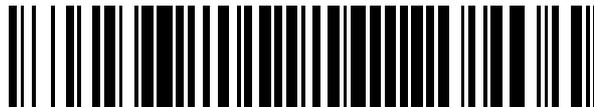


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 147**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2005** **E 05723881 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014** **EP 1720893**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento sistémico de la artritis**

30 Prioridad:

26.02.2004 US 548033 P

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

21.11.2014

73 Titular/es:

**BAYLOR RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
SUITE 125, 3434 LIVE OAK STREET
DALLAS, TX 75204, US**

72 Inventor/es:

**BANCHEREAU, JACQUES y
PASCUAL, VIRGINIA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 523 147 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

Composiciones y métodos para el tratamiento sistémico de la artritis

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento de artritis idiopática juvenil de aparición sistémica (AIJAS).

10 **Antecedentes de la invención**

La evolución y el pronóstico de la AIJAS son heterogéneos, ya que el cincuenta por ciento de los pacientes tiene una evolución monofásica con resolución de los síntomas, mientras que el cincuenta por ciento restante desarrolla una evolución recidivante y remitente crónica y una forma muy grave de artritis crónica poliarticular. Los pacientes con AIJAS también muestran un riesgo aumentado de desarrollar el síndrome hemofagocítico, una complicación posiblemente letal (Cassidy, JT y Ross, E. 2001. Textbook of Pediatric Rheumatology, 4ª Edición, Books on Demand Publishers, Visby, Suecia; p. 218-321).

Los niños con AIJAS presentan síntomas sistémicos graves (fiebre y erupción) que normalmente preceden al desarrollo de la artritis durante semanas a años. La fiebre alta en picos, que es la característica de esta enfermedad, normalmente sigue un patrón cotidiano con 1-2 picos/día. Los pacientes parecen estar característicamente bien cuando no hay fiebre, pero enferman bastante con los picos. En muchos pacientes, la fiebre viene acompañada de una erupción de color rosa salmón que se vuelve más aparente con la fiebre. Adicionalmente, los niños con AIJAS pueden tener hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pericarditis y otras manifestaciones de serositis. Estas manifestaciones sistémicas pueden durar desde semanas a meses y a la larga tienden a desvanecerse para dar lugar al desarrollo de la artritis crónica. Aproximadamente el 50 % de los pacientes presentarán implicación oligoarticular y con el tiempo se recuperarán. La otra mitad evolucionará hacia un patrón poliarticular, cuyo pronóstico se correlaciona con el número de articulaciones implicadas a los seis meses de la evolución de la enfermedad. Hasta el 48 % de los niños con AIJAS tendrán artritis activa diez años después de producirse el diagnóstico (Cassidy, JT y Ross, E. 2001. Textbook of Pediatric Rheumatology, 4ª Edición, Books on Demand Publishers, Visby, Suecia; p. 218-321; y Lomater C, et al., 2000. J Rheumatol 27:491-496).

No se dispone de ensayos específicos para establecer el diagnóstico de la AIJAS, ni hay indicadores de pronóstico conocidos para determinar su evolución clínica. La fiebre, la anemia, la leucocitosis y la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE) elevada son las características iniciales principales de la enfermedad, a veces durando varios meses antes de que pueda establecerse el diagnóstico. Como estos síntomas no son específicos y pueden imitar infecciones, neoplasias malignas y otras enfermedades, los pacientes se someten a una serie de ensayos de diagnóstico muy costosos y a hospitalizaciones prolongadas.

Una de las complicaciones más graves en los pacientes con AIJAS es el desarrollo del síndrome hemofagocítico, también conocido como síndrome de activación de macrófagos (SAM) (Cassidy, JT y Ross, E. 2001. Textbook of - Pediatric Rheumatology, 4ª Edición, Books on Demand Publishers, Visby, Suecia; p. 218-321). El síndrome hemofagocítico, que puede ocurrir también en el contexto de enfermedades infecciosas y neoplásicas, está asociado con morbilidad grave y/o muerte. Su etiología, especialmente en el contexto de la AIJAS, es desconocida. Los casos familiares del SAM ocurren como resultado de la destrucción vírica defectuosa debida a mutaciones en genes como perforina (implicada en la liberación de granzimas por linfocitos T citotóxicos/linfocitos citolíticos naturales contra células diana) o Rab27 (implicado en el control de la desgranulación vesicular de las granzimas).

En los pacientes con AIJAS, se ha descrito expresión anómala de IL-6, especialmente en la sangre antes de los picos febriles, y los niveles de IL-6 se correlacionan con la actividad sistémica de la enfermedad, con el desarrollo de artritis, y con el aumento en los reactantes de fase aguda (Yokata, S. 2003. "Interleukin 6 as a therapeutic target in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis", Curr Opin Rheumatol 15:581-586). La desregulación de la IL-6 también se ha propuesto para mediar el retraso del crecimiento lineal, la trombocitosis y la anemia observados en pacientes con AIJAS (de Benedetti F, et al., 1991). Arthritis Rheum 34:1158-1163; Mangge H, et al. 1999. J Interferon Cytokine Res 19:1005-1010; Ozen S, et al., 1997. Clin Rheumatol 16:173-178; de Benedetti F, et al., 1999. JRheumatol 26:425-431; Muller K, et al. 1998. Br J Rheumatol 37:562-569; Shahin A, et al., 2002. Rheumatol Int 22:84-88; de Benedetti F, et al, 1992. Clin Exp Rheumatol 10:493-498; y Muzaffer M, et al., 2002. J Rheumatol 29:1071-1078).

El documento US 2001/0053764 A1, publicado el 20 de diciembre de 2001, se refiere a métodos para tratar trastornos médicos caracterizados por niveles elevados o expresión anómala de IL-1 administrando un antagonista de IL-1, tal como el receptor de IL-1 de tipo II soluble.

El documento US 5.766.585 publicado el 16 de junio de 1998 se refiere al tratamiento génico sistémico de enfermedades del tejido conectivo administrando una secuencia de ácido nucleico que codifica IRAP (IL-1ra) o un receptor soluble de IL-1.

Ilowite et al, 2003, Annals of the Rheumatic Diseases, vol. 62, supl. 1, página 87, Annual European Congress of Rheumatology, describen un ensayo clínico para evaluar la seguridad y la eficacia de Anakinra en pacientes con artritis reumatoide juvenil (ARJ). Se requería que los sujetos tuviesen ARJ con evolución poliarticular activa.

- 5 La base de datos EMBASE con número de registro EMB-2003146647, Boykinov, *Pediatrya* 2003, vol. 43, N° 1, páginas 53-55 + 6, se relaciona con IL-1, IL-18, IL-15, con sus receptores y trasplantes autólogos de células madre en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias sistémicas, tales como la artritis idiopática juvenil (AIJ).

Sumario de la invención

10 Por lo tanto, la AIJAS sigue siendo una enfermedad inflamatoria crónica de etiología desconocida para la que no se ha determinado un tratamiento específico. A pesar de intensos estudios, el tratamiento multi-farmacológico de los pacientes con AIJAS es similar al de la oligoartritis y la poliartitis, que depende de la fase (fase sistémica frente a fase artrítica) de la enfermedad y de la extensión de la implicación. Mientras que una minoría de pacientes prospera con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), la mayoría de los niños requiere el uso de esteroides orales y/o parenterales así como metotrexato para controlar los síntomas. Se ha usado la inmunoglobulina intravenosa (IGIV) en casos recalcitrantes. Más recientemente, se está añadiendo la terapia anti-TNF (por ejemplo, etanercept e infliximab) a estos regímenes. Sin embargo, hay algunas limitaciones y riesgos asociados con estos fármacos. Por ejemplo, el tratamiento prolongado de estos pacientes con fármacos inmunosupresores, tales como metotrexato y esteroides, se ha asociado según los informes con una capacidad deteriorada de los pacientes para eliminar infecciones víricas. El tratamiento con inmunoglobulina intravenosa viene acompañado por los riesgos asociados a las transfusiones de productos derivados de la sangre. Los presentes inventores han descubierto que los pacientes con AIJAS no responden tan bien y requieren dosis más elevadas de agentes anti-TNF para controlar los síntomas en comparación con cualquier otro tipo de AIJ. Por lo tanto, hay una continua necesidad de identificar tratamientos farmacológicos eficaces para la enfermedad de la AIJAS.

El bloqueo de la IL-1 se ha descrito como un agente eficaz para tratar pacientes con artritis inflamatoria asociada a enfermedades autoinmunitarias. Previamente se han realizado estudios clínicos en adultos con artritis reumatoide y en niños con distintas formas de artritis juvenil. Anakinra (Kineret®, fabricado por Amgen), el antagonista del receptor de IL-1 recombinante humano tiene la capacidad de bloquear la interacción de la IL-1 con su receptor, bloqueando de esta manera la respuesta celular de la IL-1. Se ha llevado a cabo un ensayo clínico usando Anakinra en pacientes con artritis reumatoide grave. A 150 mg al día, se observó una velocidad de respuesta del 43 % basándose en el índice del Colegio Americano de Reumatología en comparación con el 27 % en el grupo tratado con placebo. Sin embargo, nunca se han realizado estudios clínicos usando antagonistas de IL-1, en niños o adultos con Artritis de Aparición Sistémica durante la fase sistémica de la enfermedad, como se define por la presencia de fiebre y/o erupción con o sin artritis. Además, se ha informado que la IL-1 no juega un papel relevante en la enfermedad de AIJAS (de Benedetti F, et al., 1995. "Circulating levels of interleukin 1 beta and of interleukin 1 receptor antagonist in systemic juvenile chronic arthritis", *Clin Exp Rheumatol* 13:779-84).

40 Las enfermedades autoinflamatorias son dolencias asociadas a alteraciones del sistema inmunitario innato. Las células del sistema inmunitario innato, por ejemplo, neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales (NK), se caracterizan por la ausencia de receptores generados de forma somática, la expansión clonal de células específicas de antígeno y su incapacidad para conferir "memoria inmunológica". Aunque las enfermedades autoinflamatorias pueden imitar clínicamente a las enfermedades autoinmunitarias, los pacientes con autoinflamación nunca desarrollan autoanticuerpos, que son la característica de muchas de las enfermedades autoinmunitarias. Por otra parte, la mayoría de las enfermedades autoinflamatorias producen fiebre, normalmente con un patrón intermitente o periódico, y la piel y las articulaciones son frecuentemente las dianas de la inflamación. En los últimos cinco años, se han descrito los genes responsables de al menos nueve enfermedades autoinflamatorias familiares. Estas incluyen Fiebre Mediterránea Familiar (FMF), Síndrome de Fiebre Periódica Asociada al Factor de Necrosis Tumoral (SPAFNT), Hiper IgD, Neutropenia Cíclica, Urticaria por Frío Familiar (UFF), Síndrome de Muckle-Wells, Síndrome Inflamatorio Crónico Neurológico y Articular (ICNA), Enfermedad Granulomatosa Familiar (Síndrome de Blau) y enfermedad de Crohn (revisado en Hull KM, et al., 2003. *Curr Opin Rheumatol* 15:61-69). Aunque la mayoría de las enfermedades autoinflamatorias son el resultado de mutaciones de genes sencillos, hay algunas que siguen rasgos genéticos complejos, como la colitis ulcerosa y algunas formas de la enfermedad de Crohn, y sin embargo algunas, como la enfermedad de Behcet, pueden no ser de origen genético.

A pesar de los informes en sentido contrario, los presentes inventores han descubierto que la AIJAS es una enfermedad autoinflamatoria y que la reducción o el bloqueo de la biodisponibilidad de la interleucina-1 beta (IL-1 β) es un tratamiento terapéutico eficaz para los pacientes con AIJAS. La presente invención proporciona un agente capaz de reducir o bloquear la biodisponibilidad de un receptor de interleucina-1 β para su uso en un método para tratar a un paciente pediátrico con artritis idiopática juvenil de aparición sistémica que comprende administrar al paciente pediátrico una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente; donde el agente es un anticuerpo que neutraliza la IL-1 β , un anticuerpo que bloquea a un receptor de IL-1 β o un péptido antagonista del receptor de IL-1.

65

La presente invención también proporciona el uso de un agente capaz de reducir o bloquear la biodisponibilidad de un receptor de interleucina-1 β para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente pediátrico que padece artritis idiopática juvenil de aparición sistémica; donde el agente es un anticuerpo que neutraliza a la IL-1 β , un anticuerpo que bloquea a un receptor de IL-1 β o un péptido antagonista del receptor de IL-1. En un ejemplo específico, el agente activo puede ser un antagonista del receptor de IL-1 producido de forma natural proporcionado a entre aproximadamente 1, 10, 15, 25, 50, 100, 125, 150, 175, 200 e incluso 250 mg al día. Normalmente las dosis pueden dividirse para pacientes pediátricos.

Una composición para tratar la AIJAS puede incluir una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes activos adaptados para la administración a una articulación que reduzca la inflamación de la articulación afectada por AIJAS. La composición puede ayudar a reducir uno o más de los siguientes síntomas: fiebre, erupción, artritis y recuento leucocitario de un paciente con AIJAS. La formulación farmacéutica puede adaptarse para tratar la autoinflamación articular y puede fabricarse disponible en una diversidad de formas de dosificación, incluyendo, intravenosa, intramuscular, oral, nasal, rectal, peritoneal, subcutánea, intracutánea (por ejemplo, un parche) y similares.

La presente invención también incluye un método para controlar una respuesta terapéutica para una enfermedad autoinflamatoria, por ejemplo, la AIJAS, controlando la fiebre, la erupción, la artritis, el recuento leucocitario y/o la velocidad de sedimentación leucocitaria después del tratamiento usando los métodos y las composiciones que se enseñan y se desvelan en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Para un entendimiento más completo de las características y las ventajas de la presente invención, se hace referencia ahora a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas y en las que:

La Figura 1 es una presentación gráfica de datos de una serie de genes que representa genes regulados positivamente (rojo), regulados negativamente (azul) o sin modificar (amarillo) tras la incubación de CMSP de cuatro voluntarios sanos con suero autólogo (SA) o con los sueros de tres pacientes con AIJAS;

La Figura 2A es un gráfico que compara la inducción de la secreción de la proteína Interleucina 1-Beta (IL-1 β) en CMSP sanas incubadas con sueros de AIJAS;

La Figura 2B es un gráfico que compara la inducción de la secreción de la proteína IL-1 β en pacientes con AIJAS con y sin síntomas sistémicos; y

Las Figuras 3A a F son gráficos que muestran los valores de temperatura (Figura 3A); el recuento de articulaciones activas (Figura 3B); el recuento leucocitario RL (Figura 3C); la hemoglobina (Figura 3D); el recuento de plaquetas (Figura 3E); y la VSE en 9 pacientes de AIJAS (Figura 3F).

Descripción detallada de la invención

Mientras que la fabricación y el uso de diversas realizaciones de la presente invención se describen en detalle a continuación, debería apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden realizarse en una amplia diversidad de contextos específicos. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento son meramente ilustrativas de modos específicos para fabricar y usar la invención y no delimitan el alcance de la invención.

Para facilitar el entendimiento de esta invención, a continuación se definen diversos términos. Los términos definidos en el presente documento tienen significados como los comúnmente entendidos por un experto habitual en la técnica en las áreas relevantes para la presente invención. Los términos tales como "un", "uno", "una" y "el/la" no pretenden referirse sólo a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la que puede valerse un ejemplo específico para ilustrar. Como se usa en la reivindicación (o en las reivindicaciones), junto con la expresión "que comprende", las palabras "un", "uno" o "una" pueden significar uno o más de uno. Como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo objeto o más. La terminología del presente documento se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, salvo por lo descrito en las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento, la expresión "terapéuticamente eficaz" se usa para definir la cantidad de un compuesto que es necesaria para mejorar algún síntoma asociado con una enfermedad autoinflamatoria, por ejemplo, la AIJAS. Por ejemplo, en el tratamiento de la autoinflamación, serían terapéuticamente eficaces, uno o más agentes activos que mejoran la salud o el movimiento de una articulación en cualquier grado o que detiene cualquier síntoma de una artritis. Para curar una enfermedad no se necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto sino que se proporcionará un tratamiento para una enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la frase “una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes activos que reduzca la biodisponibilidad de la interleucina-1 β ” es la cantidad de un inhibidor de la expresión, la traducción, el procesamiento, la liberación o la actividad de la IL-1 β ; y/o de los inhibidores de la expresión, la traducción, el procesamiento, la liberación o la actividad del o de los segundos mensajeros que están aguas abajo del receptor de IL-1 β cuando se administra en, a o sobre una articulación, o a un animal sistémica o localmente, que reduzca el alcance y la extensión de la autoinflamación.

Como se usa en el presente documento la expresión “receptor de interleucina-1 β ” se usa para describir el receptor afín para la interleucina-1 β . Como ejemplos no limitantes de agentes que pueden unirse específicamente a, tanto causando la activación del receptor como si no, incluyen: interleucina-1 β , anticuerpos anti-receptor de interleucina-1 β o fragmentos de los mismos, péptidos, proteínas, glucoproteínas, lipoproteínas, epítopes, lípidos, lectinas, carbohidratos, estructuras multi-moleculares y conformaciones específicas de una o más moléculas. Un “receptor” es una molécula o un complejo de moléculas de origen natural que está generalmente presente en la superficie de las células de un órgano, tejido o tipo celular diana, por ejemplo, una articulación.

Como se usa en el presente documento el término “modificar” o “modifica” significa que incluye regulación positiva o negativa de la función de un gen o un producto génico, por ejemplo, que afecta a la transcripción, la traducción, el procesamiento, la liberación o la modificación de un gen o un producto génico. El agente activo puede modificar la transcripción del gen de la interleucina-1 β . Los ejemplos de modificación incluyen, por ejemplo, silenciamiento transcripcional o post-transcripcional, cambios en la estabilidad del mensajero y similares. Los ejemplos de modificaciones post-traduccionales incluyen maduración del producto génico o proteína, modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, glucosilación, enlaces disulfuro, miristilación, escisión por proteasas, asociación con otras proteínas, ubiquitinación, etc.). El procesamiento, el transporte y la liberación de la proteína también puede modificarse, por ejemplo, colocándola en orgánulos de almacenamiento antes de la liberación, asociándola con otras proteínas que afectan a la liberación y similares.

Los presentes inventores han reconocido que la AIJAS es una enfermedad autoinflamatoria en lugar de una enfermedad autoinmunitaria. Por lo tanto, un aspecto del agente de la presente invención es que es para su uso en un método de tratamiento de la AIJAS que tiene como objetivo dirigirse a las células (y a los productos celulares) del sistema inmunitario innato en lugar de al sistema inmunitario adaptativo.

De acuerdo con la presente invención, ahora se ha descubierto que la IL-1 β es un mediador fundamental de la inflamación en enfermedades “autoinflamatorias”. Además, la modulación de la IL-1 β puede ser eficaz en el tratamiento de enfermedades autoinflamatorias, incluyendo pero sin limitación, la AIJAS.

En una realización de la invención la formulación incluirá una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que comprende un péptido antagonista del receptor de interleucina-1, un anticuerpo que bloquea un receptor de IL-1 β o un péptido antagonista del receptor de IL-1.

En particular, ahora se ha descubierto que la administración de un agente para reducir significativamente o bloquear eficazmente la biodisponibilidad de la interleucina-1 beta (IL-1 β) es una opción terapéutica para los pacientes con AIJAS. Como se usa en el presente documento, la reducción significativa de la biodisponibilidad de la IL-1 β se define como una reducción suficiente de la IL-1 β biodisponible para efectuar una reducción de los síntomas y/o la progresión de la enfermedad en los pacientes con AIJAS. En la presente invención, el agente capaz de reducir significativamente o bloquear eficazmente la biodisponibilidad de la IL-1 β es para su uso en un método que comprende administrar dicho agente a un paciente diagnosticado con AIJAS para efectuar una reducción de los síntomas y la progresión de la enfermedad. Se contempla que, a un paciente con AIJAS, se le pueda administrarse más de un agente capaz de reducir o bloquear la biodisponibilidad de la (IL-1 β) de manera simultánea o secuencial. También se contempla que, a un paciente con AIJAS, se le pueda administrar uno o más agentes capaces de reducir o bloquear la biodisponibilidad de la (IL-1 β) en combinación con otros tratamientos farmacológicos de manera simultánea o secuencial.

En una o más de las siguientes referencias se describen técnicas y composiciones para fabricar formas de dosificación útiles en la presente invención: United States Pharmacopeia (USP N° 24 NF19) (Hardcover Text w/ 3 Supplements) (United States Pharmacopeial 2002). Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (21ª Edición, anteriormente, Remington’s Pharmaceutical Sciences), Mack Publishing Co, 2005); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992), y similares.

Generalmente, a una persona que necesite intervención preventiva o terapéutica, las formulaciones terapéuticas útiles en la presente invención se proporcionarán en agua, en un aceite adecuado, en solución salina, en dextrosa acuosa (por ejemplo, glucosa, lactosa y soluciones relacionadas con azúcares) y en glicoles (por ejemplo, propilenglicol o polietilenglicoles) o en otros transportadores adecuados para administración intravenosa o parenteral. Las soluciones para la administración parenteral incluyen generalmente, una sal soluble en agua del principio activo, agentes estabilizantes adecuados y, si fuera necesario, sales tamponantes. El ácido cítrico y sus sales y/o el EDTA sódico pueden también incluirse para aumentar la estabilidad. Los agentes antioxidantes, por

ejemplo, bisulfito sódico, sulfito sódico y/o ácido ascórbico, solos o en combinación, son agentes estabilizantes adecuados. Además, las soluciones pueden incluir conservantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, cloruro de benzalconio, metil- o propil-parabeno y/o clorobutanol. En Remington (citado anteriormente), se describen transportadores farmacéuticos adecuados.

5 El agente para el uso de la invención puede comprender un péptido antagonista del receptor de interleucina-1. Los agentes ejemplares para la presente invención adecuados para bloquear a los receptores de IL-1 β incluyen, pero sin limitación, un antagonista del receptor de IL-1 de origen natural aislado. Un agente de este tipo disponible en el comercio es Anakinra (Kineret®, fabricado por Amgen), una forma recombinante del antagonista del receptor de IL-1 de origen natural.

10 El agente para el uso de la invención puede comprender un anticuerpo que neutralice la IL-1 β . El anticuerpo contra IL-1 β puede fabricarse por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos monoclonales inmunizando ratones con IL-1 β recombinante o con uno o varios péptidos sintéticos que incluyen epítopes que se consideran como altamente antigénicos. Como alternativa, también pueden suscitarse anticuerpos policlonales inmunizando conejos usando los antígenos descritos anteriormente. Los anticuerpos generados se examinan para determinar su capacidad para interactuar con la proteína IL-1 y su capacidad para bloquear las respuestas celulares mediadas por la IL-1. Después, una vez generados usando tecnología de hibridoma, los anticuerpos monoclonales se humanizan intercambiando regiones marco conservadas y regiones constantes de ratón y de ser humano. De acuerdo con la presente invención, los anticuerpos que bloquean el efecto biológico de la IL-1 β bloquean la liberación de la IL-8 inducida por la IL-1 desde los fibroblastos, como describen Kaplanski G et al. 1994. "Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism", Blood 84:4242-4248. Después, los anticuerpos de IL-1 β pueden administrarse por vía intravenosa o subcutánea a los pacientes con AIJAS en una cantidad eficaz para reducir significativamente o neutralizar eficazmente la función biológica de la IL-1 β .

20 De acuerdo con la presente invención, la respuesta terapéutica de los pacientes con AIJAS se controla evaluando la mejora clínica del paciente, es decir, la desaparición y/o la mejoría de la fiebre, la erupción y la artritis, así como la normalización del recuento leucocitario y de la velocidad de sedimentación.

30 Basándose en el descubrimiento de que el cultivo *in vitro* de sueros de pacientes con AIJAS con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) sanas da como resultado una inducción significativa de la transcripción de la IL-1 beta (IL-1 β) (Ejemplo 1), durante más de un año se trató a dos pacientes con enfermedad persistentemente activa con una medicación anti-IL-1 disponible en el comercio (Anakinra, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA), en lugar de con un tratamiento agresivo más convencional, que se sabe que neutraliza la actividad biológica de la IL-1. Como se ilustra en los Ejemplos 2 y 3, ambos pacientes se volvieron asintomáticos el día después del inicio de la terapia y permanecieron asintomáticos durante más de 3 meses.

40 Ejemplo 1: La incubación de CMSP sanas con suero de AIJAS induce la regulación positiva transcripcional de la Interleucina 1 β . Durante seis horas, se analizó *in vitro* el perfil de expresión génica de las CMSP de donantes sanos antes y después de la incubación con sueros autólogos o con sueros de dos pacientes sin tratar y de dos pacientes tratados con AIJAS. Después de la incubación con el suero, las CMSP se procesaron para extraer el ARN, y el ARN se hibridó con microplacas de micromatrices Affymetrix U133 A y B. De este modo, se exploró una amplia serie de genes cuya transcripción estaría regulada positiva o negativamente con el suero de AIJAS.

45 Población de Pacientes. Se recogieron CMSP y sueros de 23 pacientes con AIJAS (15 mujeres, 8 varones, edad promedio de 7,1 años) que cumplían los criterios³⁴ de diagnóstico del ACR (American College of Rheumatology) en repetidas ocasiones. Los pacientes se clasificaron como activos si tenían síntomas sistémicos (fiebre y/o erupción) y/o artritis activa (articulaciones inflamadas y/o blandas y limitadas). La población control consistía en 12 niños (promedio de 14 años) y 7 adultos (promedio de 35 años). Los sueros de los controles sanos se cultivaron en repetidas ocasiones con las CMSP autólogas y heterólogas. Los pacientes y los controles pediátricos que participaban en el estudio pertenecían al Hospital para Niños del Texas Scottthis Rite en Dallas. La Junta de Revisión Institucional del Centro Médico del Sudeste de UT, El Hospital del Texas Scottish Rite y el Sistema de Atención Sanitaria Baylor (IRB N°0199017, 0701-513) aprobaron el estudio y se obtuvo el consentimiento de los padres o los tutores legales.

50 Cultivos de CMSP y extracción de ARN. Las CMSP se obtuvieron por centrifugación en gradiente de Ficoll-Histopaque de 20 ml de sangre. Durante 6 horas las CMSP se cultivaron (10⁶/ml) en RPMI 1640 complementado con sueros autólogos o con sueros de pacientes con AIJAS al 20 %. El ARN se extrajo usando un kit RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA) y se evaluó usando un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA). Los sobrenadantes se congelaron a -80 °C. Las CMSP se cultivaron con RPMI 1640 y suero fetal de ternero al 10 % con PMA (50 ng/ml)-lonomicina (1 μ g/ml) durante 24 horas. Las células se recogieron y el ARN se extrajo como se ha indicado anteriormente. Los sobrenadantes se congelaron a -80 °C.

65

Micromatrices y PCR en Tiempo Real. Las muestras para el análisis de micromatrices se procesaron como se describe ¹⁸ y se hibridaron con la serie de GeneChip de Affymetrix HG U133A que contenía 22.283 conjuntos de sondas (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) a 45 °C durante 16 horas. Las series de GeneChip se lavaron de la tinción y se escanearon de acuerdo con los protocolos descritos en el Manual Técnico de Análisis de Expresión de GeneChip (Affymetrix). Los GeneChip escaneados se inspeccionaron visualmente para encontrar anomalías o irregularidades.

La Figura 1 es una representación de una serie de genes para la expresión de citocina-citocina. Incubación de CMSP sanas con suero autólogo (SA) o con el suero de 4 pacientes con AIJAS durante 6 horas *in vitro*. Se descubrió que el suero de AIJAS inducía la regulación positiva de la transcripción de miembros de la familia de la IL-1. El asterisco indica que, en las CMSP de pacientes con AIJAS, la transcripción génica se regula positivamente de manera significativa *in vivo*.

Análisis de Datos. Los valores de intensidad se graduaron a 500 usando una escala global en MAS 5.0 y los datos se exportaron a MS Excel para importar al software GeneSpring (Silicon Genetics, Redwood City, CA) para análisis de expresión génica. No se realizó normalización "por microplaca" ya que se había aplicado la escala global en MAS 5.0. Ajustes a escala global para variaciones de microplaca a microplaca en las intensidades de hibridación. Se normalizaron muestras posteriores a controles sanos pediátricos y/o a la media de todas las muestras. Se realizaron comparaciones estadísticas en GeneSpring usando métodos tanto paramétricos (ensayo de la t aproximada de Welch) como no paramétricos (ensayo de la U de Mann-Whitney). Se realizó agrupación jerárquica sin supervisión para visualizar transcritos que tuvieran una señal control de 50 o superior (superior a la intensidad de fondo) y que se identificaron como "presentes" de acuerdo con MAS 5.0 en el 15 % de todas las muestras. Se realizaron comparaciones estadísticas en GeneSpring usando métodos tanto paramétricos (ensayo de la t aproximada de Welch) como no paramétricos (ensayo de la U de Mann-Whitney). Se realizó agrupación jerárquica sin supervisión para visualizar relaciones de transcrito/muestra usando correlación estándar, correlación de Pearson o distancia Euclidiana donde se indica.

Se realizó RT-PCR en dos etapas usando conjuntos de cebadores y sondas a demanda para Ensayos TaqMan de Applied Biosystems de acuerdo con las instrucciones del fabricante y el Sistema de detección de Secuencia ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). Se usó el gen endógeno de la GAPDH y/o el ARN 18S para corregir los resultados con el método del ciclo umbral (C_T) comparativo para la cuantificación relativa como describe el fabricante.

Análisis Múltiple (Luminex). Se analizaron los sobrenadantes de cultivos de 6 citocinas y quimiocinas usando el kit de ensayo de citocinas FluorikineMAP (R&D Systems, Minneapolis, MN) siguiendo el protocolo del fabricante.

La Figura 2A es un gráfico que compara la inducción de la secreción de la proteína Interleucina 1-Beta (IL-1b) en CMSP sanas incubadas con sueros de AIJAS. Se ensayaron sobrenadantes de 6 horas de incubación de CMSP sanas con 12 sueros de AIJAS y 3 controles sanos para la producción de IL-1b por Luminex.

La Figura 2B es un gráfico que comprara la inducción de la secreción de la proteína IL-1b en pacientes con AIJAS con y sin síntomas sistémicos. La secreción de la proteína IL-1b se induce preferentemente por los sueros de pacientes con AIJAS que padecen síntomas sistémicos (AIJAS1, n=5) por encima de aquellos pacientes solo con artritis activa (AIJAS2, n=7). Todos los resultados se analizaron usando ensayos no paramétricos (Mann-Whitney).

Las figuras 3A a la F son gráficos que muestran los valores de temperatura (Figura 3A); el recuento de articulaciones activas (Figura 3B); el RL (Figura 3C); la hemoglobina (Figura 3D); el recuento de plaquetas (Figura 3E); y la VSE en 9 pacientes con AIJAS (Figura 3F). Los valores de X representan meses antes (-2) del inicio del tratamiento con Anakinra (0) y hasta 2-12 meses del seguimiento (media de 6,6 meses). Las flechas indican el tiempo del inicio del tratamiento. Los p-valores se calcularon a tiempo 0 y a 2 meses del seguimiento (ensayo de la t bilateral, emparejado).

Ejemplo 2: tratamiento con Interleucina 1 β de un paciente con AIJAS. Una mujer hispana de 17 años diagnosticada con AIJAS a los 15 años se trató de acuerdo con la presente invención. Presentaba fiebre diaria persistente (>2 meses), una erupción pruriginosa generalizada y dolor de articulaciones. En el examen, presentaba inflamación y limitación de las articulaciones radio-carpo y carpo-metacarpo bilateralmente. Sus ensayos de laboratorio revelaron recuento leucocitario (RL) alto, hemoglobina (Hgb) baja, plaquetas (Plts) altas y velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE) elevada. Un intenso estudio diagnóstico de la enfermedad infecciosa produjo resultados negativos. La paciente recibió una dosis oral e IV alta de metil prednisolona y con el tiempo se trató con metotrexato. Sus síntomas mejoraron, y la paciente fue asintomática durante varios meses durante los cuales el tratamiento con esteroides se redujo lentamente. Pocos meses después los síntomas volvieron a producirse. Se reinició el tratamiento con esteroides sin éxito. Se probó una terapia IV anti-TNF (Infliximab) a una dosis de 5 mg/kg cada mes durante aproximadamente 6 meses sin ningún efecto significativo. Después de que la paciente hubiera sido asintomática durante más de un año, se administró un antagonista de IL-1 en forma de Anakinra, 100 mg (1 cc) como una inyección diaria subcutánea. El día después de la primera inyección subcutánea, la paciente era asintomática, desapareciendo la fiebre, la erupción y la inflamación de las articulaciones. Dos visitas de seguimiento confirmaron que permaneció asintomática al cabo de 2 y 3 después del inicio de la terapia. Los ensayos de

laboratorio también reflejaron esta respuesta, al igual que el RL, la Hgb, el número de Plt y la VSE, que estaban dentro de los límites normales.

5 Ejemplo 3: tratamiento con interleucina 1 β de un paciente con AIJAS. Un varón hispano de 9 años se diagnosticó con AIJAS a los 7 años, cuando presentaba fiebre en picos diaria prolongada, erupción, pericarditis y dolor de articulaciones y músculos. Los ensayos de laboratorio mostraron RL alto, Hgb baja, plaquetas altas y VSE elevada. El análisis de la médula ósea y un intenso estudio diagnóstico infeccioso no produjeron un diagnóstico específico. El paciente fue tratado con dosis alta IV de metilprednisolona, y los síntomas mejoraron. Durante los dos años siguientes, el paciente presentó brotes y remisiones. El último brote no respondió a dosis alta de esteroides, y el

10 paciente desarrolló inflamación sobre las articulaciones radio-carpo bilateralmente. Se inició la terapia con Anakinra, antagonista de IL-1, a una dosis de 50 mg (0,5 cc) como una inyección diaria subcutánea. El día después de la primera inyección subcutánea, el paciente se volvió asintomático, desapareciendo la fiebre, la erupción, el dolor y la inflamación de las articulaciones y permaneció sin síntomas durante más de tres meses.

15 Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de esta invención pueden emplearse en diversas realizaciones sin alejarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, usando simplemente experimentación rutinaria, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en el presente documento. Se considera que dichos

20 equivalentes están dentro del ámbito de esta invención y que se incluyen en las reivindicaciones.

A la vista de la presente divulgación, todas las composiciones y/o métodos descritos y reivindicados en el presente documento pueden fabricarse y ejecutarse sin excesiva experimentación. Aunque las composiciones y los métodos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, será obvio para los expertos en la técnica que puedan aplicarse variaciones a las composiciones y/o a los métodos y en las etapas o en la secuencia de

25 etapas del método descrito en el presente documento sin alejarse del alcance de la invención. Más específicamente, será obvio que determinados agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente puedan sustituirse por los agentes descritos en el presente documento mientras que se obtengan los mismos resultados o similares. Se considera que todos estos sustitutos y modificaciones similares, que resultan obvios para los expertos

30 en la técnica, están dentro del alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente capaz de reducir o de bloquear la biodisponibilidad de un receptor de interleucina-1 β , para su uso en un método para tratar a un paciente pediátrico con artritis idiopática juvenil de aparición sistémica que comprende administrar al paciente pediátrico una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente; en el que el agente es un anticuerpo que neutraliza la IL-1 β , un anticuerpo que bloquea el receptor de IL-1 β o un péptido antagonista del receptor de IL-1.
- 10 2. El agente para el uso de la reivindicación 1, en el que el agente comprende un péptido antagonista del receptor de interleucina-1.
3. El agente para el uso de la reivindicación 1, en el que el agente comprende un anticuerpo que bloquea un receptor de IL-1 β .
- 15 4. El agente para el uso de la reivindicación 1, en el que el agente comprende un anticuerpo que neutraliza la IL-1 β .
5. El agente para el uso de la reivindicación 2, en el que el agente comprende una forma recombinante de un péptido antagonista del receptor de IL-1 de origen natural proporcionado a entre aproximadamente 1 a 250 mg al día.
- 20 6. Un método para controlar una respuesta terapéutica de la AIJAS que comprende las etapas de controlar la fiebre, la erupción, la artritis, el recuento leucocitario y la velocidad de sedimentación leucocitaria después del tratamiento usando el método como se define en la reivindicación 1.
- 25 7. El uso de un agente capaz de reducir o bloquear la biodisponibilidad de un receptor de interleucina-1 β para la preparación de un medicamento para tratar a un paciente pediátrico que padece artritis idiopática juvenil de aparición sistémica; en el que el agente es un anticuerpo que neutraliza la IL-1 β , un anticuerpo que bloquea a un receptor de IL-1 β o un péptido antagonista del receptor de IL-1.
- 30 8. El uso de la reivindicación 7, en el que el agente comprende un péptido antagonista del receptor de interleucina-1.
9. El uso de la reivindicación 7, en el que el agente comprende un anticuerpo que bloquea un receptor de IL-1 β .
- 35 10. El uso de la reivindicación 7, en el que el agente comprende un anticuerpo que neutraliza la IL-1 β .

Receptores de citocina-citocina

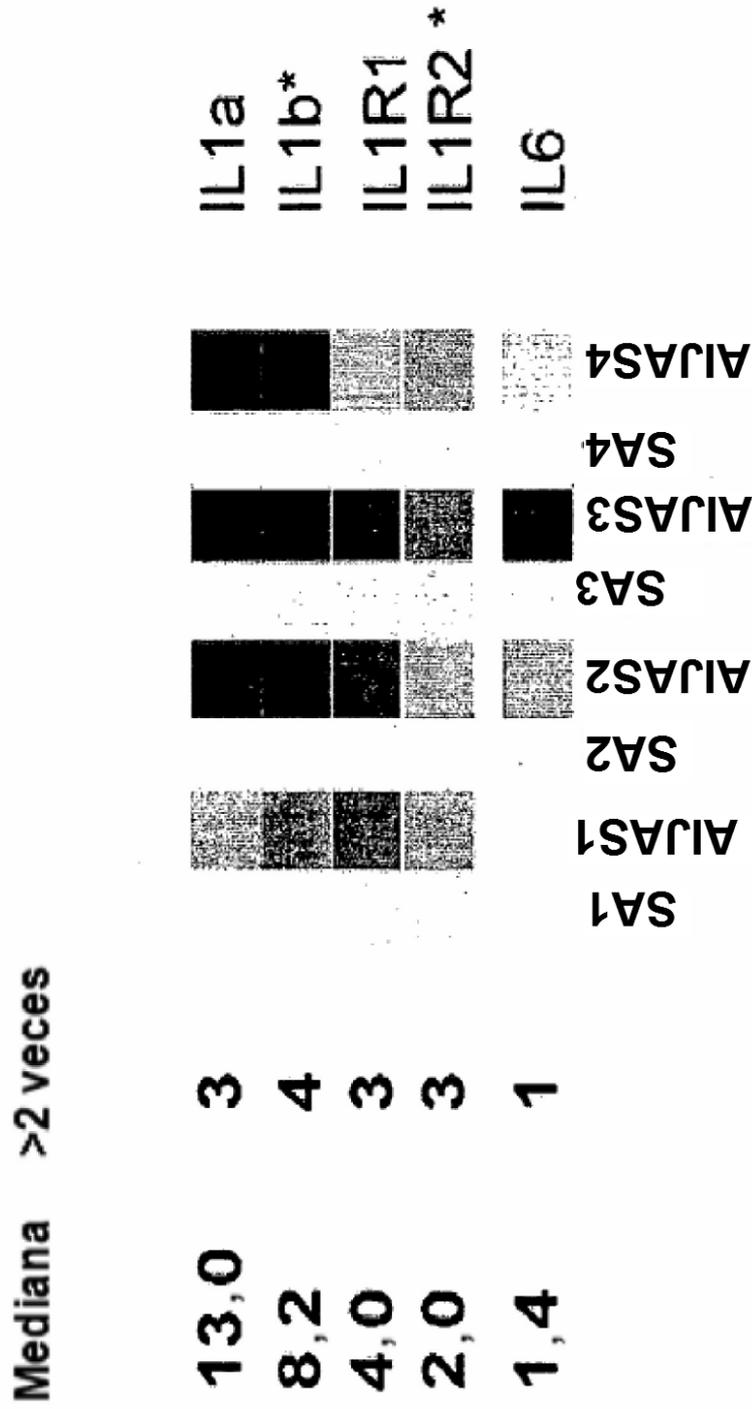


Figura 1

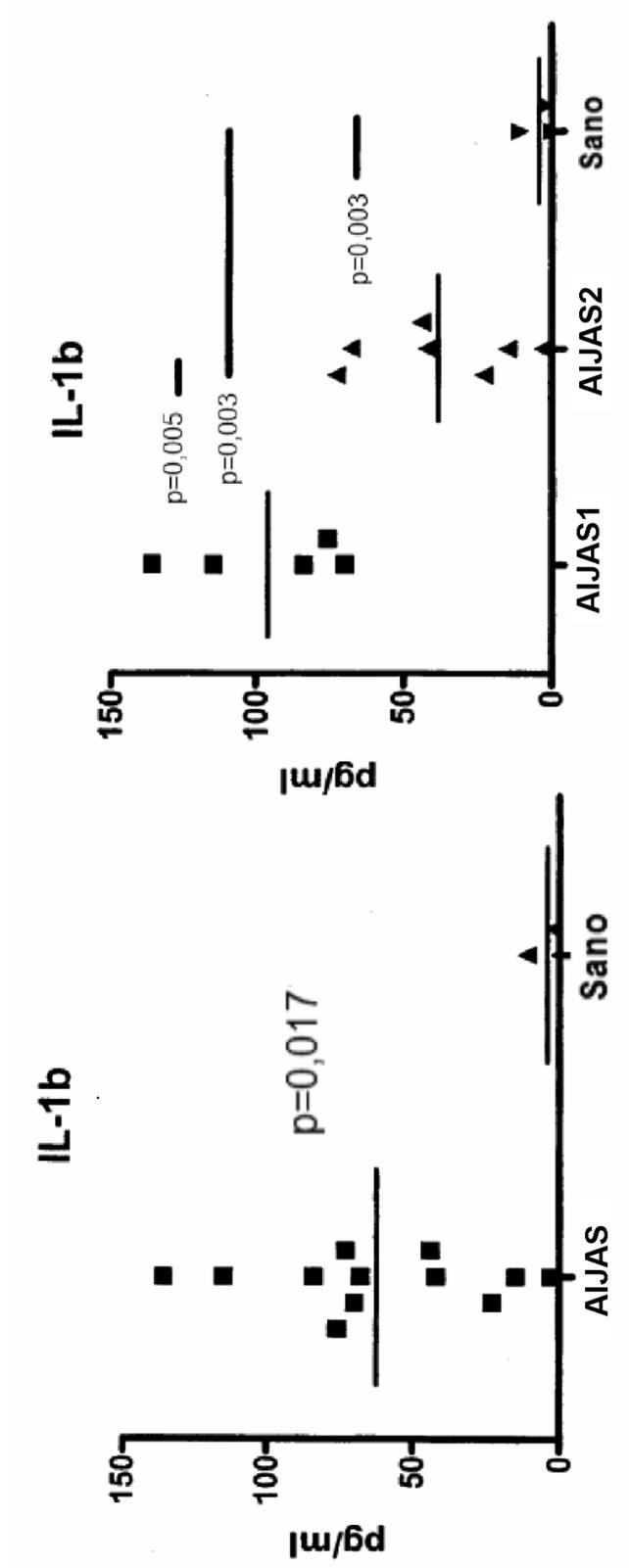


Figura 2B

Figura 2A

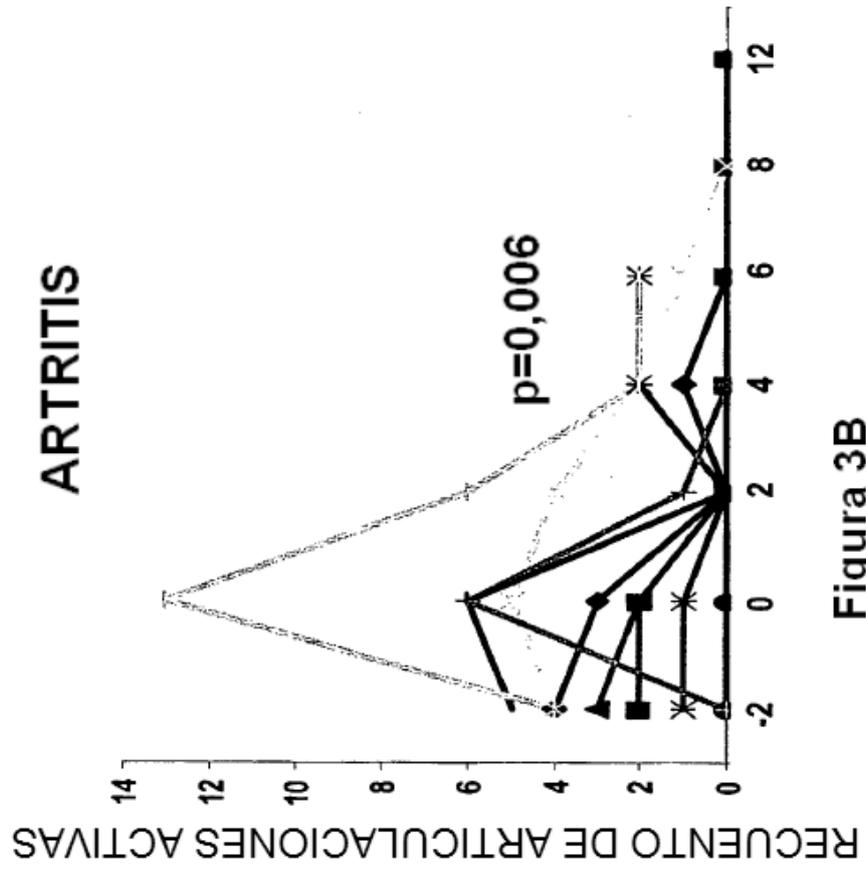


Figura 3B

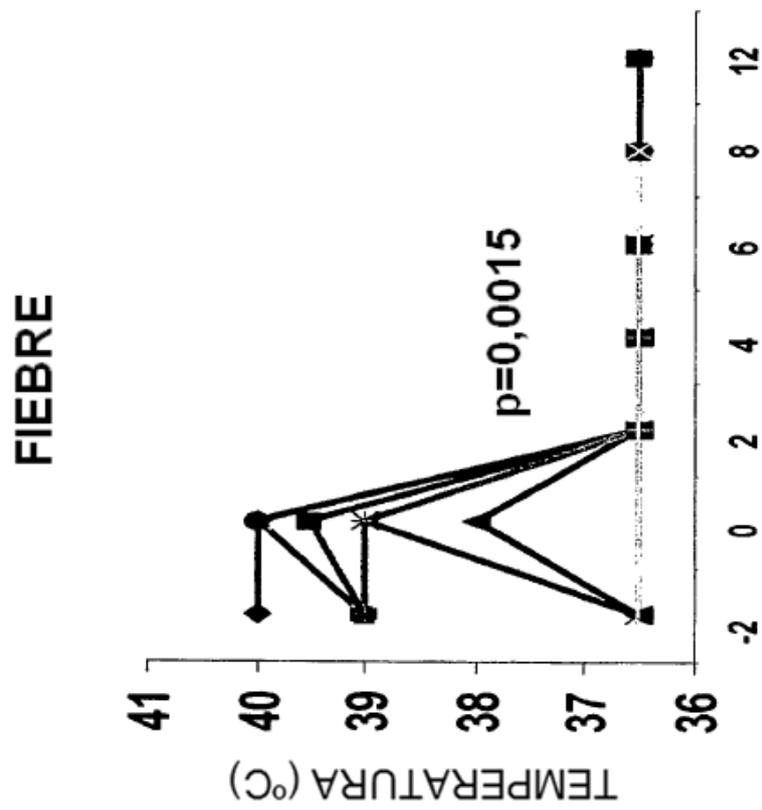


Figura 3A

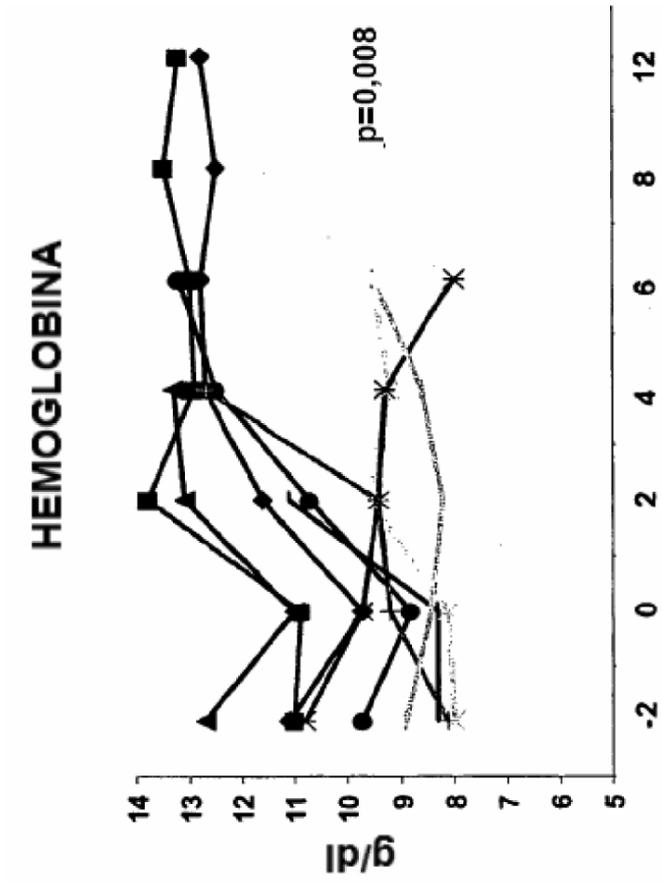


FIGURA 3D

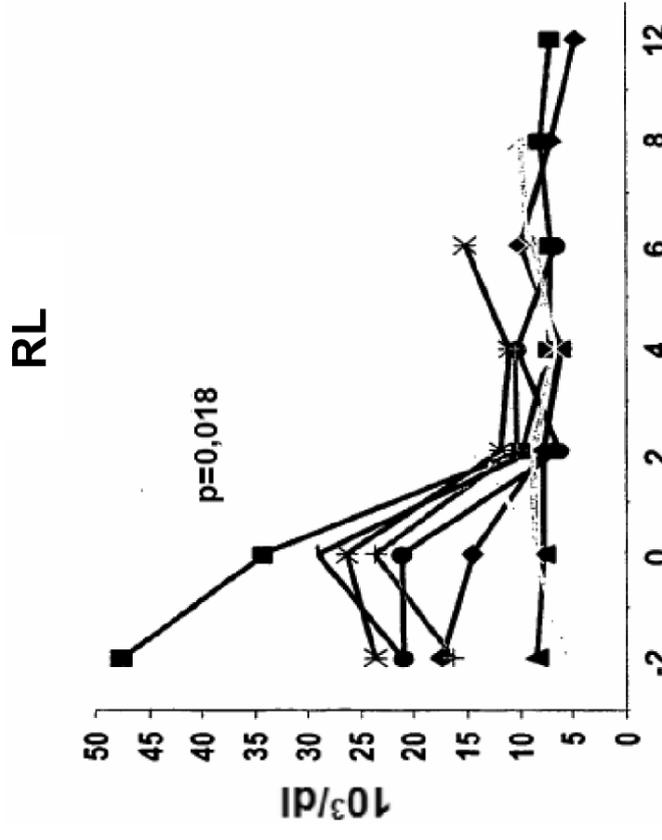


FIGURA 3C

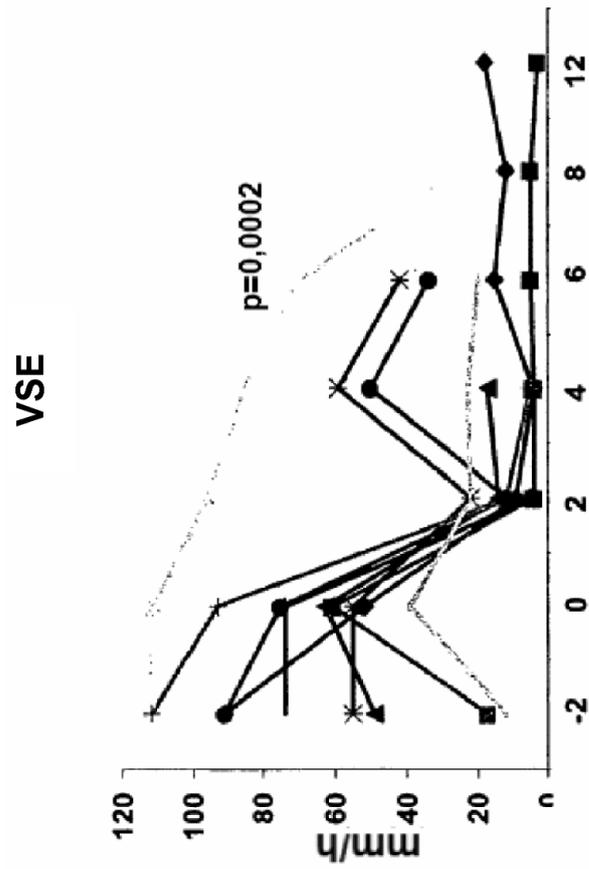


FIGURA 3F

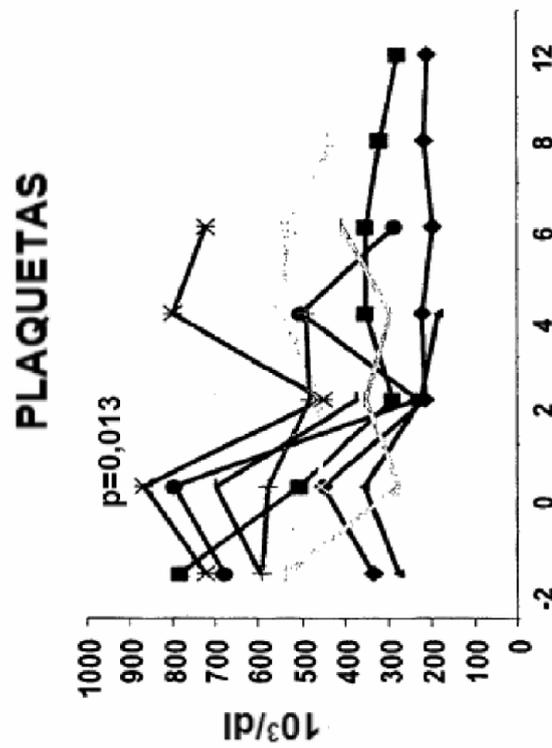


FIGURA 3E