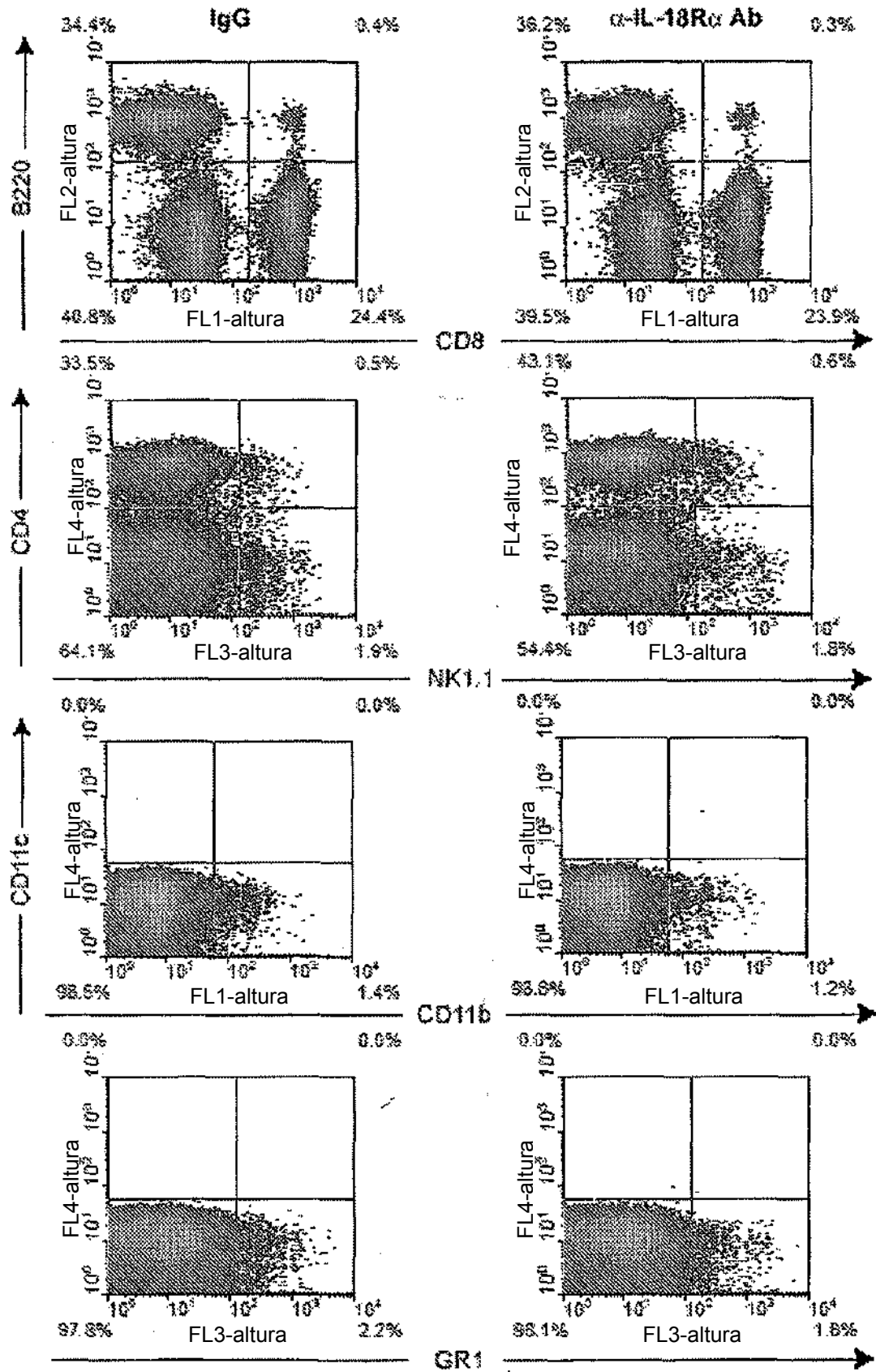


Figura 11