

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 253**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2002 E 02767299 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 1423138**

54 Título: **Uso de inhibidores de IL-18 en trastornos de hipersensibilidad**

30 Prioridad:

**10.08.2001 EP 01118811**  
**20.06.2002 EP 02100735**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.04.2015**

73 Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)**  
**CENTRE INDUSTRIEL**  
**1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:

**CHVATCHKO, YOLANDE y**  
**KOSCO-VILBOIS, MARIE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 533 253 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

Uso de inhibidores de IL-18 en trastornos de hipersensibilidad

**Campo de la invención**

5 La presente invención está en el campo de las alergias. Más específicamente, se refiere al uso de un inhibidor de IL-18 como se define en la reivindicación 1 para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno de hipersensibilidad de tipo IV, y en particular de trastornos que implican reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado del cuerpo humano.

**Antecedentes de la invención**

10 El término alergia o hipersensibilidad se aplica cuando aparece una respuesta inmunitaria adaptativa de forma inapropiada. Las reacciones alérgicas o de hipersensibilidad son el resultado de respuestas inmunitarias normalmente beneficiosas que actúan inapropiadamente ante antígenos extraños (habitualmente macromoléculas ambientales) y a veces causan reacciones inflamatorias y daño de tejido. En estas situaciones, un estímulo ambiental normalmente inocuo, denominado alérgeno, desencadena una respuesta inmunitaria que, tras reexposición, se reactiva generando daño patológico.

15 Las reacciones de hipersensibilidad son reacciones inmunológicas dañinas ante antígenos extrínsecos. Existen muchas clasificaciones de hipersensibilidad. Algunas están basadas en el tiempo necesario para que aparezcan síntomas o reacciones al ensayo cutáneo después de exposición a un antígeno (por ejemplo, hipersensibilidad inmediata y retardada), en el tipo de antígeno (por ejemplo, reacciones a fármacos) o en la naturaleza de la implicación orgánica. Las clasificaciones generalmente están supersimplificadas y no tienen en consideración que  
20 puede aparecer más de un tipo de respuesta inmunitaria o que puede ser necesario más de un tipo para producir lesión inmunológica. La clasificación más ampliamente usada es la siguiente:

La hipersensibilidad de tipo I o inmediata está mediada por IgE. Se denomina también alergia común. Las reacciones de hipersensibilidad inmediata (de tipo I) son debidas a la unión entre antígeno e IgE en mastocitos o basófilos.

25 Los trastornos por reacciones de hipersensibilidad de tipo I se denominan también enfermedades atópicas, incluyen rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma alérgica extrínseca, urticaria y anafilaxia sistémica, por ejemplo. La incidencia del asma ha aumentado notablemente, aunque las causas son desconocidas en gran medida. Recientemente, se ha observado un aumento notable en las reacciones de tipo I con relación a la exposición a proteínas hidrosolubles en productos de látex (por ejemplo, guantes de goma, barreras dentales, condones, tubos  
30 para equipos de respiración y catéteres, particularmente entre el personal médico y pacientes expuestos a látex y niños con espina bífida y defectos urogenitales congénitos. Son reacciones comunes ante el látex urticaria, angioedema, conjuntivitis, rinitis, broncoespasmo y anafilaxia.

Los pacientes con enfermedades atópicas (incluyendo dermatitis atópica) tienen habitualmente una predisposición congénita a desarrollar hipersensibilidad mediada por anticuerpo de IgE ante sustancias inhaladas e ingeridas (alérgenos) que son inocuas para personas que no son atópicas. Excepto en dermatitis atópica, los anticuerpos de  
35 IgE median habitualmente la hipersensibilidad.

La hipersensibilidad de tipo II o citotóxica implica acciones citolíticas mediadas por anticuerpo, complemento y/o mecanismos celulares. La diana en reacciones de tipo II es una superficie celular, y el resultado es daño o muerte celular. El anticuerpo contra antígeno unido a célula (de tipo II) causa la destrucción celular al activar el  
40 complemento o promover la fagocitosis. Son ejemplos de lesión celular en que el anticuerpo reacciona con componentes antigénicos de una célula anemias hemolíticas positivas de Coombs, púrpura trombocitopénica inducida por anticuerpo, leucopenia, pénfigo, penfigoide, síndrome de Goodpasture y anemia perniciosa. Estas reacciones aparecen en pacientes que reciben transfusiones incompatibles, en enfermedad hemolítica del recién nacido y en trombocitopenia neonatal, y pueden desempeñar también su papel en enfermedades de  
45 hipersensibilidad multisistémica (por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, LSE).

El mecanismo de la lesión se ejemplifica mejor por el efecto sobre eritrocitos. En anemias hemolíticas, los eritrocitos se destruyen por hemólisis intravascular o por fagocitosis de macrófagos, predominantemente en el bazo. Estudios *in vitro* han mostrado que, en presencia de complemento, algunos anticuerpos de unión a complemento (por ejemplo, los anticuerpos de grupo sanguíneo anti-A y anti-B) causan una hemólisis rápida. Otros (por ejemplo, anticuerpos anti-LE) causan una lisis celular lenta; aún otros no dañan directamente las células, pero causan su adherencia a y destrucción por fagocitos. En contraposición, los anticuerpos de Rh en eritrocitos no activan el  
50 complemento y destruyen células predominantemente por fagocitosis extravascular. Los ejemplos en que el antígeno es un componente del tejido son rechazo de injerto agudo temprano (hiperagudo) de un riñón trasplantado, que es debido a la presencia de anticuerpo contra endotelio vascular, y síndrome de Goodpasture, que es debido a la reacción de anticuerpo con endotelio de membrana basal glomerular y alveolar. En síndrome de Goodpasture experimental, el complemento es un mediador importante de lesión, pero el papel del complemento no se ha  
55 determinado claramente en el rechazo de injerto agudo temprano.

Los ejemplos de reacciones debidas a acoplamiento hapténico con células o tejido incluyen muchas de las reacciones de hipersensibilidad a fármacos (por ejemplo, anemia hemolítica inducida por penicilina, véase a continuación).

5 Las reacciones de hipersensibilidad anti-receptor alteran la función celular como resultado de la unión de anticuerpo a receptores de membrana. En muchas enfermedades (por ejemplo, miastenia grave, enfermedad de Graves, diabetes insulinoresistente), se han reseñado anticuerpos contra receptores de membrana celular. En algunos pacientes diabéticos con resistencia a insulina extrema, se han mostrado anticuerpos contra receptores de insulina, que evitan por tanto la unión de insulina a su receptor. En pacientes con enfermedad de Graves, se ha identificado un anticuerpo contra el receptor de hormona estimulante de tiroides (TSH) que simula el efecto de TSH sobre su receptor, dando como resultado hipertiroidismo.

10 Los mecanismos de tipo III implican en su mayoría anticuerpos que forman complejos inmunitarios con antígeno. Los complejos en circulación activan el complemento, se unen a eritrocitos (que se fagocitan entonces en el bazo), dejan la circulación y desencadenan la inflamación en espacios de tejido (reacción de Arthus), o se fagocitan por macrófagos que presentan antígeno, liberan citocinas y activan los linfocitos B y T. IgE, IgA, IgG e IgM forman todas complejos con antígeno. Las reacciones de tipo III son el resultado de la deposición de complejos inmunitarios en tejidos, particularmente piel, articulaciones y riñones. La nefritis crónica por inmunocomplejos da cuenta de la mayoría de casos de glomerulonefritis en seres humanos. Son afecciones en que los complejos inmunitarios (CI) parecen desempeñar algún papel: enfermedad del suero debida a suero, fármacos o antígeno de hepatitis vírica; lupus sistémico eritematoso; artritis reumatoide; poliarteritis, crioglobulinemia; neumonitis por hipersensibilidad; aspergilosis broncopulmonar; glomerulonefritis aguda; glomerulonefritis membranoproliferativa crónica y enfermedad renal asociada. En aspergilosis broncopulmonar, enfermedad del suero inducida por fármaco o suero y algunas formas de enfermedad renal, se cree que una reacción mediada por IgE precede a la reacción de tipo III.

25 Son modelos animales estándares de reacciones de tipo III la reacción de Arthus local y la enfermedad del suero experimental. En la reacción de Arthus (típicamente una reacción cutánea local), se hiperinmunizan en primer lugar los animales, induciendo grandes cantidades de anticuerpos de IgG en circulación, y se les procura entonces una pequeña cantidad de antígeno por vía intradérmica. El antígeno precipita con la IgG en exceso y activa el complemento, de modo que aparece rápidamente una lesión local edematosa dolorosa altamente inflamatoria (de 4 a 6 h), que puede evolucionar hasta un absceso estéril que contiene muchas células polimorfonucleares y después hasta necrosis de tejido. Puede observarse al microscopio una vasculitis necrosante con luces arteriolas obstruidas. No hay retardo temporal previo a la reacción porque el anticuerpo está ya presente.

30 Las reacciones de tipo I, II y III están causadas por anticuerpos. Las reacciones de tipo IV están causadas por linfocitos T.

35 La hipersensibilidad de tipo IV, que implica reacciones mediadas por célula, tarda generalmente 12 o más horas en desarrollarse y está basada en redes de células inmunitarias activadas. La inflamación es el patrón de tejido básico y la enfermedad inflamatoria crónica puede ser el resultado. La hipersensibilidad de tipo IV se denomina también hipersensibilidad de tipo retardado (tipo IV) o HTR. Las reacciones están mediadas por interleucina 2, interferón  $\gamma$  y otras citocinas liberadas por linfocitos T. En HTR, los linfocitos T reaccionan con antígeno y liberan interleucina 9, interferón  $\gamma$  y otras citocinas. Una vez se han sensibilizado los linfocitos T por exposición primaria, la exposición secundaria es seguida por una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, una respuesta inflamatoria local que tarda 2-3 días en desarrollarse clínicamente. Histológicamente, estas reacciones consisten en infiltrar linfocitos T, macrófagos y eosinófilos ocasionales. Experimentalmente, la HTR puede transferirse por linfocitos T, pero no por suero, concretamente los anticuerpos no están implicados.

45 La HTR puede ser el resultado de la respuesta inmunitaria mediada por célula normal ante infección por virus, hongos y ciertas bacterias, especialmente *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*. Si los macrófagos son incapaces de destruir los organismos ingeridos, pueden experimentar diferenciación en células epitelioides o células gigantes multinucleadas. Una colección de estas células forma un granuloma. El daño de tejido local es un efecto secundario indeseado de esta respuesta inmunitaria por lo demás protectora. Si la respuesta de HTR está ausente o es deficiente, sin embargo, los linfocitos T son incapaces de localizar el microorganismo invasor y los pacientes desarrollan una enfermedad diseminada invasiva agresiva, tal como tuberculosis aguda.

50 La dermatitis de contacto ante antígenos ocupacionales y otros es también una reacción de tipo IV. Los agentes que causan esta son habitualmente de peso molecular comparativamente bajo (<1 kDa) y no inmunogénicos por sí mismos, en lugar de ello, son moléculas altamente reactivas que se unen covalentemente a proteínas de piel o tejido. El producto químico sensibilizante es conocido como hapteno y la proteína hospedadora con que se combina como portador. El intervalo de antígenos sensibilizantes potenciales es amplio. Se reconocen dos fases de patogénesis: la fase de inducción y la fase de provocación. En la fase de inducción, las células que presentan antígeno en la piel, conocidas como células de Langerhans, se unen al complejo proteico de hapteno-portador y lo presentan ante linfocitos T en asociación con antígeno de CMH de clase II. La inducción de linfocitos T puede aparecer después de meses de exposición a pequeñas cantidades de antígeno. La reexposición al antígeno relevante desencadena la fase de provocación, en que las células efectoras migran a la piel encontrándose con el complejo proteico presentado por las células de Langerhans en la epidermis, con la consiguiente liberación de

citocinas e inflamación cutánea. El diagnóstico del agente atacante se realiza por ensayo de parche. Se aplica un sensibilizante por contacto sospechoso sobre la espalda del paciente y se cubre durante 48 horas. Se inspecciona el sitio de reacción después de 2 y 24 horas. En una respuesta positiva, existe inflamación e induración en el sitio de ensayo.

- 5 La hipersensibilidad de tipo retardado es también un mecanismo clave que determina el rechazo de órganos de ensayo trasplantados.

10 Son algunas afecciones clínicas en que se cree que son importantes las reacciones de tipo IV dermatitis de contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de aloinjerto, granulomas debidos a organismos intracelulares, algunas formas de sensibilidad a fármaco, tiroiditis y encefalomiелitis después de vacunación de rabia. La evidencia de los dos últimos está basada en modelos experimentales, y en enfermedad humana en la aparición de linfocitos en el exudado inflamatorio de tiroides y cerebro.

15 La dermatitis se denomina también eccema. Se refiere a una inflamación cutánea superficial caracterizada histológicamente por edema epidérmico y clínicamente por vesículas (cuando es aguda), enrojecimiento de bordes poco definidos, edema, supuración, costra, escamación, habitualmente prurito y liquenificación causada por rascado o frotamiento.

A menudo, eccema hace referencia a dermatitis vesicular, pero a veces el término está limitado a eccema para indicar dermatitis crónica. Algunos hacen referencia también a la dermatitis como dermatitis espongiótica debido a que la espongiosis (edema intraepidérmico) es un rasgo histológico.

20 La dermatitis de contacto es una inflamación aguda o crónica, a menudo asimétrica o de forma irregular, producida por sustancias que entran en contacto con la piel y causan reacciones tóxicas (irritantes) o alérgicas.

El diagnóstico de reacciones de hipersensibilidad depende del tipo de reacción implicada.

Puede sospecharse una reacción de tipo IV cuando la reacción inflamatoria se caracteriza histológicamente por linfocitos y macrófagos perivascuales. Los ensayos cutáneos de hipersensibilidad retardada y ensayos de parche son los métodos más fácilmente disponibles de ensayo de hipersensibilidad retardada.

25 Para evitar la exacerbación de la dermatitis de contacto, se efectúan los ensayos de parche después de remitir la dermatitis de contacto. Se aplica el alérgeno sospechoso (a la concentración apropiada) a la piel bajo un parche adhesivo no absorbente y se deja durante 48 h. Si se desarrolla antes quemazón o picor, se retira el parche. Un ensayo positivo consiste en eritema con cierta induración y, ocasionalmente, formación de vesícula. Debido a que algunas reacciones no aparecen hasta después de retirar los parches, se vuelven a inspeccionar los sitios a las 72 y 30 96 h.

La hipersensibilidad puede aparecer también como reacción a fármacos. Antes de atribuir una reacción dada a un fármaco, debería observarse que los placebos pueden causar también una amplia variedad de síntomas e incluso signos objetivos, tales como sarpullidos cutáneos. No obstante, las reacciones a fármacos verdaderas constituyen un problema médico importante.

35 En la intolerancia a fármacos, se desarrolla una reacción adversa con el primer uso del fármaco. Puede ser la misma reacción tóxica esperada comúnmente a niveles mayores, o puede ser una amplificación de un efecto secundario leve común (por ejemplo, sedación antihistamínica). Es idiosincrásica una afección en que la reacción adversa con el primer uso del fármaco es farmacológicamente inesperada y única.

40 Las características de las reacciones alérgicas a fármacos incluyen reacciones mediadas por IgE que aparecen solo después de exponer el paciente al fármaco (no necesariamente para terapia) una o más veces sin incidentes. Una vez se desarrolla la hipersensibilidad, la reacción puede producirse por dosis muy por debajo de las cantidades terapéuticas, y habitualmente por debajo de aquellos niveles que producen reacciones idiosincrásicas. Los rasgos clínicos están limitados en sus manifestaciones. Los sarpullidos cutáneos (particularmente urticaria), síndrome de tipo enfermedad del suero, fiebre inesperada, anafilaxia e infiltrados eosinofílicos pulmonares que aparecen durante 45 la terapia de fármaco son habitualmente debidos a hipersensibilidad; como algunos casos de anemia, trombocitopenia o agranulocitosis. Rara vez, se han reseñado los desarrollos de vasculitis después de exposición repetida a un fármaco (por ejemplo, sulfonamidas, yoduros, penicilina), nefritis intersticial (por ejemplo, meticilina) y daño hepático (por ejemplo, halotano) en circunstancias congruentes con el desarrollo de hipersensibilidad específica.

50 El ejemplo más grave de hipersensibilidad a fármaco es la anafilaxia. Sin embargo, la reacción a fármaco más común es, de lejos, el sarpullido morbiliforme, de nuevo de etiología desconocida. Fiebre y reacciones urticariales son también consecuencias relativamente comunes de la alergia a fármaco. Cuando se usaban sueros animales para terapia, la enfermedad del suero era una complicación, pero los sueros animales se usan rara vez hoy en día. Puede aparecer un síndrome de tipo enfermedad del suero grave de patogénesis desconocida sin altos niveles de 55 anticuerpo de IgG en circulación, pero asociado habitualmente anticuerpos de IgE, especialmente con fármacos tales como penicilina.

- Las reacciones de hipersensibilidad a fármaco están basadas en la capacidad de fármacos de proteínas y polipéptidos grandes de estimular la producción de anticuerpo específico mediante mecanismos inmunológicos directos. Quizás la molécula más pequeña que es potencialmente antigénica es el glucagón, con un peso molecular de aproximadamente 3.500. La mayoría de moléculas de fármaco son mucho menores y no pueden actuar solas como antígenos. Sin embargo, como haptenos, algunas se unen covalentemente a proteínas, y los conjugados resultantes estimulan la producción de anticuerpo específico del fármaco. El fármaco, o uno de sus metabolitos, es químicamente reactivo con la proteína. La unión a proteína sérica común a muchos fármacos es mucho más débil y de fuerza insuficiente para antigenicidad.
- La reacción inmunológica específica se ha determinado solo para bencilpenicilina. Este fármaco no se une con suficiente fuerza a proteínas de tejido o suero para formar un complejo antigénico, pero su producto de degradación principal, el ácido bencilpenicilénico, puede combinarse con proteínas de tejido formando bencilpeniciloilo (BPO), el determinante antigénico principal de la penicilina. Se forman varios determinantes antigénicos secundarios en cantidades relativamente pequeñas mediante mecanismos que están peor definidos. Las reacciones de hipersensibilidad (I, II, III, IV) implican lo más habitualmente el determinante BPO. Los anticuerpos de IgE contra determinantes secundarios pueden ser responsables de anafilaxia y urticaria en algunos pacientes. Se han encontrado anticuerpos de IgG contra el determinante principal, pero no los secundarios. Pueden actuar como "anticuerpos de bloqueo" de BPO, modificando o incluso evitando la reacción con BPO, mientras que la falta de anticuerpos de IgG de bloqueo contra los determinantes secundarios puede explicar la capacidad de estos determinantes de inducir anafilaxia.
- Todas las penicilinas semisintéticas (por ejemplo, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina) reaccionan potencialmente de forma cruzada con la penicilina, de modo que los pacientes sensibles a penicilina a menudo reaccionan también ante ellas. Las reacciones cruzadas aparecen con cefalosporinas en un menor grado. El tratamiento con una cefalosporina debería iniciarse con gran precaución si el paciente tiene un historial de reacción grave (por ejemplo, anafilaxia) ante penicilina.
- Pueden desarrollarse reacciones de fármaco mediadas por anticuerpo hematológico (citotóxica de tipo II) mediante cualquiera de tres mecanismos: en anemia inducida por penicilina, el anticuerpo reacciona con el hapteno, que está fuertemente unido a la membrana de eritrocito, produciendo aglutinación y una destrucción aumentada de eritrocitos. En trombocitopenia inducida por estibofeno y quinidina, el fármaco forma un complejo soluble con su anticuerpo específico. El complejo reacciona entonces con plaquetas cercanas (las células diana "espectadoras inocentes") y activa el complemento, que permanece solo en la membrana de plaquetas e induce la lisis celular. En otras anemias hemolíticas, el fármaco (por ejemplo, metildopa) parece alterar químicamente la superficie de eritrocitos, descubriendo así un antígeno que induce y reacciona después con un autoanticuerpo, habitualmente de especificidad Rh.
- Las reacciones idiosincrásicas y anafilácticas tóxicas son suficientemente únicas en la clase o en el momento de tal modo que el fármaco atacante habitualmente se identifica fácilmente. Las reacciones de tipo enfermedad del suero son debidas lo más a menudo a penicilinas, pero ocasionalmente son responsables sulfonamidas, hidralazina, sulfonilureas o tiazidas. La fotosensibilización es característica de clorpromazina, ciertos antisépticos en jabones, sulfonamidas, psoralenos, demeclociclina y griseofulvina. Deberían suspenderse todos los fármacos excepto aquellos considerados absolutamente esenciales. Cuando se sospecha fiebre por fármaco, se suspende el fármaco más probable (por ejemplo, alopurinol, penicilina, isoniazida, sulfonamidas, barbituratos, quinidina). La reducción de la fiebre al cabo de 48 h señala fuertemente a ese fármaco. Si la fiebre está acompañada de granulocitopenia, es más probable la toxicidad por fármaco que la alergia y es mucho más grave.
- Las reacciones pulmonares alérgicas ante fármacos son habitualmente infiltrantes con eosinofilia, y pueden producirse por sales de oro, penicilina y sulfonamidas, entre otros. La causa más común de reacción pulmonar infiltrante aguda es la nitrofurantoína. Esta es probablemente alérgica pero habitualmente no eosinofílica.
- Las reacciones hepáticas pueden ser principalmente colestáticas (fenotiazinas y estolato de eritromicina están lo más frecuentemente implicados) o hepatocelulares (alopurinol, hidantoínas, sales de oro, isoniazida, sulfonamidas, ácido valproico y muchos otros). La reacción renal alérgica habitual es nefritis intersticial, lo más comúnmente debida a meticilina; se han implicado también otros antimicrobianos y cimetidina.
- Puede producirse un síndrome similar a lupus sistémico eritematoso por varios fármacos, lo más comúnmente hidralazina y procainamida. El síndrome está asociado a un ensayo positivo de anticuerpo antinuclear y es relativamente benigno, evitando riñones y SNC. La penicilamina puede producir LSE y otras enfermedades autoinmunitarias, lo más especialmente miastenia grave.
- En 1989, se describió una actividad sérica inducida por endotoxina que inducía interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) obtenida en células de bazo de ratón (Nakamura *et al.*, 1989). Esta actividad sérica no funcionaba como inductor directo de IFN- $\gamma$ , sino como coestimulante junto con IL-2 o mitógenos. Un intento de purificar la actividad a partir de suero de ratón postendotoxina reveló una proteína aparentemente homogénea de 50-55 kDa. Puesto que otras citocinas pueden actuar como coestimulantes de la producción de IFN- $\gamma$ , la incapacidad de neutralizar anticuerpos contra IL-1, IL-2, IL-5, IL-6 o TNF para neutralizar la actividad sérica sugería que era un factor distinto. En 1995, los mismos científicos

demonstraron que el coestimulante inducido por endotoxina para la producción de IFN- $\gamma$  estaba presente en extractos de hígados de ratones precondicionados con *P. acnes* (Okamura *et al.*, 1995). En este modelo, la población de macrófagos hepáticos (células de Kupffer) se extiende y, en estos ratones, una dosis baja de lipopolisacárido bacteriano (LPS), que en ratones no precondicionados no es mortal, se vuelve mortal. El factor, llamado factor inductor de IFN- $\gamma$  (IGIF) y designado posteriormente interleucina 18 (IL-18), se purificó hasta homogeneidad a partir de 1.200 g de hígados de ratón tratados con *P. acnes*. Se usaron oligonucleótidos degenerados derivados de secuencias aminoacídicas de IL-18 purificada para clonar un ADNc de IL-18 de murino. La IL-18 es una proteína de 18-19 kDa de 157 aminoácidos que no tiene similitudes obvias con ningún péptido de las bases de datos. Los ARN mensajeros de IL-18 e interleucina 12 (IL-12) se detectan fácilmente en células de Kupffer y macrófagos activados. La IL-18 recombinante induce IFN- $\gamma$  más potentemente que la IL-12, aparentemente a través de una ruta separada (Micallef *et al.*, 1996). De forma similar a la actividad sérica inducida por endotoxina, la IL-18 no induce IFN- $\gamma$  por sí misma, sino que funciona principalmente como coestimulante con mitógenos o IL-2. La IL-18 potencia la proliferación de linfocitos T, aparentemente a través de una ruta dependiente de IL-2, potencia la producción de citocina Th1 *in vitro* y exhibe sinergia cuando se combina con IL-12 en términos de producción de IFN- $\gamma$  potenciada (Maliszewski *et al.*, 1990).

Después de clonar la forma de murino, se reseñó la secuencia de ADNc humano para IL-18 en 1996 (Ushio *et al.*, 1996).

Al clonar IL-18 a partir de tejidos afectados y estudiar la expresión del gen de IL-18, se encontró una estrecha asociación de esta citocina con una enfermedad autoinmunitaria. El ratón diabético no obeso (NOD) desarrolla espontáneamente insulinitis autoinmunitaria y diabetes, que pueden acelerarse y sincronizarse con una sola inyección de ciclofosfamida. Se demostró ARNm de IL-18 mediante PCR con transcriptasa inversa en páncreas de ratón NOD durante las etapas tempranas de insulinitis. Los niveles de ARNm de IL-18 aumentaron rápidamente después del tratamiento con ciclofosfamida, y precedieron a una elevación del ARNm de IFN- $\gamma$  y consiguiente diabetes. De forma interesante, esta cinética imita la del ARNm de IL-12-p40, dando como resultado una estrecha correlación de los niveles de ARNm individuales. La clonación de ADNc de IL-18 a partir de ARN de páncreas seguido de secuenciación reveló la identidad con la secuencia de IL-18 clonada a partir de células de Kupffer y macrófagos preactivados *in vivo*. También los macrófagos de ratón NOD respondían a la ciclofosfamida con la expresión del gen de IL-18, mientras que los macrófagos de ratones Balb/c tratados en paralelo no lo hacían. Por lo tanto, la expresión de IL-18 está regulada anormalmente en ratones NOD autoinmunitarios y asociada estrechamente al desarrollo de diabetes (Rothe *et al.*, 1997).

La IL-18 desempeña un papel potencial en la inmunorregulación o en inflamación al aumentar la actividad funcional del ligando Fas en células Th1 (Conti *et al.*, 1997). La IL-18 se expresa también en la corteza suprarrenal y por lo tanto podría ser un neuroinmunomodulador secretado, desempeñando un papel importante en la organización del sistema inmunitario después de una experiencia estresante (Chater, 1986).

*In vivo*, la IL-18 se forma por escisión de pro-IL-18, y su actividad endógena parece dar cuenta de la producción de IFN- $\gamma$  en *P. acnes* y la mortalidad mediada por LPS. La IL-18 madura se produce a partir de su precursor mediante la enzima conversora IL-1 $\beta$  (enzima conversora IL-1 $\beta$ , ICE, caspasa 1).

El receptor de IL-18 consiste en al menos dos componentes que cooperan en la unión de ligando. Se encontraron sitios de alta y baja afinidad de unión para IL-18 en linfocitos T estimulados con IL-12 de murino (Yoshimoto *et al.*, 1998), sugiriendo un complejo receptor de múltiples cadenas. Se han identificado hasta ahora dos subunidades de receptor, ambas pertenecientes a la familia del receptor de IL-1 (Parnet *et al.*, 1996). La transducción de señal de IL-18 implica la activación de NF- $\kappa$ B (DiDonato *et al.*, 1997).

Recientemente, se ha aislado una proteína soluble que tiene una alta afinidad por IL-18 a partir de orina humana, y se han descrito los ADNc humano y de ratón (Novick *et al.*, 1999; WO 9910906). La proteína se ha designado proteína de unión a IL-18 (IL-18BP).

La IL-18BP no es el dominio extracelular de uno de los receptores de IL-18 conocidos, sino una proteína en circulación natural secretada. Pertenece a una familia novedosa de proteínas secretadas. La familia incluye adicionalmente varias proteínas codificadas por poxvirus que tienen una alta homología con IL-18BP (Novick *et al.*, 1999). La IL-18BP se expresa constitutivamente en el bazo, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y tiene una homología limitada con el receptor de IL-1 de tipo II. Su gen se localizó en el cromosoma humano 11q13, y no se encontró codificación exónica para un dominio transmembrana en una secuencia genómica de 8,3 kb (Novick *et al.*, 1999).

Se han expresado, purificado y valorado la unión y neutralización de las actividades biológicas de IL-18 de 4 isoformas humanas y 2 de ratón de IL-18BP, resultantes del corte y empalme de ARNm y encontradas en diversas colecciones de ADNc (Kim *et al.*, 2000). La isoforma a de IL-18BP humana (IL-18BP<sub>a</sub>) exhibía la mayor afinidad por IL-18, con una rápida velocidad de asociación, una lenta velocidad de disociación y una constante de disociación (K(d)) de 399 pM. La IL-18BP<sub>c</sub> comparte el dominio Ig de IL-18BP<sub>a</sub>, excepto por los 29 aminoácidos C-terminales; la K(d) de IL-18BP<sub>c</sub> es 10 veces menor (2,94 nM). No obstante, IL-18BP<sub>a</sub> y IL-18BP<sub>c</sub> neutralizan IL-18 >95 % a un exceso molar de 2. Las isoformas IL-18BP<sub>b</sub> e IL-18BP<sub>d</sub> carecen de un dominio Ig completo y carecen de la

capacidad de unirse a o neutralizar IL-18. Las isoformas IL-18BPc e IL-18BPd de mrido, que poseen un dominio Ig idéntico, neutralizan también >95 % IL-18 de mrido a un exceso molar de 2. Sin embargo, la IL-18BPd de mrido, que comparte un motivo C-terminal común con la IL-18BPa humana, neutraliza también la IL-18 humana. La modelización molecular ha identificado un sitio de unión electrostática e hidrófoba mixta en el dominio Ig de IL-18BP, que podría dar cuenta de su alta afinidad de unión al ligando (Kim *et al.*, 2000).

En 1998, se propuso que la expresión de la interleucina 18 (IL-18) está implicada en la patogénesis de la hipersensibilidad de contacto de mrido (Xu *et al.*, 1998). Xu *et al.* usaron un modelo de hipersensibilidad de contacto de mrido con oxazolona como alérgeno de contacto y mostraron la inducción de la expresión de IL-18 en lesiones cutáneas. Se encontró la máxima regulación positiva 24 horas después de exposición al alérgeno, después la expresión de IL-18 se redujo gradualmente.

Se publicó un informe adicional de la capacidad de IL-18 de inducir una respuesta de HTR independientemente de IL-18 por Kitching *et al.*, 2000. Sin embargo, el papel de la IL-18 permaneció confuso, puesto que se reseo también que la IL-18 era una terapia potencialmente eficaz por sí misma para pacientes de dermatitis atpica (Habu *et al.*, 2001), lo que estaba en consonancia con varios ensayos clínicos que sugieren que el IFN- $\gamma$  mejora los síntomas de dermatitis atpica (Reinhold *et al.*, 1990; Hanifin *et al.*, 1993). Los documentos EP110969A, EP0974600A y EP0864585A se refieren a IL-18BP o mAb anti-IL-18 o proteínas receptoras de IL-18 para uso en la terapia de alergia, inflamación o enfermedades autoinmunitarias.

### **Compendio de la invención**

La presente invención está basada en el descubrimiento de que el tratamiento de ratones con inhibidores de IL-18 en un modelo de hipersensibilidad de tipo IV da como resultado la atenuación de la reacción de hipersensibilidad en el animal en comparación con animales de control. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de IL-18 según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos de hipersensibilidad. El uso de combinaciones de un inhibidor de IL-18 con un interferón y/o un inhibidor de TNF y/o inhibidores de la inflamación y/o fármacos antialérgicos está también contemplado según la invención. En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación de un inhibidor de IL-18 para el tratamiento y/o la prevención de afecciones de hipersensibilidad. La invención se refiere adicionalmente al uso de células modificadas por ingeniería genética para expresar inhibidores de IL-18 para la prevención y/o el tratamiento de trastornos de hipersensibilidad.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 muestra que el tratamiento con IL-18BP durante la exposición protege de la hipersensibilidad de contacto (HSC). Los ratones se sensibilizaron con DNFB en el lomo el día 0 y se expusieron al mismo 5 días después en las orejas. Se midió diariamente la hinchazón de oreja y se expres como el aumento de hinchazón de la oreja expuesta a DNFB frente a la de control tratada con vehículo. El tratamiento con 250  $\mu$ g de IL-18BP i.p. por ratón diariamente los días 5 a 8 redujo notablemente la hinchazón de oreja (A), mientras que el tratamiento los días 0 a 2 no era protector en este entorno experimental (B) (n= 5 ratones por grupo). Cuadrados: ratones tratados con IL-18BP, triángulos: animales de control, concretamente tratados con disolución salina.

La Fig. 2 muestra la extensión de la hinchazón de oreja del día 5 al 30 después de la primera exposición a hapteno el día 5 y la segunda exposición el día 19 en un modelo de hipersensibilidad de tipo retardado con administración sistémica de 250  $\mu$ g/ratón/día de IL-18BP (cuadrados blancos) o vehículo (cuadrados negros) de los días 19 a 22.

La Fig. 3 muestra que la IL-18BP protege de HSC al neutralizar la IL-18. Se compararon en ratones C57BL/6 deficientes en IL-18 (KO) y de tipo silvestre su capacidad de crear una respuesta de HSC. Los ratones deficientes en IL-18 desarrollan HSC ante DNFB, aunque menos marcada que los ratones de tipo silvestre. Sin embargo, no se observó efecto del tratamiento con IL-18BP en ratones deficientes de IL-18, indicando que el efecto antiinflamatorio de IL-18BP en la HSC era debido a la neutralización de IL-18 (n = 5 ratones por grupo). Círculos: disolución salina en ratones IL-18 KO; rombos: IL-18BP en ratones IL-18 KO; cuadrados: IL-18BP en ratones de tipo silvestre (WT); triángulos: disolución salina en ratones WT.

La Fig. 4 muestra que la IL-18BP no reduce la exudación vascular durante HSC. La HSC se indujo en ratones C57BL/6. Para monitorizar el edema causado por la reacción de HSC, se inyectó azul de Evans i.v. 2 h antes de exponer a DNFB. Se sacrificaron los ratones 24 horas después y se procesaron las orejas para extraer el tinte que había exudado de los vasos y acumulado en el tejido circundante. Se valor la exudación vascular como la cantidad de tinte por mg de tejido de oreja secado corregido para la concentración de azul de Evans en el suero, y se expres como el cociente de oreja expuesta frente a control. Aunque el tratamiento con IL-18BP el día 4 y el día 5 reducía la hinchazón a un 56 % de la del control tratado con vehículo (panel izquierdo,  $p < 0,01$ ), no había una diferencia significativa en la exudación vascular entre estos dos grupos. Ambos grupos mostraban un edema significativamente aumentado en comparación con el grupo de control no sensibilizado ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ). Como control adicional, se trataron los ratones con 250  $\mu$ g de la proteína irrelevante BSA por animal y día. Estos ratones desarrollaron HSC como los animales de control tratados con vehículo (n =10 ratones por grupo).

- 5 Fig. 5. El tratamiento con IL-18BP reduce la infiltración inflamatoria de la oreja expuesta a DNFB. Se indujo HSC en ratones C57BL/6 como se describe. Se trataron los animales con IL-18BP o vehículo los días 4 a 6. El tratamiento con IL-18BP redujo la hinchazón un 58 % de la del control de vehículo el día 7. Se sacrificaron los ratones el día 7, se recogieron las orejas expuestas, se combinaron por grupos (n= 8) y se digirieron con enzima, obteniéndose suspensiones monocelulares. Se caracterizaron las células mediante análisis FACS posterior que clasifica las células vivas positivas de CD45. Los números de linfocitos T  $\alpha\beta$ , linfocitos NK, neutrófilos y monocitos/macrófagos encontrados en las preparaciones de oreja se expresan como el porcentaje de las células totales analizadas (valores superiores). La reducción de estos tipos celulares después de tratamiento con IL-18BP respecto al control de vehículo se da en las cifras inferiores.
- 10 La Fig. 6 muestra que la activación de linfocitos T es deficiente tras el tratamiento con IL-18BP. Se volvieron a estimular las células obtenidas a partir de orejas expuestas a DNFB con  $2 \times 10^5$  por pocillo con anticuerpo anti-CD3 unido a placa. No se añadió IL-18BP adicional durante el periodo de cultivo de 24 h posterior. Se midió la producción de IFN- $\gamma$  por triplicado por ELISA. Las células obtenidas a partir de ratones tratados con IL-18BP producían solo un 45 % del IFN- $\gamma$  encontrado en los cultivos de células de animales de control tratados con vehículo.
- 15 La Fig. 7 muestra que el tratamiento con IL-18BP reduce el número de células productoras de IFN- $\gamma$  en el infiltrado inflamatorio de la oreja. Se estimularon las preparaciones celulares de orejas expuestas a DNFB con PMA\* 50 ng/ml y Ionomicina 500 ng/ml durante 4 h. Se bloqueó la secreción de citocina mediante la adición de brefeldina A 2  $\mu$ g/ml durante las 2 últimas horas de la incubación. Se sometieron entonces las células a tinción inmunofluorescente multicolor para IFN- $\gamma$  intracelular y antígenos de superficie. El tratamiento con IL-18BP redujo el número total de células positivas para tinción de IFN- $\gamma$  al 78 % de las del control de vehículo. El IFN- $\gamma$  se produjo por linfocitos T CD8 y en una menor extensión por linfocitos T CD4. No se detectó IFN- $\gamma$  en linfocitos NK ni linfocitos T  $\alpha\beta$  (nd: no detectado; \*12-miristato 13-acetato de forbol).
- 20 Fig. 8: El tratamiento con IL-18BP no perjudica la agrupación de células de Langerhans en el nódulo linfático de drenaje. Se pintaron los ratones con el hapteno FITC o vehículo acetona/ftalato de dibutilo (1:1) sobre el flanco derecho e izquierdo, respectivamente. Se recogieron los nódulos linfáticos inguinales 24 h después de pintar. Pudieron detectarse células de Langerhans conjugadas con hapteno por FACS como células FITC+, CD11c+ en el nódulo linfático de drenaje del flanco pintado con FITC, pero no en el nódulo linfático contralateral de drenaje del flanco pintado solo con vehículo. La proporción de células de Langerhans portadoras de hapteno en el nódulo linfático era de un 1,2 % de las células de nódulo linfático totales en animales tratados con IL-18BP 24 h y 1 h antes de pintar. Esto no difería significativamente del número obtenido con animales tratados con control. (n =5 nódulos linfáticos de drenaje por grupo).

### Descripción de la invención

- La presente invención está basada en el descubrimiento de que un inhibidor de IL-18 ejercía un efecto beneficioso sobre la recuperación de exposición a hapteno en un modelo de mórdo de hipersensibilidad de tipo IV.
- 35 Por lo tanto, la invención se refiere al uso de un inhibidor de IL-18 según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos de hipersensibilidad.
- Dentro del contexto de la presente invención, las expresiones “trastorno de hipersensibilidad” y “trastorno alérgico” se usan de forma sinónima. Ambos términos se refieren a trastornos o reacciones causados por una respuesta inmunitaria adaptativa inapropiada. Las reacciones de hipersensibilidad son el resultado de respuestas inmunitarias normalmente beneficiosas que actúan inapropiadamente ante antígenos extraños tales como, por ejemplo, habitualmente macromoléculas ambientales, lo que puede conducir a reacciones inflamatorias y daño de tejido. En los trastornos de hipersensibilidad, un estímulo normalmente inocuo, el alérgeno, desencadena una respuesta inmunitaria que, tras reexposición, se reactiva generando daño patológico.
- 40 Los trastornos de hipersensibilidad, así como sus síntomas e implicaciones clínicos, se han descrito con detalle en los “Antecedentes de la invención” y el uso según la invención se refiere a los trastornos de hipersensibilidad mencionados en los mismos.
- 45 En una realización de la presente invención, el trastorno de hipersensibilidad se selecciona del grupo consistente en trastornos con reacciones de hipersensibilidad de tipo IV.
- Los trastornos con hipersensibilidad de tipo I se denominan también hipersensibilidad inmediata o alergia común. La hipersensibilidad está mediada por IgE. Las reacciones de hipersensibilidad inmediata (tipo I) son debidas a la unión entre antígeno e IgE en mastocitos o basófilos. Dentro del significado de los trastornos con reacciones de hipersensibilidad de tipo I, están las enfermedades atópicas tales como rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma extrínseca alérgica, urticaria y anafilaxia sistémica. La anafilaxia es una reacción alérgica grave potencialmente mortal debido a hipersensibilidad de tipo I (inmediata).
- 50 La hipersensibilidad de tipo II o citotóxica implica acciones citolíticas mediadas por anticuerpo, complemento y/o mecanismos celulares. El anticuerpo contra antígeno unido a célula (tipo II) causa la destrucción celular al activar el

complemento o promover la fagocitosis. Los trastornos con hipersensibilidad de tipo II comprenden, por ejemplo, anemias hemolíticas positivas de Coombs, púrpura trombocitopénica inducida por anticuerpo, leucopenia, pénfigo, penfigoide, síndrome de Goodpasture y anemia perniciosa. Estas reacciones pueden aparecer en pacientes que reciben transfusiones incompatibles, en enfermedad hemolítica del recién nacido y en trombocitopenia neonatal, y pueden desempeñar también un papel en enfermedades de hipersensibilidad multisistémica (por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, LSE), por ejemplo.

Los trastornos con hipersensibilidad de tipo III implican reacciones en que los anticuerpos forman complejos inmunitarios con antígeno. Los complejos en circulación activan el complemento, se unen a eritrocitos que se fagocitan entonces en el bazo, dejan la circulación y desencadenan inflamación en espacios de tejido. Esta reacción se denomina reacción de Arthus. Como alternativa, los complejos se fagocitan por macrófagos que presentan antígeno, liberan citocinas y activan linfocitos B y T. IgE, IgA, IgG e IgM forman todos complejos con antígeno. Las reacciones de tipo III son generalmente el resultado de la deposición de complejos inmunitarios en tejidos, particularmente piel, articulaciones y riñones. La nefritis crónica por inmunocomplejos da cuenta de la mayoría de casos de glomerulonefritis en seres humanos. Según la invención, los trastornos de hipersensibilidad de tipo III comprenden, por ejemplo, enfermedad del suero debido a suero, fármacos o antígeno de hepatitis vírica; ELA; artritis reumatoide (AR); poliarteritis; crioglobulinemia; neumonitis por hipersensibilidad; aspergilosis broncopulmonar; glomerulonefritis aguda; glomerulonefritis membranoproliferativa crónica y enfermedad renal asociada.

Los trastornos con hipersensibilidad de tipo IV implican reacciones mediadas por célula y tardan generalmente 12 o más horas en desarrollarse. Los trastornos de hipersensibilidad de tipo IV pueden implicar inflamación, y su resultado puede ser enfermedad inflamatoria crónica. La hipersensibilidad de tipo IV se denomina también hipersensibilidad de tipo retardado o HTR. Una vez se han sensibilizado los linfocitos T por exposición primaria, la exposición secundaria es seguida por una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado. Esta reacción es una respuesta inflamatoria local, que a veces tarda 2-3 días en desarrollarse clínicamente.

En una realización preferida de la invención, el trastorno de hipersensibilidad es hipersensibilidad de tipo retardado. Por tanto, la invención se refiere a todas las clases de afecciones clínicas en que las reacciones de tipo IV sean importantes, tales como hipersensibilidad de contacto de tipo retardado, dermatitis, dermatitis de contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de aloinjerto, granulomas debidos a organismos intracelulares, algunas formas de sensibilidad a fármaco, tiroiditis y encefalomiелitis después de vacunación por rabia.

La HTR puede ser el resultado de la respuesta inmunitaria mediada por célula normal ante infección con virus, hongos y ciertas bacterias, especialmente *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*. Los agentes externos adicionales que provocan HTR pueden ser secreciones de plantas, animales, insectos o reptiles, antígenos químicos o bioquímicos. Pueden derivar de fuentes sintéticas o naturales. Diversos tipos de fibras y tejidos, tales como el látex usado en guantes quirúrgicos, pueden dar lugar a una reacción de hipersensibilidad mediada por linfocitos T en ciertos individuos. Los agentes externos atacantes pueden ser agentes portados por agua tales como sales y minerales disueltos, encontrados por ejemplo en operaciones ambientales, de minería, metalúrgicas y de fabricación química.

En otra realización preferida de la invención, el trastorno de hipersensibilidad es dermatitis de contacto o hipersensibilidad por contacto. La dermatitis de contacto, también una reacción de tipo IV, es una reacción ante antígenos ocupacionales y otros. Los agentes que provocan la dermatitis de contacto son habitualmente de peso molecular comparativamente bajo (< 1 kDa) y no inmunogénicos por sí mismos, en lugar de ello, son moléculas altamente reactivas que se unen covalentemente a proteínas de piel o tejido. El producto químico sensibilizante se denomina hapteno y la proteína hospedadora con la que se combina se denomina portador. Son conocidos muchos haptenos que provocan dermatitis de contacto. Para descubrir si un individuo desarrollará dermatitis de contacto contra un sensibilizante dado, se aplica un sensibilizante de contacto sospechoso sobre la espalda del paciente y se cubre durante 48 horas. Se inspecciona el sitio de reacción después de 2 y 24 horas. En una respuesta positiva, hay inflamación e induración en el sitio de ensayo.

La hipersensibilidad de tipo retardado es también un mecanismo clave que determina el rechazo de órganos de ensayo trasplantados, y por lo tanto la invención se refiere adicionalmente al uso de un inhibidor de IL-18 para la prevención del rechazo de injerto.

El término "inhibidor de IL-18" dentro del contexto de esta invención hace referencia a cualquier molécula según la reivindicación 1 que module la producción y/o acción de IL-18 de tal modo que se atenúe, reduzca o evite parcial, sustancial o completamente o se bloquee la producción y/o acción de IL-18. El término "inhibidor de IL-18" pretende englobar inhibidores de la producción de IL-18 así como inhibidores de la acción de IL-18.

Un inhibidor de la producción puede ser cualquier molécula que afecte negativamente a la síntesis, procesamiento o maduración de IL-18. Los inhibidores considerados según la invención pueden ser, por ejemplo, supresores de la expresión génica de la interleucina IL-18, ARNm anticodificantes que reducen o evitan la transcripción de ARNm de IL-18 o que conducen a la degradación del ARNm, proteínas que perjudican el plegamiento correcto o que evitan parcial o sustancialmente la secreción de IL-18, proteasas que degradan la IL-18 una vez se ha sintetizado o inhibidores de proteasas que escinden pro-IL-18 para generar IL-18 madura, tales como inhibidores de caspasa 1.

Un inhibidor de la acción de IL-18 puede ser un antagonista de IL-18, por ejemplo. Los antagonistas pueden unirse a o captar la molécula de IL-18 misma con suficiente afinidad y especificidad para neutralizar parcial o sustancialmente la IL-18 o el sitio o sitios de unión de IL-18 responsables de la unión de IL-18 a sus ligandos (como, por ejemplo, a sus receptores). Un antagonista puede inhibir también la ruta de señalización de IL-18, que se activa en las células tras la unión de IL-18/receptor.

Los inhibidores de la acción de IL-18 pueden ser también receptores de IL-18 solubles o moléculas que imitan los receptores, o agentes que bloquean los receptores de IL-18 o anticuerpos de IL-18, tales como anticuerpos policlonales o monoclonales o cualquier otro agente o molécula que evite la unión de IL-18 a sus dianas, reduciendo o evitando así la provocación de reacciones intra- o extracelulares mediadas por IL-18.

En una realización preferida de la presente invención, el inhibidor de IL-18 es como se define en la reivindicación 1.

El término "proteínas de unión a IL-18" se usa en la presente memoria como sinónimo de "proteína de unión a IL-18" o "IL-18BP". Comprende proteínas de unión a IL-18 como se definen en el documento WO 99/09063 o en Novick *et al.*, 1999, incluyendo variantes de corte y empalme y/o isoformas de proteínas de unión a IL-18 como se definen en Kim *et al.*, 2000, que se unen a IL-18. En particular, las isoformas humanas a y c de IL-18BP son útiles de acuerdo con la presente invención. Las proteínas útiles según la presente invención pueden estar glucosiladas o no glucosiladas, pueden derivar de fuentes naturales como orina o pueden producirse preferiblemente de forma recombinante. La expresión recombinante puede llevarse a cabo en sistemas de expresión procarióticos como *E. coli*, o eucarióticos, y preferiblemente en sistemas de expresión de mamífero.

Como se usa en la presente memoria, el término "muteínas" hace referencia a análogos de una IL-18BP o a análogos de una IL-18BP vírica, en que uno o más de los residuos aminoacídicos de una IL-18BP natural o IL-18BP vírica están reemplazados por diferentes residuos aminoacídicos, o están eliminados, o se añaden uno o más residuos aminoacídicos a la secuencia natural de una IL-18BP o una IL-18BP vírica sin cambiar considerablemente la actividad de los productos resultantes en comparación con la IL-18BP de tipo silvestre o IL-18BP vírica. Estas muteínas se preparan mediante técnicas de síntesis y/o mutagénesis de sitio conocidas o cualquier otra técnica conocida adecuada para ello.

Las muteínas incluyen proteínas codificadas por un ácido nucleico tal como ADN o ARN, que hibridan con ADN o ARN que codifica una IL-18BP o que codifica una IL-18BP vírica, de acuerdo con la presente invención, en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" hace referencia a las condiciones de hibridación y posterior lavado a las que los expertos en la técnica hacen referencia convencionalmente como "rigurosas". Véase Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", supra, *Interscience*, N.Y., apartados 6.3 y 6.4 (1987, 1992) y Sambrook *et al.*, supra. Sin limitación, los ejemplos de condiciones rigurosas incluyen condiciones de 12-20 °C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada del híbrido en estudio, por ejemplo, 2 x SSC y 0,5 % de SDS durante 5 minutos, 2 x SSC y 0,1 % de SDS durante 15 minutos; 0,1 x SSC y 0,5% de SDS a 68 °C durante 30-60 minutos y después 0,1 x SSC y 0,5 % de SDS a 68 °C durante 30-60 minutos. Los expertos en esta técnica entienden que las condiciones de rigor dependen también de la longitud de las secuencias de ADN, de las sondas oligonucleotídicas (tales como de 10-40 bases) o de las sondas oligonucleotídicas mixtas. Si se usan sondas mixtas, es preferible usar cloruro de tetrametilamonio (TMAC) en lugar de SSC. Véase Ausubel, supra.

La identidad refleja la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, determinada comparando las secuencias. En general, la identidad hace referencia a la correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de las dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas, respectivamente, a lo largo de las secuencias que se están comparando.

Para secuencias donde no hay una correspondencia exacta, puede determinarse un "% de identidad". En general, se alinean las dos secuencias para comparar para dar la correlación máxima entre las secuencias. Esto puede incluir insertar "huecos" en una cualquiera o ambas secuencias, para potenciar el grado de alineamiento. Puede determinarse un % de identidad todo a lo largo de cada una de las secuencias que se están comparando (denominado alineamiento global), que es particularmente adecuado para secuencias de la misma o muy similar longitud, o por longitudes más cortas definidas (denominado alineamiento local), que es más adecuado para secuencias de longitud diferente.

Los procedimientos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, pueden usarse los programas disponibles en el paquete de análisis de secuencia Wisconsin, versión 9.1 (Devereux J *et al.*, 1984), por ejemplo los programas BESTFIT y GAP, para determinar el % de identidad entre dos polinucleótidos y el % de homología entre dos secuencias polipeptídicas. BESTFIT usa el algoritmo de "homología local" de Smith y Waterman (1981) y encuentra la mejor región única de similitud entre dos secuencias. Son también conocidos en la técnica otros programas para determinar la identidad y/o similitud entre secuencias, por ejemplo, la familia BLAST de programas (Altschul S F *et al.*, 1990, Altschul SF *et al.*, 1997, accesible a través de la página principal del NCBI en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y FASTA (Pearson WR, 1990; Pearson 1988).

5 Cualquiera de dichas muteínas tiene, preferiblemente, una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la de una IL-18BP, o suficientemente similar a la de una IL-18BP vírica, de tal modo que tiene una actividad sustancialmente similar a la de IL-18BP. Es una actividad de IL-18BP su capacidad de unirse a IL-18. A condición de que la muteína tenga una actividad de unión sustancial a IL-18, puede usarse en la purificación de IL-18, tal como mediante cromatografía de afinidad, y por tanto puede considerarse que tiene una actividad sustancialmente similar a IL-18BP. Por tanto, puede determinarse si cualquier muteína dada tiene sustancialmente la misma actividad que IL-18BP mediante experimentación rutinaria que comprende someter a dicha muteína, por ejemplo, a un ensayo competitivo en sándwich sencillo para determinar si se une o no a una IL-18 apropiadamente marcada, tal como radioinmunoensayo o ensayo ELISA.

10 Cualquiera de dichas muteínas tiene al menos un 40 % de identidad u homología con la secuencia de cualquiera de una IL-18BP o un homólogo de IL-18BP codificado por virus, como se define en el documento WO 99/09063. Más preferiblemente, tiene al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o, al menos un 90 % de identidad u homología con la misma.

15 Las muteínas de polipéptidos de IL-18BP o muteínas de IL-18B vírica o ácido nucleico que codifica las mismas incluyen un conjunto finito de secuencias sustancialmente correspondientes como péptidos o polinucleótidos de sustitución que pueden obtenerse rutinariamente por un experto en la técnica, sin experimentación indebida, basándose en las enseñanzas y guías presentadas en la presente memoria.

20 Los cambios preferidos de muteínas son las conocidas como sustituciones "conservativas". Las sustituciones aminoácidas conservativas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP o IL-18BP víricas pueden incluir aminoácidos sinónimos de un grupo que tiene propiedades fisicoquímicas suficientemente similares, de modo que la sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Resulta evidente que pueden hacerse también inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones implican solo unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de 30, y preferiblemente menos de 10, y no retiran ni desplazan aminoácidos que sean críticos para la conformación funcional, por ejemplo, residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas mediante dichas deleciones y/o inserciones entran dentro del alcance de la presente invención.

25 Preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla 1. Más preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla 2, y lo más preferiblemente, los grupos aminoácidos sinónimos son aquellos definidos en la Tabla 3.

30 TABLA 1

Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn

Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

TABLA 2

Grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

TABLA 3

Los grupos más preferidos de aminoácidos sinónimos

Aminoácido	Grupo sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr

Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Los ejemplos de producción de sustituciones aminoacídicas en proteínas que pueden usarse para obtener muteínas de polipéptidos o proteínas de IL-18BP, o muteínas de IL-18BP víricas, incluyen cualquier etapa de método conocida, tal como se presentan en las patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462 de Mark *et al.*; 5.116.943 de Koths *et al.*, 4.965.195 de Namen *et al.*; 4.879.111 de Chong *et al.* y 5.017.691 de Lee *et al.* y proteínas sustituidas con lisina presentadas en la patente de EE.UU. nº 4.904.584 (Shaw *et al.*).

El término "proteína fusionada" hace referencia a un polipéptido que comprende una IL-18BP o una IL-18BP vírica o una muteína o fragmento de las mismas, fusionada con otra proteína que, por ejemplo, tiene un tiempo de residencia ampliado en fluidos corporales. Por tanto, una IL-18BP o IL-18BP vírica puede estar fusionada con otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o fragmento de la misma.

"Derivados funcionales" como se usa en la presente memoria cubre derivados de IL-18BP o IL-18BP vírica y sus muteínas y proteínas fusionadas, que pueden prepararse a partir de grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales en los residuos o los grupos N- o C-terminales por medios conocidos en la técnica, y están incluidos en la invención a condición de que permanezcan farmacéuticamente aceptables, concretamente, de que no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IL-18BP o IL-18BP vírica, y que no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

Estos derivados incluyen cadenas laterales de polietilenglicol que pueden enmascarar sitios antigénicos y ampliar la residencia de una IL-18BP o IL-18BP vírica en fluidos corporales. Se dan a conocer también en la presente memoria derivados que incluyen ésteres alifáticos de grupos carboxilo, amidas de grupos carboxilo por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados de N-acilo de grupos amino libres de los residuos aminoacídicos formados por restos acilo (por ejemplo, grupos alcanóilo o aroilo carbocíclicos) o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, aquellos de residuos de serilo o treonilo) formados por restos acilo.

Como "fracciones activas" de una IL-18BP o IL-18BP vírica y proteínas fusionadas, la presente invención cubre cualquier fragmento o precursor de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína sola o junto con moléculas asociadas o residuos ligados a la misma, por ejemplo residuos de azúcar o fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los residuos de azúcar por sí mismos, siempre y cuando dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a IL-18BP.

El término "sales" hace referencia en la presente memoria tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácido de grupos amino de la molécula inhibidora de IL-18, o análogos de la misma. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de cinc, y sales con bases orgánicas tales como aquellas formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina o procaína. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualquiera de dichas

sales debe retener la actividad biológica del inhibidor de IL-18 relevante para la presente invención, tal como ejercer un efecto beneficioso sobre HTR, por ejemplo.

5 En una realización preferida adicional, el inhibidor de IL-18 es un anticuerpo de IL-18. Los anticuerpos anti-IL-18 pueden ser policlonales o monoclonales, quiméricos, humanizados o incluso totalmente humanos. Los anticuerpos recombinantes y fragmentos de los mismos se caracterizan por su alta afinidad de unión a IL-18 *in vivo* y su baja toxicidad. Los anticuerpos se caracterizan por su capacidad de tratar pacientes durante un periodo suficiente para tener una regresión de buena a excelente o el alivio de la afección patogénica o de cualquier síntoma o grupo de síntomas relacionados con una afección patogénica, y una baja toxicidad.

10 Los anticuerpos neutralizantes se generan fácilmente en animales tales como conejos, cabras o ratones mediante inmunización con IL-18. Los ratones inmunizados son particularmente útiles para proporcionar fuentes de linfocitos B para la fabricación de hibridomas, que a su vez se cultivan para producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales anti-IL-18.

15 Los anticuerpos quiméricos son moléculas de inmunoglobulina caracterizadas por dos o más segmentos o porciones derivados de especies animales diferentes. Generalmente, la región variable del anticuerpo quimérico deriva de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como anticuerpo monoclonal de múrido, y la región constante de inmunoglobulina deriva de una molécula de inmunoglobulina humana. Preferiblemente, ambas regiones y la combinación tienen una baja inmunogenicidad como se determina rutinariamente (Elliott *et al.*, 1994). Los anticuerpos humanizados son moléculas de inmunoglobulina creadas mediante técnicas de ingeniería genética en que las regiones constantes de múrido se reemplazan por las contrapartidas humanas, reteniendo las regiones de unión a antígeno de múrido. El anticuerpo quimérico de ratón-humano resultante tiene preferiblemente una inmunogenicidad reducida y una farmacocinética mejorada en seres humanos (Knight *et al.*, 1993).

20 Por tanto, en una realización preferida adicional, el anticuerpo de IL-18 es un anticuerpo de IL-18 humanizado. Los ejemplos preferidos de anticuerpos anti-IL-18 humanizados se describen en la solicitud de patente europea EP 0.974.600, por ejemplo.

25 En una realización adicional más, el anticuerpo de IL-18 es totalmente humano. La tecnología para producir anticuerpos humanos se describe con detalle, por ejemplo, en los documentos WO00/76310, W099/53049, US 6.162.963 o AU5336100. Los anticuerpos totalmente humanos son anticuerpos recombinantes, producidos preferiblemente en animales transgénicos, por ejemplo xenorratones, que comprenden todos o parte de los loci de inmunoglobulina humana funcionales.

30 En una realización altamente preferida de la presente invención, el inhibidor de IL-18 es una IL-18BP como se define en la reivindicación 1.

Las secuencias de IL-18BP y sus variantes de corte y empalme/isoformas pueden tomarse del documento WO99/09063 o de Novick *et al.*, 1999, así como de Kim *et al.*, 2000.

35 Los derivados funcionales de IL-18BP pueden conjugarse con polímeros para mejorar las propiedades de la proteína, tal como estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por el cuerpo humano o inmunogenicidad. Para conseguir este objetivo, la IL-18BP puede ligarse, por ejemplo, a polietilenglicol (PEG). La pegilación puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos, descritos en el documento WO 92/13095 por ejemplo.

40 Por lo tanto, en una realización preferida, los derivados funcionales comprenden al menos un resto unido a uno o más grupos funcionales, que aparecen como una o más cadenas laterales en los residuos aminoácidos. Es altamente preferida una realización en que el resto es un resto de polietilenglicol (PEG).

45 En una realización preferida adicional de la invención, el inhibidor de IL-18 comprende una fusión de inmunoglobulina, concretamente el inhibidor de IL-18 es una proteína fusionada que comprende toda o parte de una proteína de unión a IL-18, que está fusionada con toda o una parte de una inmunoglobulina. Los métodos para preparar proteínas de fusión de inmunoglobulina son bien conocidos en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 01/03737, por ejemplo. El experto en la técnica entenderá que la proteína de fusión resultante de la invención retiene la actividad biológica de IL-18BP, en particular la unión a IL-18. La fusión puede ser directa o a través de un péptido ligador corto que puede ser tan corto como de 1 a 3 residuos aminoácidos de longitud o más, por ejemplo de 13 residuos aminoácidos de longitud. Dicho ligador puede ser un tripéptido de secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), por ejemplo, o una secuencia ligadora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de IL-18BP y la secuencia de inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene propiedades mejoradas, tales como un tiempo de residencia en fluidos corporales (semivida) ampliado, una actividad específica aumentada, un nivel de expresión aumentado o la purificación de la proteína de fusión facilitada.

55 En una realización preferida, se fusiona IL-18BP con la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, se fusiona con regiones de cadena pesada como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana, por ejemplo. La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden IL-18BP y una parte de una inmunoglobulina se describe en el ejemplo 11 del documento WO 99/09063, por ejemplo. Son también adecuadas otras isoformas de

moléculas de Ig para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, tales como las isoformas IgG<sub>2</sub> o IgG<sub>4</sub> u otras clases de Ig, como IgM o IgA, por ejemplo. Las proteínas de fusión pueden ser monoméricas o multiméricas, heteromultiméricas u homomultiméricas.

5 Los interferones son predominantemente conocidos por los efectos inhibidores sobre la replicación vírica y la proliferación celular. El interferón  $\gamma$ , por ejemplo, desempeña un papel importante en la promoción de las respuestas inmunitaria e inflamatoria. El interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ , un interferón de tipo I) se dice que desempeña un papel antiinflamatorio.

Por lo tanto, la invención se refiere también al uso de una combinación de inhibidor de IL-18 e interferón en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de hipersensibilidad.

10 Los interferones pueden conjugarse también con polímeros para mejorar la estabilidad de las proteínas. Se ha descrito un conjugado entre el interferón  $\beta$  y el políol polietilenglicol (PEG) en el documento W099/55377, por ejemplo.

En otra realización, el interferón es interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) y más preferiblemente IFN- $\beta$  1a.

15 El inhibidor de la producción y/o acción de IL-18 se usa preferiblemente simultánea, secuencial o separadamente con el interferón.

En una realización adicional más de la invención, se usa un inhibidor de IL-18 en combinación con un antagonista de TNF. Los antagonistas de TNF ejercen su actividad de varios modos. En primer lugar, los antagonistas pueden unirse a o captar la molécula de TNF misma con suficiente afinidad y especificidad para neutralizar parcial o sustancialmente el epítipo o epítopos de TNF responsables de la unión del receptor de TNF (denominados de aquí en adelante "antagonistas de captación"). Un antagonista de captación puede ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra TNF.

20

Como alternativa, los antagonistas de TNF pueden inhibir la ruta de señalización de TNF activada por el receptor de superficie celular después de la unión de TNF (denominados de aquí en adelante "antagonistas de señalización"). Ambos grupos de antagonistas son útiles, solos o conjuntamente, en combinación con un inhibidor de IL-18, en la terapia de trastornos de hipersensibilidad.

25

Los antagonistas de TNF se identifican fácilmente y se evalúan mediante cribado rutinario de candidatos por su efecto sobre la actividad de TNF nativo sobre estirpes celulares sensibles *in vitro*, por ejemplo linfocitos B humanos, en las que el TNF causa proliferación y secreción de inmunoglobulina. El ensayo contiene una formulación de TNF a diluciones variables de candidato a antagonista, por ejemplo, de 0,1 a 100 veces la cantidad molar de TNF usada en el ensayo, y controles sin TNF o solo antagonista (Tucci *et al.*, 1992).

30

Los antagonistas de captación son los antagonistas de TNF preferidos para usar según la presente invención. Entre los antagonistas de captación, se prefieren aquellos polipéptidos que se unen a TNF con alta afinidad y poseen una baja inmunogenicidad. Se prefieren particularmente las moléculas de receptor de TNF soluble y anticuerpos neutralizantes de TNF. Por ejemplo, TNF-RI y TNF-RII solubles son útiles en la presente invención. Son antagonistas más particularmente preferidos según la presente invención las formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares de los receptores o partes funcionales de los mismos. Se describen receptores de TNF solubles truncados de tipo I y tipo II en el documento EP914431, por ejemplo.

35

Las formas truncadas de receptores de TNF son solubles y se han detectado en orina y suero como proteínas de unión inhibitoras de TNF de 30 y 40 kDa, que se denominan TBPI y TBPII, respectivamente (Engelmann *et al.*, 1990). Se prefiere según la invención el uso simultáneo, secuencial o separado del inhibidor de IL-18 con el antagonista de TNF y/o un interferón.

40

Según la invención, TBP I y TBPII son antagonistas de TNF preferidos para usar en combinación con un inhibidor de IL-18. Los derivados, fragmentos, regiones y partes biológicamente activas de las moléculas de receptor que se parecen funcionalmente a las moléculas de receptor pueden usarse también en la presente invención. Dicho equivalente o derivado biológicamente activo de la molécula de receptor hace referencia a una parte del polipéptido, o secuencia que codifica la molécula de receptor, que es de suficiente tamaño y capaz de unirse a TNF con una afinidad tal que se inhiba o bloquee la interacción con el receptor de TNF unido a membrana.

45

En una realización preferida adicional, el TNF-RI soluble humano (TBPI) es el antagonista de TNF para usar según la invención. Se han descrito moléculas de receptor de TNF solubles naturales y recombinantes y métodos para su producción en las patentes europeas EP 308.378, EP 398.327 y EP 433.900.

50

El inhibidor de IL-18 puede usarse simultánea, secuencial o separadamente con el inhibidor de TNF.

En una realización preferida adicional de la invención, el medicamento comprende adicionalmente un agente antiinflamatorio tal como un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo) En una realización preferida, se usa un inhibidor de COX, y lo más preferiblemente un inhibidor de COX-2, en combinación con un inhibidor de IL-18. Los

inhibidores de COX son conocidos en la técnica. Se dan a conocer inhibidores de COX-2 específicos en el documento WO 01/00229, por ejemplo. Los componentes activos pueden usarse simultánea, secuencial o separadamente.

5 Las reacciones de hipersensibilidad se tratan frecuentemente con fármacos antialérgicos tales como antihistamínicos, cromolina, glucocorticoides o simpaticomiméticos. Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a una terapia de combinación que comprende un inhibidor de IL-18 y un fármaco antialérgico. Se prefiere de acuerdo con la presente invención el uso de un antihistamínico y/o cromolina y/o un glucocorticoide y/o un simpaticomimético para uso separado, secuencial o simultáneo con un inhibidor de IL-18.

10 En una realización preferida adicional de la presente invención, se usa el inhibidor de IL-18 en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 1000 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg, o de aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal.

15 El inhibidor de IL-18 según la invención se administra preferiblemente por vía tópica, concretamente por vía local. Para dermatitis de contacto, por ejemplo, el inhibidor de IL-18 puede administrarse directamente sobre la zona afectada de la piel.

En otra realización de la invención, se administra el inhibidor de IL-18 por vía sistémica, y preferiblemente subcutánea o intramuscular.

20 La invención se refiere adicionalmente al uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación de un inhibidor de IL-18 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de trastornos de hipersensibilidad. Por tanto, se considera un enfoque de terapia génica para suministrar el inhibidor de IL-18 al sitio donde se requiera. Para tratar y/o prevenir un trastorno de hipersensibilidad, el vector de terapia génica que comprende la secuencia de un inhibidor de la producción y/o acción de IL-18 puede inyectarse directamente en el tejido enfermo, por ejemplo, evitando por tanto los problemas implicados con la administración sistémica de vectores de terapia génica, como la dilución de los vectores, alcanzar y orientar a las células o tejidos diana y los efectos secundarios.

25 Se contempla también según la invención el uso de un vector para inducir y/o potenciar la producción endógena de un inhibidor de IL-18 en una célula normalmente carente de expresión de un inhibidor de IL-18, o que expresa cantidades del inhibidor que no son suficientes. El vector puede comprender secuencias reguladoras funcionales en las células en que se desea expresar el inhibidor de IL-18. Dichas secuencias reguladoras pueden ser promotoras o potenciadoras, por ejemplo. La secuencia reguladora puede introducirse entonces en el locus correcto del genoma mediante recombinación homóloga, ligando por tanto operativamente la secuencia reguladora con el gen cuya expresión se requiere inducir o potenciar. Se hace referencia habitualmente a la tecnología como "activación de gen endógeno" (AGE) y se describe, por ejemplo, en el documento WO 91/09955.

30 Se entenderá por el experto en la técnica que también es posible cancelar directamente la expresión de IL-18, sin usar un inhibidor de IL-18, con la misma técnica. Para hacer esto, puede introducirse un elemento de regulación negativa, como por ejemplo un elemento silenciador, en el locus génico de IL-18, conduciendo por tanto a la regulación negativa o supresión de la expresión de IL-18. El experto en la técnica entenderá que dicha regulación negativa o silenciamiento de la expresión de IL-18 tiene el mismo efecto que el uso de un inhibidor de IL-18 para prevenir y/o tratar enfermedades.

35 La invención se refiere adicionalmente al uso de una célula que se ha modificado genéticamente para producir un inhibidor de IL-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de trastornos de hipersensibilidad.

40 La invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas particularmente útiles para la prevención y/o el tratamiento de trastornos de hipersensibilidad, que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de IL-18 y/o una cantidad terapéuticamente eficaz de un interferón y/o una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de TNF y/o una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente antiinflamatorio y/o una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente antialérgico, en particular un antihistamínico.

IL-18BP y sus proteínas fusionadas, derivados funcionales y fracciones activas según la reivindicación 1 son los ingredientes activos preferidos de las composiciones farmacéuticas.

50 El interferón incluido en la composición farmacéutica es preferiblemente IFN- $\beta$ .

En otra realización preferida más, la composición farmacéutica comprende cantidades terapéuticamente eficaces de un inhibidor de TNF- $\alpha$ . La composición farmacéutica según la invención puede comprender adicionalmente uno o más inhibidores de COX.

55 La definición de "farmacéuticamente aceptable" pretende englobar cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico para el hospedador al que se administra. Por

ejemplo, para administración parenteral, la proteína o proteínas activas pueden formularse en forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como disolución salina, disolución de dextrosa, seroalbúmina y solución de Ringer.

5 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica según la invención pueden administrarse a un individuo de una variedad de modos. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal e intranasal. Puede usarse cualquier otra vía terapéuticamente eficaz de administración, por ejemplo absorción a través de tejido epitelial o endotelial o por terapia génica, en la que se administra una molécula de ADN que codifica el agente activo al paciente (por ejemplo a través de un vector) que causa que el agente activo se exprese y secrete *in vivo*. Además, la proteína o proteínas según la invención pueden administrarse junto con otros componentes de agentes biológicamente activos tales como tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

15 Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), la proteína o proteínas activas pueden formularse en forma de una disolución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, disolución salina, disolución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación se esteriliza mediante técnicas usadas comúnmente.

20 La biodisponibilidad de la proteína o proteínas activas según la invención puede mejorarse también usando procedimientos de conjugación que aumenten la semivida de la molécula en el cuerpo humano, por ejemplo, ligando la molécula con polietilenglicol como se describe en la solicitud de patente WO 92/13095.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de la proteína o proteínas activas serán función de muchas variables, incluyendo el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista por IL-18, cualquier actividad citotóxica residual exhibida por los antagonistas, la vía de administración y la condición clínica del paciente (incluyendo la conveniencia de mantener un nivel no tóxico de actividad de IL-18 endógena).

25 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que, cuando se administra, el inhibidor de IL-18 da como resultado la inhibición de la actividad biológica de IL-18. La dosificación administrada, como dosis única o múltiples, a un individuo variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas del inhibidor de IL-18, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, tamaño), la extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* de determinación de la inhibición de IL-18 en un individuo.

35 Según la invención, el inhibidor de IL-18 se usa en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg o de aproximadamente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 2 mg/kg de peso corporal.

La vía de administración que se prefiere según la invención es la administración por vía subcutánea. La administración intramuscular es preferida adicionalmente según la invención. Para administrar el inhibidor de IL-18 directamente en su lugar de acción, se prefiere también administrar por vía tópica.

En realizaciones preferidas adicionales, se administra el inhibidor de IL-18 diariamente o cada dos días.

40 Las dosis diarias se procuran habitualmente en dosis divididas o en forma de liberación mantenida eficaz para obtener los resultados deseados. Pueden efectuarse la segunda o posteriores administraciones a una dosificación que es la misma, menor o mayor que la dosis inicial o anterior administrada al individuo. Puede administrarse una segunda o posterior administración durante o antes del inicio de la enfermedad.

45 Según la invención, el inhibidor de IL-18 puede administrarse de forma profiláctica o terapéutica a un individuo antes de, simultánea o secuencialmente con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, múltiples regímenes de fármacos) en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular con un interferón y/o un inhibidor de TNF y/u otro agente antiinflamatorio tal como un inhibidor de COX y/o un agente antialérgico. Los agentes activos que se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos pueden administrarse en la misma o diferentes composiciones.

50 La invención se refiere adicionalmente a un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende mezclar una cantidad eficaz de un inhibidor de IL-18 y/o un interferón y/o un antagonista de TNF y/o un inhibidor de COX con un portador farmacéuticamente aceptable.

55 La invención se refiere adicionalmente a un método de tratamiento de trastornos de hipersensibilidad que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de un inhibidor de IL-18 a un paciente necesitado de ello.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: El tratamiento con IL-18BP reduce la hipersensibilidad de contacto

#### Métodos

5 Se usaron modelos de mûrido de hipersensibilidad de contacto (HSC) inducida experimentalmente en todos los ejemplos siguientes. Se mide la extensión de la HSC por la hinchazón de oreja en respuesta a un sensibilizante aplicado por vía local.

10 El ensayo de hinchazón de oreja de ratón que se usó para generar los datos presentados en las Fig. 1 a 3 (véase a continuación) se ha descrito con detalle (Garrigue *et al.*, 1994). Brevemente, se sensibilizaron los ratones por vía tópica aplicando 25 µl de disolución de 2,4-dinitrofluorobenceno al 0,5 % (DNFB; Sigma Chemical Co.) en acetona/aceite de oliva (4:1) al abdomen afeitado (día 0). 5 días después, se aplicaron 20 µl de DNFB al 0,2 % en el mismo vehículo a las orejas derechas y vehículo solo a las orejas izquierdas.

Cada ratón recibió diariamente, del día 5 al día 8, 250 µg/ratón/día de rhIL-18BP (IL18BP humana recombinante) o disolución salina en el grupo de control por vía intraperitoneal (i.p.) (Fig. 1A), o recibieron IL-18BP los días 0 a 2 (Fig. 1B).

15 Se midió el grosor de la oreja con un calibre de espesor de esfera (Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japón), y se estimó la hinchazón de oreja restando el valor antes de exposición de después de exposición, y restando adicionalmente cualquier hinchazón detectada en la oreja contralateral expuesta a vehículo.

Se midió la hinchazón de oreja los días 0, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14 y 16.

20 Se usó otro modelo para generar los datos presentados en las Fig. 4 a 6, véanse los ejemplos siguientes. Se usó la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) para neutralizar IL-18 durante hipersensibilidad de contacto (HSC) inducida experimentalmente ante 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB). La configuración experimental era como sigue:

#### 1. Día 0: Sensibilización

25 µl de DNFB (al 0,5 % en acetona/aceite de oliva (4/1) como vehículo) sobre el lomo afeitado

#### 2. Día 5: Exposición

25 5 µl de DNFB (al 0,2 %) en cada uno del lado dorsal y ventral de la oreja derecha

5 µl de vehículo en cada uno del lado dorsal y ventral de la oreja izquierda

#### 3. Día 6 y siguientes: Lectura

Monitorizar el grosor de la oreja como medida de la inflamación

Expresar la puntuación como aumento de la hinchazón [µm] de la oreja expuesta frente a la de control

#### 30 4. Día 6 o 7: Procesamiento de orejas para análisis

En este modelo, la hinchazón alcanza el máximo entre los días 6 y 7. Se neutralizó la IL-18 mediante inyecciones diarias de 250 µg de IL-18BP (en disolución salina) por animal, durante la sensibilización el día 0, día 1 y día 2 o durante la exposición el día 4, día 5 y día 6.

#### Resultados

35 Las respuestas de hipersensibilidad de contacto (HSC) son inflamaciones cutáneas específicas de hapteno mediadas por linfocitos T. La mayoría de haptenos dan lugar a una respuesta de linfocitos T oligoclonal consistente principalmente en linfocitos T efectoros CD8+, mientras que los linfocitos T CD4+ tienen un papel regulador negativo en la respuesta de HSC (Bour, H., *et al.* 1995; Grabbe *et al.*, 1998). Para ensayar el papel de la IL-18 en la HSC, se sensibilizaron por vía epicutánea ratones con DNFB, y se expusieron entonces 5 días después a aplicación de hapteno en la piel de la oreja. Al mismo tiempo que la exposición a hapteno, se inyectó a los ratones i.p. 250 µg/ratón/día de rhIL-18BP o disolución salina. Se administró diariamente IL-18BP o disolución salina como control durante 3 días, de los días 5 a 8 después de la primera sensibilización con DNFB (día 0). La exposición a DNFB el día 5 indujo una hinchazón de oreja significativa en ambos grupos (Fig. 1A). La extensión de la hinchazón en ratones tratados con disolución salina (triángulos) era mucho más pronunciada que en ratones tratados con IL-18BP (cuadrados), y volvió a un estado casi normal ya el día 9.

El cambio de hinchazón de oreja observado con el tratamiento con IL-18BP los días 0 a 2 no era estadísticamente significativo (Fig. 1B). El momento de administración de IL-18BP parece ser un factor importante para obtener un efecto beneficioso del tratamiento con IL-18BP.

Conclusión:

En este modelo de mrido establecido de hipersensibilidad de contacto/dermatitis de contacto, un tratamiento de 3 días con un inhibidor de IL-18 tenía un efecto beneficioso significativo sobre la hinchazón/inflamación provocado por el tratamiento con hapteno.

5 Ejemplo 2: El tratamiento con IL-18BP reduce la hipersensibilidad de contacto después de una segunda exposición

Métodos

10 Se sensibilizaron ratones C57BL/6 por aplicación epicutánea de 25 µl de disolución de DNFB al 0,5 % sobre el abdomen afeitado (día 0). Los ratones recibieron una primera exposición de 20 µl de DNFB al 0,2 % en las orejas el día 5. El día 19, los ratones recibieron una segunda exposición a DNFB. Se midió la hinchazón de la oreja los días 0 (sensibilización con hapteno), 5 (1ª exposición a hapteno), 6, 7, 8, 9, 12, 14, 16, 19 (2ª exposición a hapteno), 20, 21, 22, 23, 26, 28 y 30. Se presentan los valores medios con DE para cada grupo en la Fig. 2. Se trataron los ratones diariamente con 250 µg/ratón/día de IL-18BP i.p. (n = 5; Fig. 2 cuadrados blancos) o con disolución salina (n = 5; Fig. 2, cuadrados negros) del día 19 al día 23.

Resultado

15 Como se muestra en la Fig. 2, el tratamiento con IL-18BP reducía significativamente la hinchazón de oreja, en particular después de la segunda exposición a hapteno.

Por lo tanto, la terapia con IL-18BP es particularmente adecuada para la terapia de trastornos de hipersensibilidad, en que habitualmente los pacientes se exponen repetidamente al mismo alérgeno y tienen que tratarse para superar las reacciones inflamatorias provocadas por las exposiciones.

20 Ejemplo 3: La IL-18BP protege de HSC al neutralizar la IL-18

25 Para verificar que la protección de la hinchazón observada con el tratamiento con IL-18BP era debida a la neutralización de IL-18, se compar en ratones C57BL/6 deficientes en IL-18 (KO) y de tipo silvestre su capacidad de generar una respuesta de HSC. Los ratones deficientes en IL-18 desarrollan una HSC ante DNFB, aunque menos pronunciada que los ratones de tipo silvestre. Sin embargo, no se observó efecto del tratamiento de IL-18BP en ratones deficientes en IL-18, como se muestra en la Fig. 3, indicando que el efecto antiinflamatorio de IL-18BP en HSC era debido a la neutralización de IL-18 (n = 5 ratones por grupo).

Ejemplo 4: La IL-18BP no reduce la exudación vascular

Métodos

30 Se indujo HSC en ratones C57BL/6 como se describe anteriormente. Para monitorizar el edema causado por la reacción de HSC, se inyectó azul de Evans i.v. 2 h antes de la exposición a DNFB. Se sacrificaron los ratones 24 h después y se procesaron las orejas para extraer el tinte que había exudado de los vasos y acumulado en el tejido circundante. Se valor la exudación vascular como la cantidad de tinte por mg de tejido de oreja secado corregida por la concentración de azul de Evans en suero, y expresada como la relación de oreja expuesta frente a control. Aunque el tratamiento con IL-18BP el día 4 y el día 5 reducía la hinchazón a un 56 % de la del control tratado con vehículo (Fig. 4, panel izquierdo, p < 0,01), no había diferencias significativas en la exudación vascular entre estos dos grupos (Fig. 4, panel derecho). Ambos grupos mostraban un edema significativamente aumentado en comparación con el grupo de control no sensibilizado (p < 0,05 y p < 0,01). Como control adicional, se trataron los ratones con 250 µg de la proteína irrelevante BSA por animal y día. Estos ratones desarrollaban HSC como los animales de control tratados con vehículo (n =10 ratones por grupo).

40 *Ensayo in vivo para exudación vascular (azul de Evans)*

Principio: Inyección (iv) de azul de Evans y extracción del tejido diana (oreja)

Datos brutos para valorar:

- curva patrón de azul de Evans (DO<sub>620</sub>/ng)
- concentración de azul de Evans en sangre (DO<sub>620</sub>/ml o µg/ml, respectivamente)
- 45 • peso de tejido de orejas secado (ipsilateral y contralateral, mg)
- contenido de azul de Evans en las orejas (ipsilateral y contralateral, DO<sub>620</sub>/µg o ng/mg, respectivamente)

Protocolo en combinación con HSC inducida por DNFB:

- el día 5 de HSC inducida experimentalmente, inyectar 100 µl de azul de Evans<sup>α</sup> iv por vía retroorbital 2 h antes de exposición de los ratones a DNFB
  - inyectar IL-18BP i.p. 1 h antes de la exposición
  - el día 6 (24 h después de la exposición de la oreja a DNFB), medir la hinchazón y sacrificar los animales
- 5
- tomar muestras de sangre y procesar como sigue:
    - añadir 30 µl de suero a 970 µl de formamida (→ dilución 1/33)
    - determinar la DO a 620 nm (→ 1 DO<sub>620</sub> es igual a 33 DO<sub>620</sub>/ml)
  - recoger las orejas ipsilateral y contralateral y procesar como sigue:
    - secar durante 24 h a 80 °C
- 10
- determinar el peso seco
  - triturar y extraer el tinte con 1 ml de formamida, agitando suavemente durante 24 h a 55 °C
  - filtrar para retirar los desechos<sup>β</sup>, rellenar cubetas, dejar reposar a TA durante varias horas para permitir que los lípidos floten hasta la parte superior
  - determinar la DO a 620 nm

15 Valores para calcular:

**Exudación:** → contenido de azul de Evans por peso de tejido seco (ng/mg) / concentración de azul de Evans en suero (µg/ml)

**Exudación relativa:** → 100 x exudación experimental / exudación de vehículo

Resultados:

- 20 Básicamente, dos procesos contribuyen a la hinchazón observada durante la reacción de HSC: la exudación de líquido desde los vasos al tejido circundante, causando edema, y la extravasación de células inflamatorias de los vasos sanguíneos al sitio de daño de tejido.

Usando azul de Evans como trazador, se demostró que, a pesar de la reducción global de la hinchazón, el tratamiento con IL-18BP no reducía la exudación vascular (Fig. 4).

25 Ejemplo 5: El tratamiento con IL-18BP reduce la infiltración inflamatoria y la producción de IFN-γ de la oreja expuesta a DNFB

Métodos

- 30 Se indujo HSC en ratones C57BL/6 como se describe. Los animales se trataron con IL-18BP o vehículo los días 4 a 6. El tratamiento con IL-18BP redujo la hinchazón al 58 % de la del control de vehículo el día 7. Se sacrificaron los ratones el día 7, se recogieron las orejas expuestas, se combinaron en grupos (n = 8) y se digirieron enzimáticamente, obteniendo suspensiones monocelulares. Se caracterizaron las células por análisis de FACS posterior que clasifica las células vivas positivas de CD45. Se expresa el número de linfocitos αβ, linfocitos NK, neutrófilos y monocitos/macrófagos encontrados en las preparaciones de oreja como un porcentaje de las células totales analizadas. Se calculó también la reducción de estos tipos celulares después de tratamiento con IL-18BP respecto al control de vehículo.

Para la medida de la producción de IFN-γ, se reestimularon las células obtenidas a partir de orejas expuestas a DNFB a  $2 \times 10^5$  por pocillo con anticuerpo anti-CD3 unido a placa. No se añadió más IL-18BP durante el periodo de cultivo de 24 h posterior. Se midió la producción de IFN-γ por triplicado en ELISA.

- 40 Se estimularon preparaciones celulares de orejas expuestas a DNFB con PMA\* 50 ng/ml y Ionomicina 50 ng/ml durante 4 h. Se bloqueó la secreción de citocina mediante la adición de brefeldina A 2 µg/ml durante las últimas 2 h de incubación. Se sometieron entonces las células a tinción inmunofluorescente multicolor para IFN-γ intracelular y

---

<sup>α</sup> 7,5 mg/ml de azul de Evans (Σ2129) en NaCl fisiológico, 100 µl, iv

<sup>β</sup> filtro de preparación de muestra Whatman, PTFE de malla 5 µm, n° 6894.0350

antígenos de superficie. El IFN- $\gamma$  se producía por linfocitos T CD8 y en menor extensión por linfocitos T CD4. No se detectó IFN- $\gamma$  en linfocitos NK ni linfocitos T  $\alpha\beta$  (n.d., no detectado; \* 12-miristato 13-acetato de forbol).

*Preparación de una suspensión monocelular*

5 Se basó la digestión enzimática de orejas de ratón para obtener una suspensión monocelular en los protocolos de Schuler, G. y Steinman, R.M. (1985) y Stingl *et al.* (1983).

1. cortar orejas, combinar 5 orejas por preparación
2. aclarar con etanol al 70 %
3. dividir con la ayuda de pinzas
4. poner el lado dérmico hacia abajo en 7,5 ml de HBSS<sup>1</sup> a 37 °C
- 10 5. añadir 5 ml de tripsina al 2,5 %<sup>2</sup> (10x), obteniéndose una conc. final del 1 %
6. incubar durante 35 min a 37 °C
7. transferir las mitades de oreja con el lado dérmico hacia abajo a un tamiz de nailon (filtro celular) dispuesto en 10 ml de HBSS/80 % de FCS sobre hielo y remover suavemente para desalojar las células de la matriz extracelular
- 15 8. retirar los tamices con desechos grandes
9. lavar 2x con HBSS/10 % de FCS frío
10. contar las células

*Análisis FACS*

1. resuspender células en tampón de tinción FACS<sup>3</sup>, todas las etapas posteriores en hielo
- 20 2. usar 10<sup>6</sup> células por tinción
3. añadir 1  $\mu$ g de FC-Block, 10 min
4. añadir anticuerpo anti-CD45 en combinación con anticuerpos dirigidos contra marcadores de interés, 1  $\mu$ g cada uno, 30 min
5. lavar 2x
- 25 6. adquirir 0,5 x 10<sup>6</sup> eventos totales por FACS
7. analizar los marcadores específicos después de clasificar las células vivas CD45+.

Resultados:

30 Para examinar el infiltrado inflamatorio en el sitio de exposición, se analizaron las suspensiones monocelulares preparadas a partir de orejas no expuestas y expuestas mediante FACS, clasificando células vivas CD45+ (Fig. 5). Se mostró que las células CD45+ presentes en la oreja nativa eran principalmente linfocitos T  $\gamma\delta$  y células dendríticas de la piel. El infiltrado inflamatorio 24 h después de la exposición estaba compuesto por linfocitos T CD8 y CD4, neutrófilos, monocitos y linfocitos NK, aumentando el número de células CD45+ en la oreja aproximadamente 2 veces. Correspondientemente a la reducción de la hinchazón, el tratamiento con IL-18BP reducía el número global de leucocitos que infiltran el sitio de exposición. Esto afectaba a todos los tipos celulares diferentes del infiltrado inflamatorio. La reducción ascendía a entre 20 y 40 %, dependiendo del tipo celular.

35 La caracterización adicional de la calidad del infiltrado obtenido a partir de las orejas de ratones tratados con IL-18BP reveló una producción de IFN- $\gamma$  defectuosa tras reestimulación anti-CD3 (Fig. 6). El análisis FACS mostró que

<sup>1</sup> disolución salina equilibrada de Hanks sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> (nº GIBCO 14170.070)

<sup>2</sup> tripsina al 2,5 %/EDTA (10x) (nº GIBCO 35400-027)

<sup>3</sup> seroalbúmina bovina al 1 % en disolución salina tamponada con fosfato

el IFN- $\gamma$  se producía principalmente por linfocitos T CD8 y en menor cantidad por linfocitos T CD4. De forma interesante, los linfocitos NK y linfocitos T  $\gamma\delta$  no contribuían a la producción de IFN- $\gamma$  (Fig. 7).

Ejemplo 6: La IL-18BP no perjudica el agrupamiento de células de Langerhans

Método:

5 Se pintaron los ratones con el hapteno FITC (50  $\mu$ l de una disolución 4 mg/ml) o vehículo de acetona/ftalato de dibutilo (1:1) sobre el flanco derecho e izquierdo, respectivamente. Se recogieron los nódulos linfáticos inguinales 24 h después de pintar. Las células de Langerhans conjugadas con hapteno pudieron detectarse por FACS como células FITC+, CD11c+ en el nódulo linfático de drenaje del flanco pintado con FITC, pero no en el nódulo linfático contralateral de drenaje del flanco pintado con solo vehículo (n = 5 nódulos linfáticos de drenaje por grupo).

10 Resultados:

La migración de células de Langerhans (CL) que portan antígeno al nódulo linfático de drenaje depende de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  y está regulada por la caspasa 1 (Antonopoulos *et al.*, 2001; Kimber *et al.*, 1992). En consecuencia, se ha implicado a IL-18 en la contribución al tráfico de CL (Cumberbatch *et al.*, 2001). Por lo tanto, el tratamiento con IL-18BP podría perjudicar el agrupamiento de CL y por lo tanto reducir la respuesta inmunitaria ante DNFB durante la fase de exposición. Para ensayar esta hipótesis, se pintaron los ratones con el hapteno FITC o el vehículo sobre el flanco derecho e izquierdo, respectivamente. Se recogieron los nódulos linfáticos inguinales de drenaje de la piel 24 h después de pintar y se valoró el número de células FITC+ por nódulo linfático. El tratamiento de los animales con IL-18BP 24 h y 1 h antes de pintar no cambió el número de CL portadoras de hapteno presentes en el nódulo linfático de drenaje 24 h después de pintar (Fig. 8). Por lo tanto, no hay una contribución importante de IL-18 al tráfico de CL en este modelo.

Ejemplo 7: La IL-18BP reduce la extensión de la hipersensibilidad de tipo retardado en otro modelo de murido de HTR

Métodos

*Hipersensibilidad de tipo retardado*

25 Se sensibilizan los ratones mediante la inyección intravenosa de 10<sup>6</sup> esplenocitos de BALB/c y se exponen el día 5 a 13 x 10<sup>6</sup> esplenocitos de BALB/c (en 50  $\mu$ l de PBS) en las almohadillas plantares derechas. Las almohadillas plantares izquierdas reciben 50  $\mu$ l de PBS. Se calcula la hinchazón de la almohadilla plantar derecha en diferentes días restando el valor antes de exposición y cualquier hinchazón medida en las almohadillas plantares izquierdas del valor después de exposición.

30 Para experimentos de transferencia adoptiva, se liberan de células B220+ y CD8+ suspensiones celulares de nódulos linfáticos de animales sensibilizados con esplenocitos de BALB/c o de animales de control no tratados mediante incubación con B220-FITC y CD8-FITC de rata anti-ratón, seguido de separación en columnas MACS con microperlas paramagnéticas anti-FITC (Miltenyi Biotech, Auburn, California, EE.UU.). Se inyectan preparaciones enriquecidas en linfocitos T CD4+ en la vena de cola de los ratones receptores (2 x 10<sup>7</sup> células/ratón). Después de 35 16 horas, se exponen los ratones por inyección a 13 x 10<sup>6</sup> esplenocitos de BALB/c (sin eritrocitos) en las almohadillas plantares derechas, y se monitoriza la hinchazón a lo largo de los siguientes días.

Resultado

40 Se provoca la hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) por linfocitos T CD4+ con efectos reguladores negativos aparentes de los linfocitos T CD8+ (Grabbe *et al.*, 1998). Se estudia el comportamiento de los linfocitos T CD4+ de ratones tratados con IL-18BP en un modelo de HTR. Se sensibilizan animales C57BL/6 mediante inyección intravenosa de 10<sup>6</sup> esplenocitos de BALB/c alogénicos. 5 días después, se inyectan 13 x 10<sup>6</sup> esplenocitos de BALB/c en las almohadillas plantares derechas, junto con IL-18BP humana recombinante 10 mg/kg i.p. o vehículo. Se mide la inflamación local determinando la hinchazón de la almohadilla plantar a las 24 horas.

**Referencias**

45 1. Altschul S F *et al.*, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990, Altschul S F *et al.*, Nucleic Acids Res., 25: 389-3402, 1997

2. Antonopoulos, C., M. Cumberbatch, R. J. Dearman, R. J. Daniel, I. Kimber, y R. W. Groves. 2001. "Functional caspase-1 is required for Langerhans cell migration and optimal contact sensitization in mice". J. Immunol. 166: 3672-3677.

50 3. Bour, H., *et al.* 1995. "Major histocompatibility complex class I-restricted CD8 + T cells and class II-restricted CD4 + T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene". Eur. J. Immunol. 25: 3006-3010.

4. Chater, K. F. *et al.*, en "Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology", Akademiai Kaido, Budapest, Hungría (1986), pág. 45-54.
5. Conti, B., J. W. Jahng, C. Tinti, J. H. Son y T. H. Joh. 1997. "Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex". J. Biol. Chem. 272: 2035-2037.
- 5 6. Cumberbatch, M., R. J. Dearman, C. Antonopoulos, R. W. Groves e I. Kimber. 2001. "Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor-alpha- and IL-1beta-dependent mechanism". Immunology 102: 323-330.
7. Devereux J *et al.*, Nucleic Acids Res., 12, 387-395, 1984.
8. DiDonato, J A, Hayakawa, M, Rothwarf, D M, Zandi, E y Karin, M. (1997), Nature 388,16514-16517.
- 10 9. Elliott, M.J., Maini, R.N., Feldmann, M., Long-Fox, A., Charles, P., Bijl, H. y Woody, J.N., 1994, Lancet 344, 1125-1127.
10. Engelmann, H., D. Novick y D. Wallach. 1990. "Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors". J. Biol. Chem. 265: 1531-1536.
- 15 11. Garrigue JL, Nicolas JF, Fragnals R, Benezra C, Bour H, Schmitt D. Contact Dermatitis abril de 1994; 30(4): 231-7
12. Grabbe, S. y Schwarz, T. 1998. "Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity". Immunol. Today. 19: 37-44
13. Habu *et al.*, J. Immunol. 2001, 166: 5439-5347.
- 20 14. Hanifin *et al.* (1993). J. Am. Acad. Dermatol., 28: 189.
15. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. "Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18". Proc Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 1190-1195.
- 25 16. Kimber, I. y M. Cumberbatch. 1992. "Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)". J. Invest. Dermatol. 99: 48S-50S.
17. Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann y K. H. Grabstein. 1990. "Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro". J. Immunol. 144: 3028-3033.
- 30 18. Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda y M. Kurimoto. 1996. "Interferon-gamma inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells; synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production". Eur. J. Immunol. 26: 1647-51 issn: 0014-2980.
19. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Infect. Immun. febrero de 1989; 57(2): 590-5.
20. Novick, D, Kim, S-H, Fantuzzi, G, Reznikov, L, Dinarello, C y Rubinstein, M (1999). Immunity 10, 127-136.
- 35 21. Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tanimoto T, Nukata Y, Tanabe F, Akita K, Torigoe K, Okura T, Fukuda S, *et al.* Infect. Immun. octubre de 1995; 63(10): 3966-72
22. Parnet, P, Garka, K E, Bonnert, T P, Dower, S K y Sims, J E. (1996), J. Biol. Chem. 271, 3967-3970.
23. Reinhold *et al.* (1990). Lancet 335: 1282.
24. Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H. J. Clin. Invest. 1 de febrero de 1997; 99(3): 469-74.
- 40 25. Schuler, G. y Steinman, R.M. (1985). "Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro". J. Exp. Med. 161, 526-546.
26. Stingl, L.A., Sauder, D.N., Iijima, M., Wolff, K., Pehamberger, H. y Stingl, G. (1983) "Mechanism of UV-B-induced impairment of the antigen-presenting capacity of murine epidermal cells". J. Immunol. 130, 1586-1591.
- 45 27. Tucci, A., James, H., Chicheportiche, R., Bonnefoy, J.Y., Dayer, J.M. y Zubler, R.H., 1992, J. Immunol. 148, 2778-2784.

28. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, Tanabe F, Konishi K, Micallef M, Fujii M, Torigoe K, Tanimoto T, Fukuda S, Ikeda M, Okamura H, Kurimoto M. J. Immunol. 1 de junio de 1996; 156(11): 4274-9
29. Yoshimoto T, Takeda, K, Tanaka, T, Ohkusu, K, Kashiwamura, S, Okamura, H, Akira, S y Nakanishi, K (1998), J. Immunol. 161, 3400-3407.
- 5 30. Xu *et al.* (1998). J. of Interferon and Cytokine Research 18: 653-659.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de IL-18 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno de hipersensibilidad de tipo IV, en el que el inhibidor de IL-18 se selecciona de proteína de unión a IL-18 (IL-18BP),
- 5 una IL-18BP fusionada con una inmunoglobulina o un fragmento de la misma, en la que la proteína fusionada se une a IL-18,  
un derivado funcional de IL-18BP, en el que la IL-18BP está ligada a polietilenglicol (PEG),  
o una fracción activa de la misma que tiene una actividad similar a IL-18BP.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el trastorno de hipersensibilidad es hipersensibilidad de tipo retardado.
3. El uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el trastorno de hipersensibilidad es hipersensibilidad de contacto.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende adicionalmente un interferón, para uso simultáneo, secuencial o separado.
- 15 5. El uso según la reivindicación 4, en el que el interferón es interferón  $\beta$ .
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende adicionalmente un inhibidor del factor de necrosis tumoral (TNF) para uso simultáneo, secuencial o separado.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que el inhibidor de TNF es TBP I y/o TBP II.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende adicionalmente un agente antiinflamatorio, para uso simultáneo, secuencial o separado.
- 20 9. El uso según la reivindicación 8, en el que el agente antiinflamatorio es un inhibidor de COX.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento comprende adicionalmente un agente antialérgico para uso simultáneo, secuencial o separado.
- 25 11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de IL-18 se usa en una cantidad de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal o de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal o de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal o de 5 mg/kg de peso corporal.
12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el inhibidor de IL-18 se administra por vía subcutánea.
- 30 13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el inhibidor de IL-18 se administra por vía intramuscular.
14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el inhibidor de IL-18 se administra por vía tópica.
- 35 15. Uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación de un inhibidor de IL-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno de hipersensibilidad de tipo IV, en el que el inhibidor de IL-18 se selecciona de proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), proteína fusionada, derivado funcional como se definen en la reivindicación 1 o fracción activa de la misma que tiene una actividad similar a IL-18BP.
- 40 16. Uso de un vector para inducir y/o potenciar la producción endógena de un inhibidor de IL-18 en una célula en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno de hipersensibilidad de tipo IV, en el que el inhibidor de IL-18 se selecciona de proteína de unión a IL-18 (IL-18BP), proteína fusionada, derivado funcional como se define en la reivindicación 1 o fracción activa de la misma que tiene una actividad similar a IL-18BP.
- 45 17. Uso de una célula que se ha modificado genéticamente para producir un inhibidor de IL-18 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno de hipersensibilidad de tipo IV, en el que el inhibidor de IL-18 se selecciona de proteína de unión a IL-18, proteína fusionada, derivado funcional como se define en la reivindicación 1, o fracción activa de la misma que tiene una actividad similar a IL-18BP.

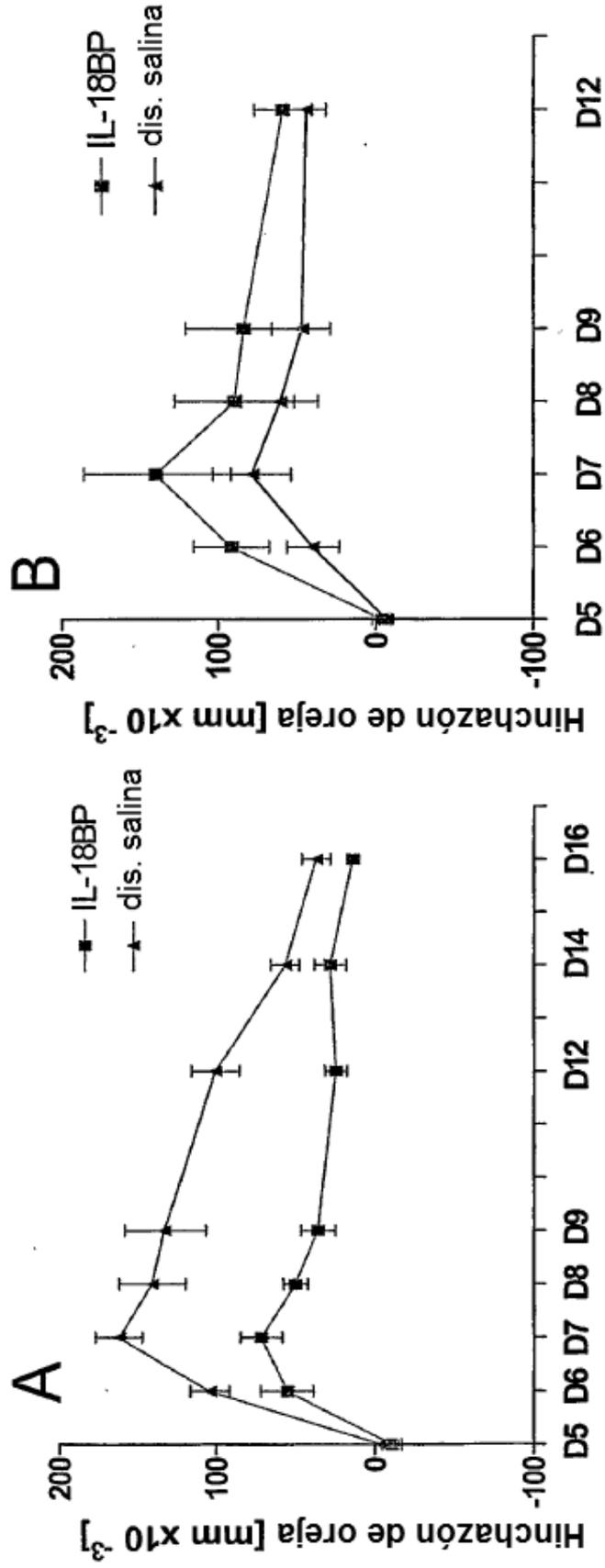
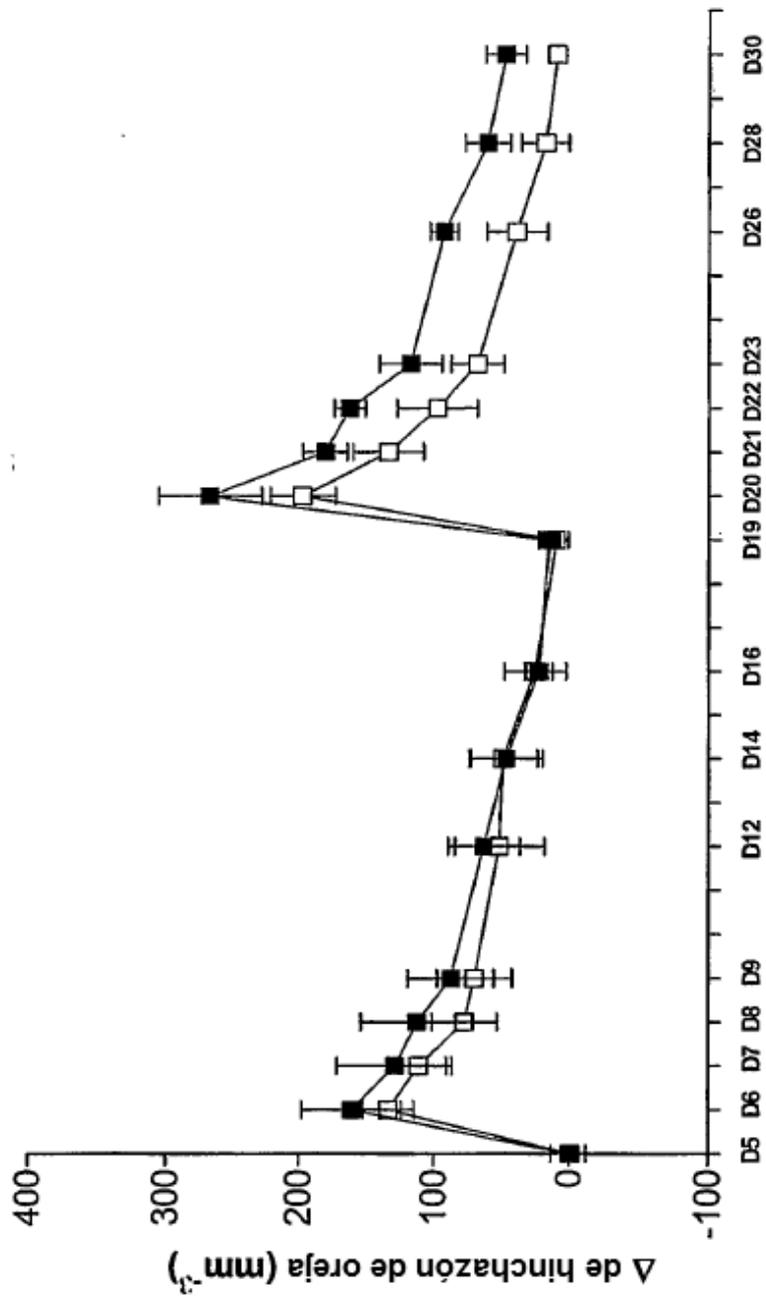


Fig. 1



Días después de exposición

Fig. 2

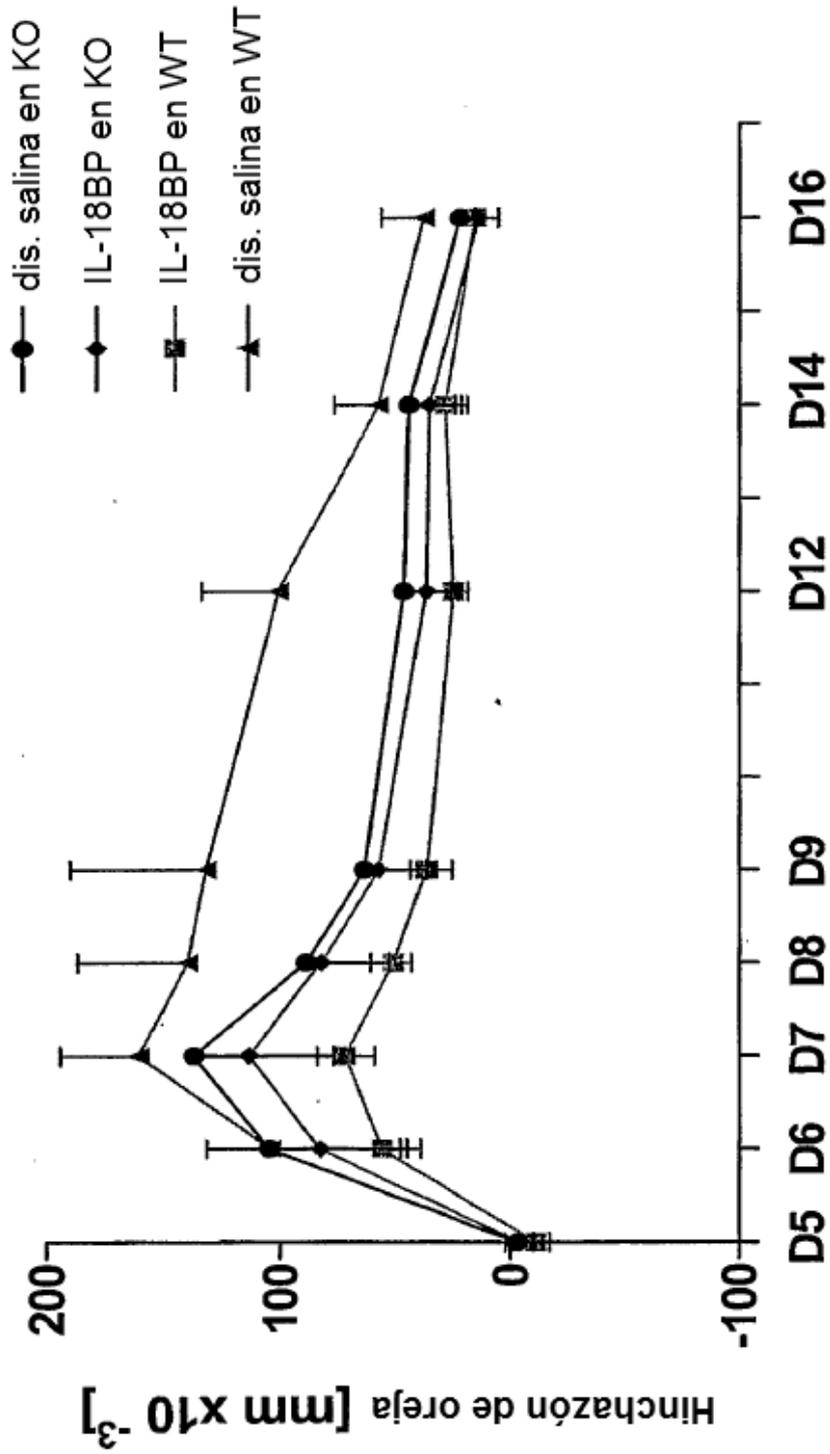


Fig. 3

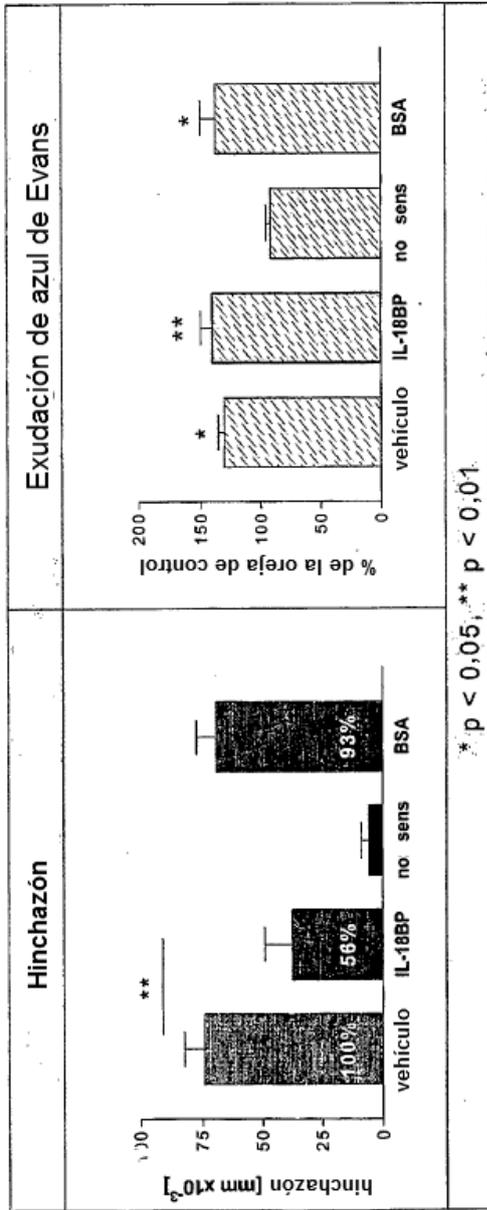


Fig. 4

Tipo celular	Marcador	Vehículo	IL-18BP	no sens.
Hematopoyético	CD45	4,45 100 %	3,96 88,9 %	2,73 61,3 %
$\alpha\beta$ T	CD4	0,07 100 %	0,05 71,4 %	0,02 28,6 %
$\alpha\beta$ T	CD8	0,24 100 %	0,17 70,8 %	0,02 8,3 %
NK	NK1.1	0,11 100 %	0,07 59,4 %	0 0 %
Neutrófilo	GR-1	0,54 100 %	0,36 66,7 %	0,02 3,7 %
Monocito / macrófago	CD11b hi / CD11c neg	0,53 100 %	0,42 79,2 %	0,03 5,7 %
verde: % de células totales		negro: proporción relativa		

Fig. 5

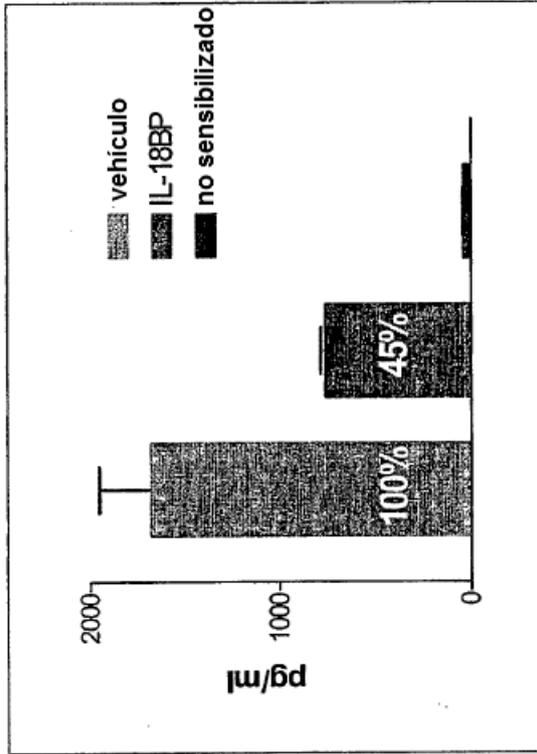


Fig. 6

IFN $\gamma$ +	Vehículo	IL-18BP	No sens.	relativo
todos	100 %	77,8 %	-	% del total
CD 4	0,18	0,14	n.d.	
CD 8	0,05	0,03	n.d.	
NK	0,13	0,11	n.d.	
$\gamma\delta$ T	n.d.	n.d.	n.d.	
	n.d.	n.d.	n.d.	

Estimulación con PMA/Ionomicina durante 4 h

Fig. 7

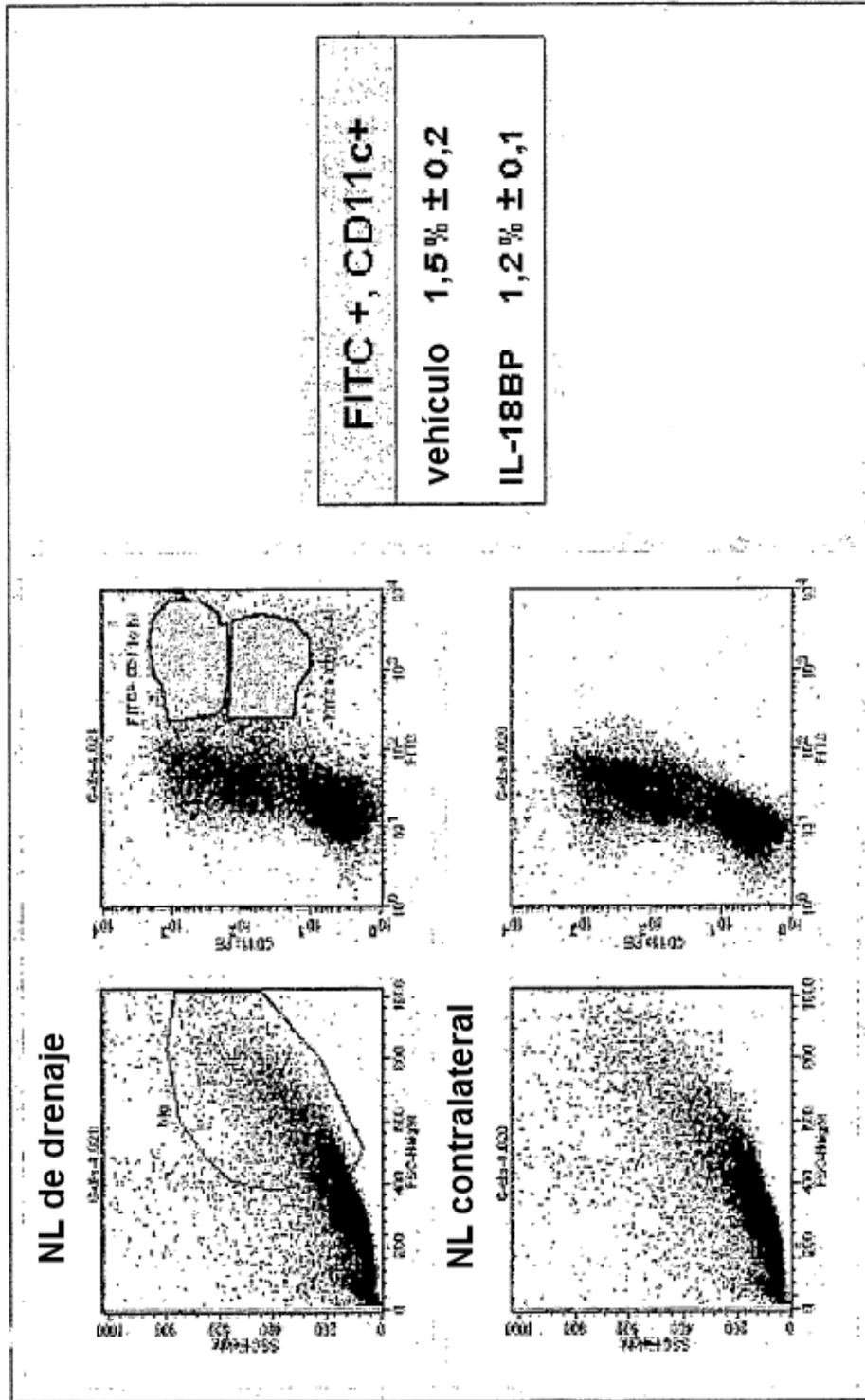


Fig. 8