

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 357**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.1997 E 08014990 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2002846**

54 Título: **Terapia de combinación usando un inhibidor de IL-1 para tratar enfermedades mediadas por IL-1**

30 Prioridad:

06.12.1996 US 32790 P

23.01.1997 US 36353 P

07.02.1997 US 39311 P

09.07.1997 US 52025 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2017

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
ONE AMGEN CENTER DRIVE
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**BENDELE, ALISON.M. y
SENNELLO, REGINA.M.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 615 357 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

Terapia de combinación usando un inhibidor de IL-1 para tratar enfermedades mediadas por IL-1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades mediadas por IL-1. Más específicamente, la presente invención se refiere a una terapia de combinación para el fin de prevenir o tratar enfermedades mediadas por IL-1.

10

Antecedentes de la invención

La inflamación es la reacción de defensa del cuerpo a los daños causados por ejemplo por una lesión mecánica, infección o estimulación antigénica. Una reacción inflamatoria puede expresarse patológicamente cuando la inflamación se induce por un estímulo inapropiado, como por ejemplo un autoantígeno, se expresa de manera exagerada o persiste bastante después de la retirada de los agentes culpables. Dicha reacción de inflamación pueden incluir la producción de determinadas citocinas.

15

A pesar de que la etiología de la inflamación se entiende poco, recientemente se ha adquirido una considerable información en lo que se refiere a los aspectos moleculares de la inflamación. Esta investigación ha llevado a la identificación de determinadas citocinas que, según se cree, participan prominentemente en la mediación de la inflamación. Las citocinas son proteínas extracelulares que modifican el comportamiento de las células, en particular las células que están en la zona inmediata de la síntesis y liberación de citocina. Una de las citocinas inflamatorias más potentes ya descubierta y una citocina que según se piensa es una mediadora clave en muchas enfermedades y estados patológicos médicos es la interleucina-1 (IL-1). IL-1, que es fabricada (aunque no exclusivamente) por las células del linaje macrófago/monocito, se puede producir en dos formas: IL-1 alfa (IL-1 α) e IL-1 beta (IL-1 β).

20

25

Una enfermedad o afección médicas se considera como una "enfermedad mediada por interleucina-1" cuando dicha enfermedad o afección médica, ya sea espontáneo o experimental, está asociado a niveles elevados de IL-1 en los fluidos o tejidos de organismo, o cuando las células o tejidos extraídos desde el organismo producen niveles elevados de IL-1 en cultivo. En muchos casos, se reconocen las enfermedades mediadas por interleucina-1 también porque se dan las siguientes dos condiciones adicionales: (1) los descubrimientos patológicos asociados a la enfermedad o la afección médica pueden imitarse experimentalmente en animales a través de la administración de IL-1; y (2) la patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o la afección médica puede inhibirse o eliminarse a través del tratamiento con agentes que inhiben la acción de IL-1. En la mayoría de las enfermedades mediadas por interleucina-1 coinciden al menos dos de las tres condiciones, y en muchas de las enfermedades mediadas por interleucina 1 se observan las tres condiciones.

30

35

Las enfermedades mediadas por IL-1 tales como artritis reumatoide y artritis psoriásica, son enfermedades de las articulaciones crónicas que afligen o imposibilitan, en diversos grados, a millones de personas en todo el mundo. La artritis reumatoide es una enfermedad de las uniones articulares donde se van erosionando lentamente el cartílago y el hueso a través de un tejido conectivo invasivo proliferativo denominado pannus, que deriva de la membrana sinovial. La enfermedad puede implicar estructuras peri-articulares como bursas, envolturas de tendón y tendones, así como tejidos extra-articulares tales como subcutis, sistema cardiovascular, pulmones, bazo, nódulos linfáticos, músculos esqueléticos, sistema nervioso (central y periférico) y ojos (Silberberg (1985), Anderson's Pathology, Kissane (ed.), II: 1828).

40

45

Se cree que la artritis reumatoide es el resultado de la presentación de un antígeno relevante a un hospedador susceptible inmunogenéticamente. Los antígenos que podrían iniciar potencialmente una respuesta inmune desembocando en artritis reumatoide podrían ser endógenos o exógenos. Entre los posibles antígenos endógenos se incluyen colágeno, mucopolisacáridos y factores reumatoides. Entre los antígenos exógenos se incluyen micoplasmas, micobacterias, espiroquetas y virus. Los productos secundarios de la reacción inmune inflaman la sinovia (es decir, las prostaglandinas y los restos de oxígeno) e impulsan cambios en las articulaciones destructivos (es decir, colagenasa).

50

55

Existe un amplio espectro de gravedad de la enfermedad, aunque muchos pacientes experimentan un ciclo de recaídas y remisiones intermitentes con un patrón general de lenta y progresiva destrucción y deformidad de las articulaciones. Entre las manifestaciones clínicas se pueden incluir poliartritis simétrica de las articulaciones periféricas, con dolor, irritabilidad, inflamación y pérdida de la función de las articulaciones afectadas; rigidez matutina; y pérdida de cartílago, erosión de la materia ósea y subluxación de las articulaciones tras una inflamación persistente. Entre las manifestaciones extra-articulares se incluyen nódulos reumatoides, vasculitis reumatoide, inflamaciones pleuro-pulmonares, escleritis, síndrome sicca, síndrome de Felty (esplenomegalia y neutropenia), osteoporosis y pérdida de peso (Katz (1985), Am. J. Med. 79: 24 y Krane and Simon (1986), Advances in Rheumatology, Synderman (ed.), 70(2): 263-284). Las manifestaciones clínicas tienen como resultado un alto grado de morbilidad que tiene como resultado una vida cotidiana molesta para el paciente.

60

65

Una teoría aceptada generalmente a la que se recurre para explicar la relación causal entre IL-1 y la artritis es que la IL-1 estimula varios tipos de células, como fibroblastos y condrocitos, para producir y secretar compuestos proinflamatorios o degradativos, como prostaglandina E₂ y metaloproteinasas. Se ha relacionado la participación de la interleucina-1 en la artritis a través de dos líneas de evidencia distintas.

En primer lugar, se ha observado un mayor nivel de interleucina-1 y del ARNm que lo codifica, en el tejido y el líquido sinovial de las articulaciones artríticas. Véase por ejemplo, Buchan y cols., "Thrid Annual General Meeting of the British Society for Rheumatology" Londres, Inglaterra, noviembre 19-21, 1988, J. Rheumatol., 25(2); Fontana y cols. (1982), Rheumatology Int.: 2: 49-53; y Duff y cols. (1988); Monokines and Other Non-Lymphocytic Cytokines, M. Powanda y cols., (eds), pp. 387-392 (Alan R. Liss, Inc.).

En segundo lugar, se ha demostrado en numerosas ocasiones que la administración de interleucina-1- al tejido de la articulación sano tiene como resultado la erosión del cartílago y el hueso. En un experimento, se demostró que las inyecciones intra-articulares de IL-1 a conejos causaban la destrucción del cartílago in vivo (Pettipher y cols., (1986), Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 83: 8749-8753). En otros estudios, se ha demostrado que IL-1 causa la degradación tanto del cartílago como del hueso en explantes de tejido (Saklatavala y cols., (1987), Development of Diseases of Cartilage and Bone Matrix, Sen and Thornhill (eds.), pp. 291-298 (Alan R. Liss, Inc.) and Stashenko y cols. (1987), The American Association of Immunologists, 183: 1464-1468). Por otra parte, se han obtenido unos resultados prometedores con unas recientes pruebas clínicas preliminares con seres humanos en artritis reumatoide con un inhibidor de IL-1 (Bresnihan, y cols., (1996), Arthritis and Rheumatism, 39(9): S73; And Watt y cols., (1996), Arthritis and Rheumatism, 39(9): S123).

El documento AU 649 245 desvela un método para tratar una enfermedad mediada por interleucina-1 que comprende administrar a un paciente en necesidad de la misma una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de interleucina 1. En una realización preferida se desvela una combinación de IL-1ra e indometacina.

Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar métodos y composiciones terapéuticas para el tratamiento de afecciones inflamatorias de una articulación. Tanto éste como otros objetos de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción en lo sucesivo en el presente documento.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una terapia de combinación para prevenir y tratar las enfermedades mediadas por IL-1 en un paciente. La presente invención se refiere específicamente a

1. Uso de cantidades terapéuticamente eficaces de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 y un fármaco antiinflamatorio adicional para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-IL-1 y al menos un compuesto antiinflamatorio adicional se preparan por separado o en administración combinada, donde el compuesto anti-inflamatorio es metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino]benzoil]-L-glutámico).

2. El uso de 1, donde dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria de una articulación, preferentemente, dicha enfermedad inflamatoria de una articulación es artritis reumatoide.

3. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 y al menos un compuesto antiinflamatorio adicional, donde el al menos un compuesto antiinflamatorio adicional es metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino]benzoil]-L-glutámico).

4. La composición farmacéutica de 3, donde dicho metotrexato está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 25 mg.

5. Uso de un compuesto antiinflamatorio, distinto de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1, en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad crónica o aguda en un mamífero en combinación con la administración de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1, donde el compuesto antiinflamatorio es metotrexato.

6. El uso de 5 donde la cantidad de metotrexato en el medicamento es hasta aproximadamente 25 mg.

7. Uso de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1, en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria crónica o aguda en un mamífero en combinación con la administración de un compuesto antiinflamatorio adicional, donde el compuesto antiinflamatorio es metotrexato.

8. El uso de acuerdo con 6 o 7, donde el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 en el medicamento está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 200 mg.

9. El uso de acuerdo con uno cualquiera de 5 a 8, donde dicho metotrexato se prepara para la administración oral.

Breve descripción de las Figuras

Numerosos aspectos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto al repasar las Figuras, donde:

- 5 La Figura 1 representa una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO:1) que codifica Arg¹-Glu¹⁵³, IL-1ra humana recombinante madura (rhull-1ra). También se representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) de rhull-1ra, siendo el aminoácido inicial M_n donde n se iguala a 0 o 1.
- La Figura 2 representa los efectos de rhull-1ra solo, metotrexato solo y la combinación de rhull-1ra y metotrexato en el diámetro de la articulación en ratas artríticas adyuvantes en el Ejemplo 1.
- 10 La Figura 3 representa los efectos de rhull-1ra solo, metotrexato solo y la combinación de rhull-1ra y metotrexato en los pesos finales de la pata (índice de artritis), la esplenomegalia (índice de inflamación sistémica) y el cambio de peso corporal en ratas artríticas adyuvantes en el Ejemplo 1.
- La Figura 4 representa el análisis final (inhibición en la terminación) de los efectos de rhull-1ra solo, metotrexato solo o de la combinación con rhull-1ra y metotrexato en el diámetro de la articulación en las ratas artríticas adyuvantes del Ejemplo 2.
- 15 La Figura 5 representa los efectos de rhull-1ra solo, metotrexato solo y la combinación de rhull-1ra y metotrexato en los pesos finales de la pata (índice de artritis), la esplenomegalia (índice de inflamación sistémica) y el cambio de peso corporal en ratas artríticas adyuvantes en el Ejemplo 2.
- La Figura 6 representa los efectos en la gravedad clínica de rhull-1ra o r-metIFN-con₁ en un modelo de EAE en el Ejemplo 4.
- 20 La Figura 7 representa los efectos en la gravedad clínica de la terapia de combinación de rhull-1ra y r-metIFN-con₁ en un modelo de EAE en el Ejemplo 4.
- La Figura 8 representa los efectos en la ganancia de peso de la terapia de combinación de rhull-1ra y r-metIFN-con₁ en un modelo de EAE en el Ejemplo 4.

25

Descripción detallada de la invención

En las presentes realizaciones, el animal sujeto preferible es el ser humano.

- 30 Los inhibidores de interleucina pueden ser de cualquier proteína capaz de prevenir específicamente la activación de receptores celulares para IL-1. Las clases de inhibidores de interleucina 1 incluyen: antagonistas del receptor de interleucina 1 tales como IL-1ra, como se describe a continuación; anticuerpos monoclonales del receptor anti-IL-1 (por ejemplo, documento EP 623674); proteínas de unión a IL-1 tales como receptores de IL-1 solubles (por ejemplo, los documentos U.S.P. 5.492.888; U.S.P. 5.488.032, y U.S.P. 5.464.937; U.S.P. 5.319.071; y U.S.P. 5.180.812; anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (por ejemplo los documentos WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, U.S.P. 4.935.343, EP 364.778; EP 276.611 y EP 220.063); proteínas accesorias del receptor de IL-1 (por ejemplo, el documento WO 96/23067)) y otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular de IL-1.
- 40 El antagonista del receptor de interleucina-1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como inhibidor natural de la interleucina-1 y que es un miembro de la familia IL-1 que incluye IL-1a e IL-1β. Los antagonistas del receptor preferidos, así como los métodos para su fabricación y uso de los mismos, se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.075.222; el documento WO 91/08285; el documento WO 91/17184; el documento AU 9173636; el documento WO 92/16221; el documento WO 93/21946; el documento WO 94/06457; el documento WO 94/21275; el documento FR 2706772; el documento WO 94/21235; el documento DE 4219626; el documento WO 94/20517; el documento WO 96/22973 y el documento WO 97/28828. Las proteínas incluyen antagonistas del receptor IL-1 tanto glucosilados como no glucosilados.

45

- Específicamente, tres formas útiles de IL-1ra y variantes de las mismas se desvelan y se describen en la patente 50 5.075.222. La primera de ellas, IL-1raα, se caracteriza como una molécula de 22-23 kD en SDS-PAGE con un punto isoelectrico aproximado de 4,8, por elución desde una columna Mono Q FPLC a aproximadamente 52 mM de NaCl en tampón tris, pH 7,6. La segunda, IL-1raβ, se caracteriza como una proteína de 22-23 kD, por elución desde una columna Q a 48 mM de NaCl. Tanto IL-1raα como IL-1raβ están glucosiladas. La tercera, IL-1rax se caracteriza como una proteína de 20 kD, por elución desde una columna Mono Q a 48 mM de NaCl y no está glucosilada. La 55 patente 5.075.222 describe también métodos para el aislamiento de genes responsables de la codificación de los inhibidores, la clonación del gen en vectores y tipos de células adecuados y la expresión del gen para producir los inhibidores.

50

- IL-1ra y las formas modificadas de IL-1ra donde los aminoácidos de IL-1ra han sido (1) suprimidos ("variantes de 60 deleción"), (2) insertados ("variantes de adición") o (3) sustituidos ("variantes de sustitución") se denominan de forma colectiva "proteína o proteínas IL-1ra". [A no ser que se indique de otro modo, la numeración de aminoácidos para las moléculas que se describen en el presente documento deberá corresponder a la presentada para la forma madura de la molécula (es decir menos la secuencia de señal), tal como se describe con los aminoácidos Arg¹-Glu¹⁵² de la SEQ ID NO:2, siendo MET inicial en cada una de dichas secuencias el resto número "0"].

65

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que pueden realizarse muchas combinaciones de deleciones,

inserciones y sustituciones (individualmente o colectivamente “variante o variantes”) dentro de las secuencias de aminoácido de IL-1ra, con la condición de que la molécula resultante sea biológicamente activa (por ejemplo, que posea la capacidad de inhibir IL-1).

- 5 Una variante o variantes de IL-ra puede detectarse rápidamente para evaluar sus propiedades físicas. Se apreciará que tales variante o variantes demostrarán propiedades de inhibición de IL-1 similares, pero no necesariamente todas las mismas propiedades y no necesariamente en el mismo grado que IL-1ra.

10 Existen dos variables principales en la construcción de la variante o variantes de secuencia de aminoácido: la localización del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación. Al designar una variante o variantes, la localización de cada sitio de mutación y la naturaleza de cada mutación dependerán de la característica o características bioquímicas a modificarse. Cada sitio de mutación puede modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, (1) suprimiendo el resto de aminoácido diana, (2) insertando uno o más restos de aminoácido adyacentes al sitio localizado o (3) sustituyendo primero con elecciones de aminoácidos conservativos y, dependiendo de los resultados conseguidos, después con seleccionas más restos.

15 Las deleciones de la secuencia de aminoácido oscilan generalmente de aproximadamente 1 a 30 restos de aminoácido, preferentemente de aproximadamente 1 a 20 restos de aminoácido, más preferentemente de aproximadamente 1 a 10 restos de aminoácido, lo más preferentemente de aproximadamente 1 a 5 restos contiguos. Se contemplan las deleciones dentro de la secuencia amino terminal, carboxi-terminales e internas. Se pueden realizar supresiones dentro de la secuencia de aminoácido IL-1ra, por ejemplo, en regiones de baja homología con las secuencias de otros miembros de la familia IL-1. Las supresiones dentro de la secuencia de aminoácido IL-1ra en áreas de homología sustancial con las secuencias de otros miembros de la familia IL-1 tendrán más probabilidades de modificar significativamente la actividad biológica.

25 Una adición de secuencia de aminoácido puede incluir inserciones de fusión amino- y/o carboxi-terminal comprendidas en longitud de un resto y cien o más restos, así como inserciones dentro de la secuencia internas de un solo resto o varios restos de aminoácido. Las adiciones internas pueden oscilar generalmente entre aproximadamente 1 y 20 restos de aminoácido, preferentemente entre aproximadamente 1 y 10 restos de aminoácido, más preferentemente entre aproximadamente 1 y 5 restos de aminoácido, siendo sobre todo preferible entre aproximadamente 1 y 3 restos de aminoácido. Las adiciones dentro de la secuencia de aminoácido de IL-1ra se pueden realizar en regiones de baja homología con las secuencias de otros miembros de la familia IL-1. Las adiciones dentro de la secuencia de aminoácido de IL-1ra en áreas de homología sustancial con las secuencias de otros miembros de la familia IL-1 tendrán mayor probabilidad de modificar significativamente la actividad biológica. Las adiciones incluyen preferentemente secuencias de aminoácido derivadas de las secuencias de los miembros de la familia IL-1.

30 Se contempla que la adición del termino amino incluya la adición de una metionina (por ejemplo, como elemento de la expresión directa en un cultivo de células recombinantes bacterianas). Otro ejemplo más de una adición amino-terminal incluye la fusión de una secuencia de señales con el término amino de IL-1ra con el fin de facilitar la secreción de proteínas desde células hospedadoras recombinantes. Dichas secuencias de señal se obtendrán generalmente a partir especies de células hospedadoras buscadas y por lo tanto serán homólogas a ellas. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen la secuencia de señal nativa de IL-1ra, se puede sustituir la secuencia de señal por una secuencia de señal procariota, como por ejemplo, a partir del grupo de secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinasas o enterotoxina II termoestable. Para la expresión en células de levadura, cada polipéptido puede tener una secuencia de señal seleccionada por ejemplo del grupo de secuencias líder de invertasa de levadura, factor alfa o fosfatasa ácida. En la expresión de células de mamífero, la secuencia de señal nativa de IL-1ra (documento U.S. 5.075.222) es satisfactoria, si bien pueden ser adecuadas otras secuencias de señal de mamífero, como por ejemplo secuencias derivadas de otros miembros de la familia IL-1.

40 Un ejemplo de la adición en el término amino- o carboxi incluye proteínas quiméricas que comprenden la fusión amino-terminal o carboxi-terminal de una proteína o proteínas IL-1ra con parte o todo el dominio constante de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina humana (individualmente o colectivamente, (“IL-1ra Fac”). Son preferibles dichos polipéptidos quiméricos, comprendiendo la porción de inmunoglobulina de cada uno todos los dominios excepto el primer dominio de la región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina humana, como IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG3), IgA, IgM o IgE. Las personas especializadas en este campo podrán apreciar que se puede suprimir o sustituir cualquier aminoácido de la porción inmunoglobulina con uno o más aminoácidos, se pueden añadir uno o más aminoácidos, siempre y cuando la porción de la proteína o proteínas IL-1ra siga inhibiendo la IL-1 y la porción inmunoglobulina presente una o más de sus propiedades características.

50 Otro grupo de variante o variantes es el de la variante o variantes de sustitución de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de IL-1ra. Se trata de variantes donde se elimina al menos un resto de aminoácido en IL-1ra y se inserta un resto diferente en su lugar. Entre las variantes de sustitución se incluyen variantes alélicas, que se caracterizan por cambios en la secuencia de nucleótidos naturales en la población de especie que pueden tener o no como resultado un cambio de aminoácido. Un experto en la materia puede usar cualquier información conocida sobre la unión o sitio activo del polipéptido para la selección de los posibles sitios de mutación. En los documentos

WO 91/17184, WO 92/16221 y WO 96/09323 se instruye sobre ejemplos de variante o variantes de sustitución.

Uno de los métodos para identificar restos o regiones de aminoácido para mutagénesis de una proteína se denomina "mutagénesis de exploración de alanina", como describe Cunningham y Wells (1989), Science, 244: 1081-1085. En este método, se identifica un resto de aminoácido o un grupo de restos diana de una proteína (por ejemplo, restos cargados como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o de carga negativa (siendo sobre todo preferible alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso circundante dentro o fuera de la célula. A continuación, se refinan los dominios/restos que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones por introducción de restos adicionales o alternativos en los sitios de sustitución. Según esto, se determina previamente el sitio para introducir una modificación de la secuencia de aminoácido. Para optimizar el comportamiento de una mutación en un sitio determinado, se puede llevar a cabo la exploración de alanina o la mutagénesis aleatoria y se puede realizar la detección selectiva de la variable o varia para obtener la combinación óptima según la actividad y el grado de actividad deseados. Se ha trazado el mapa de los sitios de unión del receptor en IL-1ra por mutagénesis dirigida a sitio extensiva (Evans y cols., (1994), The Journal of Biological Chemistry, 270(19):11477-11483.

Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen sitios donde ciertos aminoácidos en particular, que se encuentran dentro de IL-1ra, son sustancialmente diferentes de otras diversas especies u otros miembros de la familia IL-1 en lo que se refiere al volumen de cadenas laterales, la carga y/o la hidrofobicidad. Otros sitios de interés incluyen aquellos donde ciertos restos en particular de IL-1ra son idénticos entre otras especies u otros miembros de la familia IL-1, dado que dichas posiciones son importantes generalmente para la actividad biológica de una proteína. Las personas especializadas en este campo podrán apreciar que inicialmente, estos sitios deberán modificarse por sustitución de una manera relativamente conservativa.

Tales sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1, bajo el encabezamiento "Sustituciones preferibles". Cuando dichas sustituciones tienen como resultado un cambio en la actividad biológica, más cambios sustanciales cambios se pueden introducir (ejemplos de sustituciones) y/o se pueden realizar otras adiciones/supresiones y realizar la detección selectiva de los polipéptidos resultantes.

30

TABLA 1: Sustituciones de aminoácido

| Resto original | Sustituciones preferidas | Sustituciones ejemplares |
|----------------|--------------------------|---|
| Ala (A) | Val | Val; Leu; Ile |
| Arg (R) | Lys | Lys; Gln; Asn |
| Asn (N) | Gln | Gln; His; Lys; Arg |
| Asp (D) | Glu | Glu |
| Cys (C) | Ser | Ser |
| Gln (Q) | Asn | Asn |
| Glu (E) | Asp | Asp |
| Gly (G) | Pro | Pro |
| His (H) | Arg | Asn; Gln; Lys; Arg |
| Ile (I) | Leu | Leu; Val; Met; Ala; Phe; norleucina |
| Leu (L) | Ile | norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe |
| Lys (K) | Arg | Arg; Gln; Asn |
| Met (M) | Leu | Leu; Phe; Ile |
| Phe (F) | Leu | Leu; Val; Ile; Ala |
| Pro (P) | Gly | Gly |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr | Tyr |

| Resto original | Sustituciones preferidas | Sustituciones ejemplares |
|----------------|--------------------------|---|
| Tyr (Y) | Phe | Trp; Phe; Thr; Ser |
| Val (V) | Leu | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; norleucina |

Al realizar dichos cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos a la hora de conferir una función biológica interactiva a la proteína se entiende generalmente dentro de la especialidad (Kyte y Doolittle (1982), J. Mol. Biol., 157:105-131). Se sabe que determinados aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y siguen reteniendo una actividad biológica similar.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en función de la hidrofobicidad, en particular, cuando se pretende utilizar la proteína o péptido de funcionalidad equivalente creada de este modo en modos de realización inmunológicos, como es el presente caso. En la patente de EE.UU. 4.554.101, se señala que la mayor hidrofobicidad media local de una proteína, según se rige por la hidrofobicidad de sus aminoácidos adyacentes se corresponde con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir con una propiedad biológica de la proteína.

La patente EE.UU. 4.554.101 también enseña sobre la identificación y preparación de epítomos a partir de secuencias de aminoácido primarias en función de la hidrofobicidad. A través de los métodos descritos en la patente EE.UU. 4.554.101, un experto en la materia podrá identificar epítomos, como por ejemplo, dentro de la secuencia de aminoácido de IL-1ra. Dichas regiones se denominan también "regiones de núcleo epitópico". Se han dedicado numerosas publicaciones científicas a la predicción de una estructura secundaria y a la identificación de epítomos, a partir de análisis de secuencias de aminoácido (Chou y Fasman (1974), Biochemistry, 13(2): 222-245; Chou y Fasman (1978), Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148; Chou y Fasman (1974), Biochemistry, 13(2): 211-222, Chou y Fasman (1978, Ann Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou y Fasman (1979), Biophys. J., 26:367-384. Por otra parte, actualmente se dispone de programas informáticos para ayudar a predecir las porciones antigénicas y las regiones de núcleo epitópico de proteínas. Entre los ejemplos se incluyen los programas basados en el análisis de Jameson-Wolf (Jameson y Wolf (1988), Comput. Appl. Biosci., 4(1):181-186 y Wolf y cols., (1988), Comput. Appl. Biosci., 4(1):187-191, el programa PepPlot® (Brutlag y cols. (1990), CABS, 6:237-245 y Weinberger y cols. (1985), Science, 228: 740-742, y otros programas para predicción de estructura terciaria de proteína (Fetrow and Bryant (1993), BIOTECHNOLOGY, 11: 479-483).

En contraste, pueden realizarse sustanciales modificaciones en las características funcionales y/o químicas de IL-1ra seleccionando las sustituciones que difieren significativamente en su efecto en mantener (a) la estructura de la cadena principal de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga relativa o hidrofobicidad de la proteína en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos en función de las propiedades de la cadena lateral comunes:

- 1) hidrófobo: norleucina, Met, Ala, Val, Leu; Ile;
- 2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr;
- 3) ácido: Asp; Glu
- 4) básico: Asn, Gln; His, Lys, Arg;
- 5) aromático: Trp, Tyr, Phe; y
- 6) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro.

Las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de uno de estos grupos por otro. Tales restos sustituidos pueden introducirse en regiones de IL-1ra que son por ejemplo homólogas a las de otros miembros de la familia IL-1 o en regiones no homólogas de la proteína.

Puede realizarse una diversidad de sustituciones o supresiones de aminoácido para modificar o añadir sitios de glucosilación unidos en N- o unidos en O-, con el resultado de una proteína con la glucosilación alterada. Puede modificarse la secuencia para añadir sitios de glucosilación o suprimir sitios de glucosilación unidos en N- o unidos en O- desde IL-1ra. Un sitio de reconocimiento de glucosilación unido a asparagina comprende una secuencia de tripéptido que es reconocida específicamente por enzimas de glucosilación celulares apropiadas. Dichas secuencias de tripeptido son o bien Asn-Xaa-Thr o bien Asn-Xaa-Ser, pudiendo ser Xaa cualquier aminoácido distinto a Pro.

Las mutaciones específicas de la secuencia de IL-1ra pueden implicar sustitución de un aminoácido no nativo en el término amino, el término carboxi o cualquier otro sitio de la proteína que está modificado por la adición de un carbohidrato unido en N- o unido en O-. Dichas modificaciones pueden resultar de particular utilidad en la adición de un aminoácido (por ejemplo, cisteína), lo que es ventajoso para la unión de un polímero hidrosoluble para formar un derivado. Por ejemplo, el documento WO 92/16221 describe la preparación de IL-1ra muteínas, por ejemplo, donde

se cambian los restos nativos por cisteína.

Un polipéptido variante preferentemente será sustancialmente homólogo al aminoácido de IL-1ra (SEQ ID NO:2). La frase "sustancialmente homólogo" como se utiliza en el presente documento se refiere a un grado de homología que
 5 excede un 80 %, preferentemente que excede un 90 %, más preferentemente que excede un 95 %, lo más preferentemente incluso un 99 %. El porcentaje de homología como se describe en el presente documento se calcula como el porcentaje de restos aminoácido que se encuentran en la más pequeña de las dos secuencias que se alinean con restos de aminoácido idénticos en la secuencia que se está comparando cuando se pueden introducir dos espacios en una longitud de 100 aminoácidos para ayudar a dicho alineamiento, tal como describe Dayhoff en
 10 Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:124 (1972), National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C. También se incluyen dentro del término "sustancialmente homólogo" variante(s) de IL-1ra que se pueden aislar en virtud de la reactividad cruzada con anticuerpos para la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 o cuyos genes se pueden aislar a través de hibridación con el ADN de la SEQ ID NO:1 o con segmentos de la misma.

15 Derivados de polipéptido

Se describen los derivados químicamente modificados de la proteína o proteínas IL-1ra donde la proteína está unida a un polímero con el fin de modificar las propiedades de la proteína (denominados en el presente documento "derivados"). Dichos derivados pueden ser preparados por las personas especializadas en este campo en función de
 20 la descripción aquí expuesta. Se pueden preparar conjugados utilizando proteína o proteínas IL-1ra glucosiladas, no glucosiladas o desglucosiladas y fracciones químicas adecuadas. Típicamente, se utilizarán proteínas no glucosiladas y polímeros hidrosolubles.

Los polímeros hidrosolubles son deseables ya que la proteína a la que se une cada uno de ellos no precipitará en un
 25 entorno acuoso, como es el entorno fisiológico. Preferentemente, el polímero será farmacéuticamente aceptable para la preparación de un producto o composición terapéutico. Las personas especializadas en este campo podrán seleccionar el polímero deseado en función de consideraciones de si el conjugado polímero /proteína se utilizará terapéuticamente y, si es así, el perfil terapéutico de la proteína (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida; la resistencia a la proteólisis; los efectos, si los hay en la dosis; la actividad biológica; la facilidad de manejo; el grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos de un polímero hidrosoluble en una proteína terapéutica).

Los polímeros hidrosolubles clínicamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), propionaldehído de polietilenglicol, copolímeros de etilen glicol/propilen glicol, monometoxi-polietilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, polialcohol vinílico (PVA), polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli(β -aminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropileno glicol (PPG) y otros óxidos de polialquilenos, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polialcoholes polioxiethylados (POG) (por ejemplo, glicerol) y otros polialcoholes polioxiethylados, sorbitol polioxiethylado, o glucosa polioxiethylada, ácidos colónicos u otros polímeros de hidrato de carbono, Ficoll o dextrano y mezclas de ellos. Como se usa en el presente documento, se pretende
 40 que polietilenglicol abarque cualquier forma que se haya utilizado para derivar otras proteínas, como mono-(C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol. El propionaldehído de polietilenglicol puede presentar ventajas en la fabricación gracias a su estabilidad en agua.

Los polímeros hidrosolubles pueden ser cada uno de cualquier peso molecular y pueden estar ramificados o sin
 45 ramificar. Generalmente, cuanto mayor es el peso molecular o cuantas más ramificaciones tiene, mayor es la relación polímero:proteína. Los polímeros hidrosolubles tienen típicamente un peso molecular medio comprendido entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término "aproximadamente" que, en las preparaciones de un polímero hidrosoluble, algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular señalado). El peso molecular medio de cada uno de los polímeros hidrosolubles está comprendido preferentemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 40 kDa, más preferentemente entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 35 kDa siendo sobre todo preferible entre aproximadamente 15 kDa y aproximadamente 30 kDa.

Existe una serie de métodos de fijación disponibles para los expertos en la materia, incluyendo reacciones de acilación o reacciones de alquilación (preferentemente para generar una proteína químicamente modificada amino-terminal) con una molécula hidrosoluble reactiva. Véase por ejemplo, el documento EP 0.401.384; Malik y cols. (1992), Exp. Hematol., 20: 1028-1035; Francis (1992), Focus on Growth Factors, 3(2): 4-10, publicado por Mediscript, Mountain Court, Friern Barnet Lane, London N20 OLD, RU; el documento EP 0.154.316; el documento EP 0.401.384; el documento WO 92/16221; el documento WO 95/34326; el documento WO 95/13312; el documento WO 96/11953; el documento WO 96/19459 y el documento WO 96/19459; y las otras publicaciones citadas en el
 60 presente documento que se refieren a la pegilación.

Una variante específica es una molécula de aldehído de monometoxi-polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de bien aproximadamente 20 kDa o bien aproximadamente 33 kDa (por ejemplo, entre 30 kDa y 35 kDa), o un aldehído de terc-butil polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 33 kDa (por ejemplo
 65 entre 30 kDa y 35 kDa) conjugado a través de la alquilación reductora con la proteína o proteínas IL-1ra.

La pegilación también puede llevarse a cabo específicamente utilizando polímeros hidrosolubles que tienen al menos un grupo hidroxilo reactivo (por ejemplo, polietilenglicol). Puede hacerse reaccionar el polímero hidrosoluble con un grupo activador, formando así un "ligando activado" útil en la modificación de diversas proteínas. Los ligandos activados pueden ser monofuncionales, bifuncionales o multifuncionales.

5 Entre los grupos activadores que pueden utilizarse para unir el polímero hidrosoluble con dos o más proteínas se incluyen los siguientes: sulfona, maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano y 5-piridilo. Entre los reactivos útiles que tienen un grupo sulfona reactivo que pueden utilizarse en los métodos se incluyen, sin limitación, clorosulfona, vinilsulfona y divinilsulfona. Estos derivados PEG son estables frente a la hidrólisis durante extensos
10 períodos de tiempo en entornos acuosos, a pH de aproximadamente 11 o menos, y pueden formar uniones con moléculas para formar conjugados que también son hidrolíticamente estables. Dos derivados homobifuncionales particularmente útiles son PEG-bis-clorosulfona y PEG-bis-vinilsulfona (documento WO 95/13312).

15 Formas polivalentes

Pueden construirse formas polivalentes, es decir, moléculas que comprenden más de un resto activo. En una realización, la molécula puede poseer múltiples sitios antagonistas de receptor de interleucina-1.

20 Adicionalmente, la molécula puede poseer al menos un sitio antagonista de receptor de interleucina-1 y, dependiendo de las características deseadas de la forma polivalente, al menos un sitio de otra molécula (por ejemplo, una proteína o proteínas IL-1ra, y un producto TNF β , como se describe a continuación).

25 La forma polivalente puede construirse, por ejemplo, por acoplamiento químico en al menos una proteína o proteínas IL-1ra y otra fracción con cualquier ligando clínicamente aceptado (por ejemplo, un polímero hidrosoluble). En principio, el ligando no debe impartir una nueva inmunogenicidad ni tampoco, en virtud de los nuevos restos de aminoácido, alterar la hidrofobicidad ni cargar el resto de la estructura que afecte a su distribución y eliminación.

30 Los polímeros hidrosolubles pueden ser, en función de los monómeros enumerados en el presente documento, homopolímeros, copolímeros aleatorios o de bloque, terc-polímeros de cadena lineal o ramificada, sustituidos o sin sustituir. El polímero puede ser de cualquier longitud o peso molecular, si bien estas características pueden afectar a las propiedades biológicas. Los pesos moleculares medios de polímero particularmente útiles para disminuir los índices de eliminación en aplicaciones farmacéuticas se encuentran en el intervalo de 2.000 a 35.000 daltons. Por otra parte, la longitud del polímero puede variar para optimizar o conferir la actividad biológica deseada.

35 Los restos activos pueden unirse utilizando técnicas de acoplamiento convencionales (véanse los documentos WO 92/16221, WO 95/13312 y WO 95/34326). Por ejemplo, en los documentos WO 92/16221 y WO 95/34326 se describe la preparación de diversas moléculas IL-1ra dimerizadas.

40 Alternativamente, una molécula bivalente puede consistir en dos repeticiones en tándem de proteína o proteínas IL-1ra separadas por una región de ligando de polipéptido. El diseño de los ligandos de polipéptido es similar al diseño a la inserción de secuencias de bucle cortas entre dominios en el diseño *de novo* de proteínas (Mutter (1988), TIBS, 13: 260-265 y Regan and Degrad (1988), Science, 241: 976-978. Se han ensamblado varios constructos de ligando diferentes y se ha demostrado que son útiles para formar anticuerpos de cadena simple; los ligandos más funcionales varían en tamaño entre 12 y 25 aminoácidos (aminoácidos que tienen grupos laterales no reactivos, por
45 ejemplo, alanina, serina y glicina) que constituyen juntos una secuencia hidrófila, tienen restos de carga opuesta para potenciar la solubilidad y son flexibles (Whitlow y Filpula (1991), Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2: 97-105; y Brigido y cols., (1993), J. Immunol. , 150: 469-479).

50 Adicionalmente, la proteína o proteínas IL-1ra pueden acoplarse químicamente a biotina y, a continuación, puede dejarse unir el conjugado resultante a avidina, con el resultado de una molécula de proteína o proteínas avidina/biotina/IL-1ra tetravalente. La proteína o proteínas IL-1ra pueden acoplarse covalentemente a dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y hacerse precipitar el conjugado resultante con anti-DNP o anti-TNP-IgM para formar conjugados decaméricos.

55 También pueden producirse las proteínas de fusión recombinantes donde cada molécula química recombinante tiene una secuencia de proteína o proteínas IL-1ra fusionada amino-terminalmente o carboxi-terminalmente con todos o parte de los dominios constantes, pero a al menos un dominio constante, de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, se puede producir una proteína de fusión química de proteína o proteínas IL-1ra/IgG1 (o proteína o proteínas IgG1/IL-1ra) a partir de un gen químero con contenido en cadena ligera: una quimera de proteína o proteínas IL-1ra/kappa humana de cadena ligera (proteína o proteínas IL-1ra/Ck) o quimera de cadena ligera de kappa humana /proteína o proteínas IL-1ra (Ck/proteína o proteínas IL-1ra); o gen químero con contenido en cadena pesada: una quimera de proteína o proteínas IL-1ra/cadena pesada de gamma-1 humana (proteína o proteínas IL-1ra /Cg-1) o quimera de gamma-1 humana de cadena pesada /proteína IL-1ra (Cg-1/proteína o proteínas IL-1ra). Tras la transcripción y traducción de un gen químero de cadena pesada, o de un gen con contenido en cadena ligera y un gen químero de cadena pesada, se pueden ensamblar los productos genéticos en una sola molécula química que tiene una proteína o proteínas IL-1ra desplegada bivalentemente.
65

Otros detalles que se refieren a la construcción de dichas moléculas quiméricas se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.116.964; el documento WO 89/09622, el documento WO 91/16437 y el documento EP 315062.

También pueden producirse proteínas de fusión recombinantes teniendo cada molécula quimérica recombinante al menos una proteína o proteínas IL-1ra, tal como se ha descrito en el presente documento, y al menos una porción de la región 186-401 de osteoprotogerina, tal como se describe en la solicitud de patente europea N.º 96309363.8. Bien la proteína o proteínas IL-1ra o bien la porción de osteoprotogerina pueden estar en el término amino o en el término carboxi de la molécula quimérica.

10 Síntesis de proteína o proteínas IL-1ra

A continuación se describe con mayor detalle la producción de la proteína o proteínas IL-1ra. Tales proteínas pueden prepararse, por ejemplo, a través de técnicas recombinantes o a través de una proteína de síntesis química *in vitro*.

15 Polinucleótidos

Basándose en la presente descripción y utilizando la tabla de codones universales, un experto en la materia podrá determinar fácilmente todas las secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácido de la proteína o proteínas IL-1ra.

Pueden seguirse las técnicas de expresión recombinantes llevadas a cabo de acuerdo con las descripciones que se exponen a continuación para producir cada uno de tales polinucleótidos y para expresar la proteína codificada. Por ejemplo, insertando una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o proteínas IL-1ra en un vector apropiado, un experto en la materia podrá producir fácilmente grandes cantidades de la secuencia de nucleótido deseada. Las secuencias se pueden utilizar después para generar sondas de detección o cebadores de amplificación. Alternativamente, puede insertarse un polinucleótido que codifica una proteína o proteínas IL-1ra en un vector de expresión. Al introducir el vector de expresión en un hospedador apropiado, se puede producir la proteína deseada en grandes cantidades.

Como se describe además en el presente documento, hay disponibles numerosos sistemas hospedador/vector para la propagación de las secuencias de ácido nucleico deseadas y/o la producción de las proteínas deseadas. Entre ellos se incluyen, pero no se limitan a, plásmido, vectores víricos e insercionales y hospedadores procariotas y eucariotas. Un experto en la materia podrá adaptar un sistema hospedador/vector con el que se pueda propagar o expresar ADN heterólogo para producir o expresar las secuencias de la presente invención.

Adicionalmente, se apreciará por aquellos expertos en la materia que, a la vista de la presente descripción, las secuencias de ácido nucleico dentro del alcance de la presente invención incluyen la secuencia de ácido nucleico de la Figura 1, así como las secuencias de ácido nucleico degeneradas de la misma, secuencias de ácido nucleico que codifican variante o variantes de IL-1ra y secuencias de ácido nucleico que se hibridan (en las condiciones de hibridación que se describen más adelante en la sección de exploración de biblioteca de ADNc, o condiciones equivalentes o condiciones más rigurosas) con complementos de la secuencia de ácido nucleico de la Figura 1.

También se proporciona por la presente invención construcciones de ADN recombinante que implican un vector de ADN junto con las secuencias de ADN que codifican las proteínas deseadas. En cada construcción de ADN tal, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína deseada (con o sin péptidos señal) está en asociación funcional con una secuencia de control de expresión o reguladora capaz de dirigir la replicación y/o la expresión de la proteína deseada en un hospedador seleccionado.

50 Expresión recombinante

Preparación de polinucleótidos

Puede obtenerse fácilmente una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o proteínas IL-1ra de varias maneras entre las que se incluyen, sin limitación, síntesis química, detección selectiva de biblioteca de ADNc o genómica, detección selectiva de biblioteca de expresión y/o amplificación por PCR de ADNc. Estos métodos y otros, que son útiles para aislar dichas secuencias de ácido nucleico, se describen en Sambrook y cols. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; de Ausubel y cols. (1994), *Current Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols Press; y por Berger y Kimmel (1987), *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*, vol. 152, Academic Press, Inc. San Diego Ca.

La síntesis química de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína deseada puede llevarse a cabo utilizando métodos muy conocidos en la especialidad, tales como los que describe Engels y cols. (1989), *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28: 716-734 y Wells y cols. (1985), *Gene*, 34: 315. Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos de síntesis de secuencia de ácido nucleico de fosfotriéster, fosforoamidita, y H-fosfonato. Se pueden sintetizar secuencias de ácido nucleico grandes, como por ejemplo, las que son más grandes de aproximadamente 100

nucleótidos de longitud, como varios fragmentos. A continuación, se pueden ligar los fragmentos entre sí para formar una secuencia de ácido nucleico adecuada. Un método preferible es la síntesis soportada por polímero aplicando la química de fosforamida normal.

- 5 Alternativamente, se puede obtener una secuencia de ácido nucleico adecuada por detección selectiva de una biblioteca de ADNc apropiada (es decir, una biblioteca preparada a partir de una o más fuentes de tejido que presuntamente expresa la proteína) o una biblioteca genómica (una biblioteca preparada a partir de un ADN genómico total). La fuente de la biblioteca de ADNc es típicamente una fuente de tejido o celular de cualquier especie que exprese presuntamente una proteína deseada en cantidades razonables. La fuente de la biblioteca genómica puede consistir en cualquier tejido o tejidos de un mamífero u otra especie que se crea que hospeda un gen que codifica la proteína deseada.

15 Se puede realizar la detección selectiva de los medios de hibridación para determinar la presencia de un ADN que codifica una proteína deseada utilizando una o más sondas de ácido nucleico (oligonucleótidos, fragmentos de ADN genómico o ADNc que poseen un nivel aceptable de homología con el ADNc o gen que se va a clonar) que se hibriden selectivamente con el o los ADNc o gen o genes presentes en la biblioteca. Las sondas utilizadas típicamente para dicha detección selectiva codifican una región reducida de la secuencia de ADN desde la misma especie o especie similar a la especie desde la que se prepara la biblioteca. Alternativamente, las sondas se pueden degenerar, tal como se explica en el presente documento.

20 Típicamente se lleva a cabo la hibridación por apareamiento de una sonda de oligonucleótido o ADNc con los clones en condiciones de severidad para prevenir una unión no específica a la vez que se permite la unión de los clones que tienen un nivel significativo de homología con la sonda o cebador. Las condiciones de rigor de lavado e hibridación típicas dependen en parte del tamaño (es decir el número de nucleótidos en longitud) del ADNc o la sonda de oligonucleótido o de si se genera o no la sonda. La probabilidad de identificación de un clon también se considera a la hora de diseñar el medio de hibridación (por ejemplo, si se está detectando selectivamente una biblioteca genómica o de ADNc o no).

30 Cuando se utiliza un fragmento de ADN (como por ejemplo un ADNc) como sonda, entre las condiciones de hibridación típicas se incluyen aquellas que se exponen en Ausubel y cols. (1994), anteriormente. Tras la hibridación, se lava el medio de hibridación en condiciones de severidad adecuadas, dependiendo de varios factores como el tamaño de la sonda, la homología de la sonda con el clon esperada, el medio de hibridación que se esté detectando selectivamente, el número de clones que se estén detectando selectivamente y similares.

35 Como ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas puede mencionarse una hibridación en 6 x SSC a 62-67 °C, seguido del lavado en 0,1 x SSC a 62-67 °C durante aproximadamente una hora. Alternativamente, otro ejemplo de condiciones de hibridación severas puede consistir en una hibridación a 45-55 % de formamida, 6 x SSC a 40-45 °C, seguido del lavado en 0,1 x SSC a 62-67 °C durante aproximadamente una hora. Asimismo, se incluyen secuencias de ADN que se hibridan con las secuencias de ácido nucleico que se indican en la Figura 1 en condiciones de hibridación relajadas y que codifican una proteína o proteínas IL-1ra. Como ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas relajadas se puede mencionar 6 x SSC a 45-55 °C o la hibridación con 30-40 % de formamida a 40-45 °C, seguido del lavado en 1-2 x SSC a 55 °C durante aproximadamente 30 minutos. Ver Maniatis y cols. (1982), *Molecular Cloning* (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, páginas 387 a 389.

45 Existen también protocolos ejemplares para las condiciones de lavado rigurosas, según los cuales se utilizan sondas de oligonucleótido para detectar selectivamente los medios de hibridación. Por ejemplo, en un primer protocolo se utilizan 6 x SSC con 0,05 por ciento de pirofosfato sódico a una temperatura comprendida entre aproximadamente 35 °C y 63 °C, dependiendo de la longitud de la sonda. Por ejemplo, se lavan 14 sondas de base a 35-40 °C, 17 sondas de base a 45-50 °C, 20 sondas de base a 52-57 °C, y 23 sondas de base a 57-63 °C. Se puede aumentar la temperatura 2-3 °C cuando la unión no específica de fondo resulta alta. En un segundo protocolo se utiliza cloruro de tetrametilamonio (TMAC) para el lavado. Una solución de lavado severa consiste en TMAC 3M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y 0,2 % SDS.

55 Otro método para obtener una secuencia de ácido nucleico adecuada que codifica una proteína o proteínas IL-1ra es la reacción en cadena de polimerasa (PCR). En este método, se prepara ADNc a partir de poli(A)+ARN o ARN total utilizando la transcriptasa inversa de enzima. A continuación, se añaden dos cebadores, típicamente complementarios de las dos regiones de ADN por separado (oligonucleótidos) que codifican la proteína deseada, al ADNc junto con una polimerasa, como por ejemplo polimerasa *Taq*, y la polimerasa amplifica la región de ADNc entre los dos cebadores.

60 Las secuencias de oligonucleótido seleccionadas como sondas o cebadores deberán ser de la longitud adecuada y suficientemente no ambigua como para reducir al mínimo la cantidad de unión no específica que pueda darse durante la detección selectiva o la amplificación por PCR. La secuencia real de las sondas o cebadores se basa normalmente en las secuencias o regiones altamente homólogas o conservadas. Opcionalmente, se pueden degenerar total o parcialmente las sondas o cebadores, es decir, pueden contener una mezcla de sondas/cebadores, que codifican todos ellos la misma secuencia de aminoácido, pero que utilizan diferentes

65

codones para hacerlo. Una alternativa a la preparación de sondas degeneradas consiste en colocar una inosina en alguna o en todas las posiciones de codón que varían según la especie. Las sondas o cebadores de oligonucleótido se pueden preparar a través de métodos de síntesis química para ADN tal como se describe en el presente documento.

5 Vectores

Se puede insertar ADN que codifica las proteínas deseadas en vectores para posterior clonación (amplificación de ADN) o para expresión. Los vectores adecuados están disponibles en el comercio o se pueden construir de manera específica. La selección o construcción de un vector apropiado dependerá de (1) si se va a utilizar o no para amplificación de ADN o para expresión de ADN, (2) el tamaño del ADN que se va a insertar en el vector y (3) la célula hospedadora destinada a transformarse con el vector.

15 Los vectores implican típicamente cada uno de ellos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína deseada unida operativamente a una o más de las siguientes secuencias reguladoras o de control de la expresión capaces de dirigir, controlar o afectar de otro modo a la expresión de una proteína deseada a través de una célula hospedadora seleccionada. Cada vector contiene varios componentes, dependiendo de su función (amplificación de ADN o expresión de ADN) y su compatibilidad con la célula hospedadora pretendida. Los componentes de vector incluyen generalmente, sin limitarse solo a ellos, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores o de selección, un promotor, un elemento potenciador, una secuencia de terminación de transcripción y similares. Estos componentes pueden obtenerse a partir de fuentes naturales o se pueden sintetizar a través de procedimientos conocidos.

25 Los ejemplos de vectores de clonación procariontes adecuados incluyen bacteriófagos tales como derivados lambda, o plásmidos de *Escherichia coli* (por ejemplo, derivados de plásmido pBR322, col E1, pUC, el factor F y Bluescript® (Stratagene, LaJolla, CA)). Se pueden utilizar también para este fin otros vectores de expresión apropiados de los que se conocen numerosos tipos dentro de la especialidad para las células hospedadoras que se describen a continuación.

30 Secuencia señal

Se puede insertar el ácido nucleico que codifica una secuencia señal en 5' de la secuencia que codifica una proteína deseada, por ejemplo, puede ser un componente de un vector o puede formar parte de un ácido nucleico que codifica la proteína deseada. El ácido nucleico que codifica la secuencia señal nativa de IL-1ra se conoce (patente de EE.UU. N.º 5.075.222).

Origen de replicación

40 Los vectores de expresión y clonación incluyen generalmente cada uno de ellos una secuencia de ácido nucleico que permite la replicación del vector en una o más células hospedadoras seleccionadas. En un vector de clonación, esta secuencia es típicamente aquella que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico hospedador e incluye un origen de replicación o una secuencia de replicación autónomamente. Dichas secuencias son muy conocidas. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, y son útiles diversos orígenes (por ejemplo, virus de simio 40 (SV40), poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) para los vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, el origen SV40 se utiliza frecuentemente solamente porque contiene el promotor temprano).

50 Gen de selección

Los vectores de expresión y clonación contienen cada uno de ellos típicamente un gen de selección. Dicho gen codifica una proteína "marcadora" necesaria para la supervivencia o crecimiento de las células hospedadoras transformadas cuando crecen en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras que no se transforman con el vector no contendrán el gen de selección y por lo tanto, no sobrevivirán en los medios de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexano o tetraciclina; (b) complementan las deficiencias auxotróficas o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles desde los medios de cultivo.

60 Se pueden utilizar otros genes de selección para amplificar los genes que se van a expresar. La amplificación es el proceso donde los genes que son más demandados para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se reiteran en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Entre los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero se incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Los transformantes celulares quedan bajo la presión de selección de manera que solamente los transformantes se adaptan de manera única para sobrevivir en virtud del marcador que está presente en los vectores. La presión de selección se impone al cultivar las células transformadas en condiciones donde la concentración del agente de selección en el medio logra cambiarse, lo que lleva a la amplificación tanto del gen de

selección como el ADN que codifica la proteína deseada. Como resultado, se sintetizan mayores cantidades de la proteína deseada desde el ADN amplificado.

5 Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato, un antagonista competitivo de DHFR. Una célula hospedadora apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo silvestre es la línea de células de ovario de hámster chino deficientes en actividad DHFR (Urlaub y Chasin (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77(7): 4216-4220. A continuación, se exponen las células transformadas a mayores niveles de metotrexato. Esto lleva a la síntesis de múltiples copias del gen DHFR y, de manera concomitante, a múltiples copias de otro ADN presente en el vector de expresión, como el ADN que codifica una proteína deseada.

Promotor

15 Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente cada uno de ellos un promotor que se reconoce por el organismo hospedador y que está unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína deseada. Un promotor es una secuencia sin traducir localizada aguas arriba (5') del codón de partida de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controla la transcripción y la traducción de una secuencia de ácido nucleico en particular. Un promotor puede agruparse convencionalmente en una de las dos clases, promotores inducibles y promotores constitutivos. Un promotor inducible inicia mayores niveles de transcripción desde ADN bajo su control como respuesta a ciertos cambios en las condiciones de cultivo, como por ejemplo la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. Se conoce un gran número de promotores, reconocidos a través de una serie de células hospedadoras potenciales. Se puede unir operativamente un promotor a ADN que codifica una proteína deseada separando el promotor del ADN fuente por digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia de promotor deseada. La secuencia de promotor IL-1ra nativa puede utilizarse para la amplificación y/o la expresión directa del ADN que codifica una proteína deseada. Es preferible un promotor heterólogo, sin embargo, si permite una mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína expresada en comparación con el promotor nativo y si es compatible con el sistema de célula hospedadora que ha sido seleccionado para su uso. Por ejemplo, se puede utilizar cualquiera de las secuencias de promotor nativas de otros miembros de la familia IL-1 para la amplificación directa y/o expresión del ADN que codifica una proteína deseada.

35 Entre los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas se incluyen sistemas de promotor de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptofano (trp); un sistema de gen de luminiscencia bacteriano (luxR) y promotores híbridos, como por ejemplo promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias de nucleótido se han publicado, lo que permite a las personas especializadas en este campo ligarlos con las secuencias de ADN deseadas empleando ligandos o adaptadores según sea necesario para suministrar los sitios de restricción necesarios.

40 Las secuencias de promotor adecuadas para su uso con hospedadores de levadura también se conocen dentro de la especialidad. Los promotores adecuados para su uso con células hospedadoras de mamífero se conocen y entre ellos se incluyen los obtenidos a partir de genomas de virus como virus de polioma, virus de viruela aviar, adenovirus (como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferentemente, SV40. Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de impacto por calor y promotor de actina.

Elemento potenciador

50 Los vectores de expresión y clonación contendrán típicamente cada uno de ellos una secuencia potenciadora para aumentar la transcripción por eucariotas superiores de una secuencia de ADN que codifica una proteína deseada. Los potenciadores son elementos de actuación en cis de ADN, normalmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan en el promotor aumentando su transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes en orientación y posición. Se han encontrado en 5' y 3' con respecto a la unidad de transcripción. Ventajosamente, se utilizan potenciadores de levadura con promotores de levadura. Se conocen varias secuencias de potenciador disponibles a partir de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Adicionalmente, otros ejemplos de elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas son potenciadores virales como el potenciador SV40, el potenciador de promotor de citomegalovirus temprano, el potenciador de polioma y potenciadores de adenovirus. Si bien se puede dividir un potenciador en un vector en la posición 5' o 3' para un ADN que codifica una proteína deseada, típicamente está localizado en un sitio 5' desde el promotor.

Terminación de la transcripción

65 Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas contendrán cada uno de ellos típicamente una secuencia necesaria para la terminación de la transcripción y para la estabilización de ARNm. Tales secuencias están disponibles comúnmente desde las regiones sin traducir 5' y ocasionalmente 3' de los ADN o los ADNc eucariotas. Dichas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la

porción sin traducir del ARNm que codifica una proteína deseada.

Construcción del vector

5 La construcción de un vector adecuado que contiene uno o más de los componentes que se han enumerado (junto con la secuencia de codificación deseada) puede llevarse a cabo a través de técnicas de ligación normales. Se segmentan plásmidos aislados o fragmentos de ADN, se adaptan y se religan en el orden deseado para generar el vector requerido. Para confirmar que se ha construido la secuencia correcta, se puede utilizar la mezcla de ligación para transformar *E. coli*, y se pueden seleccionar los transformantes con éxito a través de técnicas conocidas, tal como se ha descrito. A continuación, se preparan cantidades del vector desde los transformantes, se analizan por digestión con endonucleasa de restricción y/o se secuencian para confirmar la presencia del constructo deseado.

15 Se puede utilizar también un vector que proporciona la expresión transitoria del ADN que codifica una proteína deseada en células de mamífero. En general, la expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicarse eficientemente en una célula hospedadora, de manera que la célula hospedadora acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza altos niveles de la proteína deseada codificada por el vector de expresión. Cada uno de los sistemas de expresión transitorios, que comprende un vector de expresión adecuado y una célula hospedadora, permite la identificación positiva conveniente de las proteínas que codifican los ADN clonados, así como la rápida detección selectiva de dichas proteínas para las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas.

Células hospedadoras

25 En la presente invención también se proporciona cualquiera de una diversidad de células hospedadoras recombinantes, que contiene cada una de ellas una secuencia de ácido nucleico para su uso en la expresión de una proteína deseada. Las células hospedadoras procariotas y eucariotas ejemplares incluyen células de bacterias, de mamíferos, de hongos, de insectos, de levaduras o de vegetales.

30 Las células hospedadoras procariotas incluyen, pero no se limitan a, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos (por ejemplo, *E. coli* (HB101, DH5a, DH10, y MC1061); *Bacilli* spp. tales como *B. subtilis*; *Pseudomonas* spp. tales como *P. aeruginosa*; *Streptomyces* spp.; *Salmonella* spp. tales como *S. typhimurium*; o *Serratia* spp. tales como *S. marcescans*. En una realización específica, la proteína deseada puede expresarse en *E. coli*.

35 Además de las células hospedadoras procariotas, la proteína o proteínas IL-1ra pueden expresarse en la forma glucosilada a través de cualquiera entre una serie de células hospedadoras adecuadas derivadas de organismos multicelulares. Tales células hospedadoras son capaces de un procesamiento complejo y actividades de glucosilación. En principio, podría utilizarse cualquier cultivo de células eucariotas superiores, pudiendo implicar dicho cultivo tanto células de vertebrado como de invertebrado, incluyendo células vegetales y de insecto. Pueden ser hospedadores adecuados para la expresión de una proteína deseada microbios eucariotas como hongos filamentosos o levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es la que se utiliza más comúnmente dentro de los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores, si bien se conoce una serie de otros géneros, especies y cepas diversos y se dispone de ellos comúnmente.

45 Pueden usarse células de vertebrado, ya que la propagación de las células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) es un procedimiento muy conocido. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen, pero no se limitan a, línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7), línea de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión), células de riñón de hámster bebé y células de ovario de hámster chino. Otras líneas de célula de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones suizos, Balb-c o NIH, y líneas de células de hámster BHK o HaK. En un modo de realización específico, se puede expresar una proteína deseada en células COS o en células de baculovirus.

55 Puede transfectarse una célula hospedadora y transformar preferentemente con un ácido nucleico deseado en condiciones apropiadas que permitan la expresión del ácido nucleico. La selección de las células hospedadoras adecuadas y los métodos de transformación, cultivo, amplificación, detección selectiva y producción y purificación de producto son muy conocidas dentro de la especialidad (Gething y Sambrook (1981), Nature, 293: 620-625 o alternativamente, Kaufman y cols. (1985), Mol. Cell. Biol. 5(7): 1750-1759 o la patente de EE.UU. N.º 4.419.446. Por ejemplo, puede utilizarse la precipitación con fosfato de calcio para células de mamífero sin paredes celulares. También pueden usarse técnicas como electroporación, micro-inyección y otras técnicas conocidas.

65 También es posible que la proteína deseada se obtenga por recombinación homóloga o a través de métodos de producción recombinantes utilizando elementos de control introducidos en las células que ya contienen ADN que codifica la proteína deseada. La recombinación homóloga es una técnica desarrollada originalmente para genes diana para inducir o corregir mutaciones en genes activos transcripcionalmente (Kucherlapati (1989), Prog. in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol. 36: 301). La técnica básica fue desarrollada como un método para introducir mutaciones

específicas en regiones específicas del genoma de mamífero (Thomas y cols., (1986), Cell, 44:419-428; Thomas y Capecchi (1987), Cell 51: 503-512 y Doetschman y cols. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8583-8587) o para corregir mutaciones específicas dentro de genes defectuosos (Doetschman y cols. (1987), Nature, 330: 576-578). En la patente de EE.UU. N.º 5.272.071; el documento WO 92/01069; el documento WO 93/03183; el documento WO 94/12650 y el documento WO 94/31560 se describen técnicas ejemplares.

Cultivo de células hospedadoras

El método para cultivar cada una de las una o más células hospedadoras recombinantes para la producción variará dependiendo de muchos factores y consideraciones; el procedimiento de producción óptimo para una situación dada será evidente para aquellos expertos en la materia a través de una experimentación mínima. Tales células hospedadoras recombinantes se cultivan en un medio adecuado y a continuación, opcionalmente, se recupera, aísla y purifica la proteína expresada desde el medio de cultivo (o desde la célula, si se expresa intracelularmente) a través de medios adecuados conocidos por los expertos en la materia.

Específicamente, puede cultivarse cada una de las células recombinantes utilizadas para producir una proteína deseada en un medio adecuado para inducir promotores, seleccionar células hospedadoras recombinantes adecuadas o amplificar el gen que codifica la proteína deseada. El medio puede estar suplementado según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleósidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como gentamicina), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa y otras fuentes de energía. Se pueden incluir también otros suplementos en condiciones adecuadas, tal como podrán apreciar los expertos en la materia. Asimismo, los expertos en la materia conocerán las condiciones de cultivo adecuadas, tales como la temperatura, el pH y similares, para su uso con las células hospedadoras seleccionadas.

El producto de expresión resultante puede purificarse después próximo a la homogeneidad aplicando procedimientos conocidos en la técnica. En la patente de EE.UU. N.º 5.075.222 y el documento WO 91/08285 se enseñan técnicas de purificación ejemplares. Preferentemente, se obtiene el producto de expresión en una forma sustancialmente pura. "Sustancialmente pura" significa que IL-1ra, en una forma sin modificar, tiene una actividad específica comparativamente alta, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 150.000 - 500.000 unidades de receptor/mg como se define en Hannum y cols. (1990), Nature, 343: 341-340 y Eisenberg y cols. (1990), Nature, 343: 341-346, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia

Composiciones farmacéuticas

Se describen preparaciones farmacéuticas que contienen cada una de ellas cantidades efectivas terapéutica o profilácticamente de una proteína o proteínas IL-1ra o un derivado químico de las mismas (denominado de forma colectiva "producto o productos de proteína IL-1ra") en combinación con un vehículo. Entre los vehículos se incluyen preferentemente uno o más materiales de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptables en combinación con el producto o productos de proteína IL-1ra.

El disolvente primario en el vehículo puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Además, el vehículo puede contener excipientes farmacéuticamente aceptables para modificar o mantener el pH, preferentemente entre 6,0 y 7,0, más preferentemente 6,5 (por ejemplo, tampones como citratos o fosfatos y aminoácidos como glicina); viscosidad; transparencia; color; esterilidad; estabilidad (por ejemplo, sacarosa y sorbitol); olor; velocidad de disolución (por ejemplo, solubilizantes o agentes de solubilización como alcoholes; polietilenglicoles y cloruro sódico), velocidad de liberación; así como agentes de volumen para formulaciones liofilizadas (por ejemplo, manitol y glicina), agentes tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80, tritón y pluronics); antioxidantes (por ejemplo, sulfito sódico e hidrógeno sulfito sódico); conservantes (por ejemplo, ácido benzoico y ácido salicílico); agentes aromatizantes y de dilución; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; disolventes; cargas; vehículos de administración y otros adyuvantes y/o excipientes farmacéuticos. Se prevén también otras formas de administración eficaces, como por ejemplo formulaciones parenterales de liberación lenta, nebulizadores de inhalación, formulaciones oralmente activas, o supositorios. La composición también puede implicar preparaciones en partículas de compuestos poliméricos como polímeros de erosión en volumen (por ejemplo, copolímeros de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), mezclas de polímero PLGA, copolímeros de bloque de PEG, y ácido láctico y glicólico, poli(cianoacrilatos)); polímeros de erosión superficial (por ejemplo, poli(anhídridos) y poli(orto ésteres)); ésteres de hidrogel (por ejemplo, polialcoholes plurónicos, poli(alcohol vinílico), poli(vinil pirrolidona), copolímeros de anhídrido maleico-éter alquil vinílico, celulosa, derivados de ácido hialurónico, alginato, colágeno, gelatina, albúmina y almidones y dextranos) y sistemas de composición de los mismos; o preparaciones de liposomas o macroesferas. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo* de las proteínas y derivados de la presente invención. La formulación farmacéutica óptima para la proteína deseada se determinará por los expertos en la materia dependiendo de la ruta de administración y la dosis deseada. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, páginas 1435-1712; Gombotz y Pettit (1995), Bioconjugate Chem. 6: 332-351; documento WO 94/06457; Leone-Bay y cols. (1995), Journal of Medicinal Chemistry, 38: 4263-4269; Haas, y cols. (1995), Clinical Immunology

and Immunopathology, 76(1): 93; documento WO 94/21275; documento FR 2706772; documento WO 94/21235 y documento WO 97/28828 se describen ejemplos de composiciones farmacéuticas.

Las composiciones de liberación sostenida específicas están disponibles de los siguientes proveedores: Depotech (Depofoam™, un liposoma multivesicular) y Alkermes (ProLease™, una microesfera PLGA). En Peyron y Balazs (1974), Path. Biol., 22(8): 731-736; Isdale y cols. (1991), J. Drug. Dev., 4(2): 93-99; Larsen y cols. (1993), Journal of Biomedical Materials Research 27: 1129-1134; Namiki, y cols. (1982), International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology, 20(11): 501-507; Meyer y cols. (1995), Journal of Controlled Release, 35: 67-72; Kikuchi y cols. (1996), Osteoarthritis and Cartilage, 4:99-110; Sakakibara y cols. (1994), Clinical Orthopaedics and Related Research, 299 :282-292; Meyers and Brandt (1995), 22(9): 1732-1739; Laurent y cols., (1995), Acta Orthop Scand, 66(266): 116-120; Cascone y cols.(1995), Biomaterials, 16(7): 569-574; Yerashalmi y cols. (1994), Archives of Biochemistry and Biophysics, 313(2): 267-273; Bernatchez y cols., (1993), Journal of Biomedical Materials Research, 27(5): 677-681; Tan y cols. (1990), Australian Journal of Biotechnology, 4(1): 38-43; Gombotz and Pettit (1995), Bioconjugate Chem., 6: 332-351; las patentes de EE.UU. N.º 4.582.865; 4.605.691; 4.636.524; 4.713.448; 4.716.154; 4.716.224; 4.772.419; 4.851.521; 4.957.774; 4.863.907; 5.128.326; 5.202.431; 5.336.767; 5.356.883; las solicitudes de patente europeas N.º 0.507.604 A2 y 0.718.312 A2; y el documento WO 96/05845 se describen formas de hialuronano ejemplares. Las composiciones de hialuronano específicas están disponibles de los siguientes proveedores: BioMatrix, Inc. Ridgefield, NJ (Synvisc™, una mezcla 90:10 de un fluido hialino y un gel hialino); Fidia S.p.A.; Abano Terme, Italia (Hyalgan™, la sal sódica de un ácido hialurónico derivado de cresta de gallo (~500.000 a ~700.000 MW)); Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. Tokio, Japón (Artz™, una solución al 1 % de un ácido hialurónico derivado de cresta de gallo, ~ 700.000 MW); Pharmacia AB, Estocolmo, Suecia (Healon™, un ácido hialurónico derivado de cresta de gallo, ~4 x 10⁶ MW); Genzyme Corporation, Cambridge, MA (Surgicoat™, un ácido hialurónico recombinante); Pronova Biopolymer, Inc. Portsmouth, NH (Acido hialurónico FCH, un alto peso molecular (por ejemplo, ~1,5-2,2x10⁶ MW) ácido hialurónico preparado a partir de cultivos de Streptococcus zooepidemicus; Hialuronato sódico MW, ~1,0-1,6 x 10⁶ PM y hialuronato sódico LV, ~1,5-2,2 x 10⁶ MW); Calbiochem-Novabiochem AB, Lautelfingen, Suiza (ácido hialurónico, sal sódica (número de catálogo de la empresa 1997, 385908) preparado a partir de Streptococcus sp.); Intergen Company, Purchase, NY (un ácido hialurónico derivado de cresta de gallo, >1 x 10⁶ MW); Diosynth Inc., Chicago, IL; Amerchol Corp. Edison, NJ and Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. Tokio, Japón.

Otra formulación farmacéutica específica es citrato sódico 10 milimolar, cloruro sódico 140 milimolar, EDTA 0,5 milimolar, polisorbato al 0,1 % (p/p) en agua, pH 6,5 ("formulación de tampón citrato"). Otra formulación específica es fosfato sódico 10 milimolar, cloruro sódico 140 milimolar, entre 0,1 % (p/p) y polisorbato al 0,01 % (p/p) en agua y opcionalmente, EDTA 0,5 milimolar, pH 6,5 ("formulación de tampón fosfato"). Otra formulación específica más consiste en fluido hialino H-10™, un ácido hialurónico reticulado (Biomatrix, Inc., Ridgefield, Inc.) para conseguir 100 mg/ml de IL-1ra y ácido hialurónico al 2% (Mr ≥ 4 x 10⁶).

Una vez formulada la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales esterilizados en forma de solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o en un polvo liofilizado o deshidratado. Tales composiciones pueden almacenarse bien en una forma lista para su uso o bien en una forma que requiera la reconstitución antes de su administración (por ejemplo, liofilizada).

La presente invención puede emplear kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Los kits pueden contener cada uno de ellos tanto un primer recipiente que tiene una proteína deshidratada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. Los kits incluidos dentro del alcance de la presente invención son jeringuillas de una sola cámara o de varias cámaras previamente cargadas; las jeringuillas precargadas ejemplares (por ejemplo, jeringuillas líquidas y lio-jeringuillas como Lyo-Ject®, una liojeringuilla precargada de cámara dual) están disponibles de Vetter GmbH, Ravensburgo, Alemania.

50 Usos

El producto o productos de proteína IL-1ra pueden ser útiles como reactivos de investigación y agentes terapéuticos y de diagnóstico. De esta manera, el producto o productos de proteína IL-1ra pueden usarse en ensayos diagnósticos *in vitro* y/o *in vivo* para cuantificar la cantidad de IL-1 en una muestra de tejido o de órgano para determinar y/o aislar células que expresen IL-1. En ensayos de tejidos u órganos habrá menos radiactividad a partir de un producto o productos de proteína IL-1ra-¹²⁵I que se unan a IL-1, en comparación con una curva de unión patrón de un producto o productos de proteína IL-1ra-¹²⁵I, debido a la unión de IL-1ra nativa sin marcar a IL-1. Similarmente, el uso de un producto o productos de proteína IL-1ra-¹²⁵I puede usarse para detectar la presencia de IL-1 en diversos tipos celulares.

Se describe el uso de producto o productos de proteína IL-1ra en la generación de anticuerpos y los anticuerpos resultantes (incluyendo específicamente aquellos que también se unen a IL-1ra nativa). Pueden desarrollarse anticuerpos que se unen a producto o productos de proteína IL-1ra. Un experto en la materia puede usar procedimientos publicados bien conocidos para obtener anticuerpos monoclonales, policlonales o anticuerpos recombinantes, que reconocen y se unen específicamente a las diversas proteínas codificadas por las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Tales anticuerpos pueden usarse después para purificar y caracterizar la

IL-1ra nativa.

La presente invención también se refiere a usos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de ciertas enfermedades y afecciones médicas (muchas de las cuales pueden caracterizarse como enfermedades inflamatorias) que están mediadas por IL-1, así como a las secuelas y síntomas relacionados asociados a las mismas. Una lista no exhaustiva de las enfermedades mediadas por interleucina-1 (IL-1) agudas o crónicas incluye pero no se limita a las siguientes: ALS, enfermedad de Alzheimer, asma, aterosclerosis, caquexia/anorexia; síndrome de fatiga crónica, depresión, diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo I de inicio en la juventud y diabetes melitus); fiebre, fibromialgia o analgesia; glomerulonefritis; rechazo de injerto frente a hospedador; choque hemorrágico; hiperalgesia, enfermedad intestinal inflamatoria; lesión isquémica, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o ictus, que pueden conducir a neurodegeneración); enfermedades del pulmón (por ejemplo, ARDS y fibrosis pulmonar); mieloma múltiple; esclerosis múltiple; leucemia mielógena (por ejemplo, AML y CML) y otras leucemias; miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteína muscular, esp., en sepsis), enfermedades oculares, osteoporosis; enfermedad de Parkinson; dolor, pancreatitis, parto prematuro; psoriasis; lesión por reperfusión; enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide; osteoartritis, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, escleroderma, esclerosis sistémica, vasculitis, vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos ("séptica"), Síndrome de Sjögren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y artritis de célula gigante); shock séptico; efectos colaterales de terapia de radiación; enfermedad de articulación mandibular temporal; metástasis de tumor; o estado inflamatorio como resultado de una torcedura, tensión, daño de cartilago, trauma, cirugía ortopédica, infección y otros procesos de la enfermedad.

Los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-1ra e IL-1ra) pueden administrarse a un paciente en cantidades terapéuticamente eficaces para prevenir o tratar enfermedades mediadas por IL-1 incluyendo enfermedades reumáticas. Se pretende que el término "paciente" incluya animales (por ejemplo, gatos, perros y caballos) así como seres humanos.

Además, los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-1ra e IL-1ra) pueden administrarse por vía tópica, entérica o parenteral incluyendo sin limitarse solo a ellas, por infusión, intraarterial, intraarticular, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraorbital, intratecal, intravenosa, intraperitoneal, intraespinal, inyección intrasternal, intraventricular, subcutánea, subcuticular, subcapsular, subaraquinoide y transtraqueal. Los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-1ra e IL-1ra) pueden administrarse también por administración oral o se pueden administrar a través de membranas mucosas es decir, por vía bucal, intranasal, rectal o sublingual para administración sistémica.

Es preferible que los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) se administren por vía intraarticular, subcutánea, intramuscular o inyección intravenosa. Adicionalmente, los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-an IL-1ra e IL-1ra) pueden administrarse por infusión continua (por ejemplo, dispositivos de modulación de flujo por infusión externa o implantados de forma constante o intermitente) de manera que proporcionen continuamente el nivel deseado de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en la sangre durante el tiempo que dure la administración. Esto se puede llevar a cabo por medio de una mini-bomba, como por ejemplo una mini-bomba osmótica. De esta forma, es posible asegurar que se mantiene la cantidad de los fármacos en el nivel deseado y es posible tomar muestras de sangre y llevar un control de la cantidad de fármaco en la corriente sanguínea. En el comercio se dispone de varias bombas, como por ejemplo de proveedores como MiniMed Inc., Sylmar, CA (por ejemplo, MT507) y Alza Corp., Palo Alto CA (por ejemplo, bomba osmótica Alzet, modelo 2ML1).

También se contempla la puesta en práctica de otros modos de dosificación continua o próxima a la continua. Por ejemplo, la formación de derivados químicos puede tener como resultado formas de liberación sostenida de la proteína que tienen el efecto de mantener una presencia continua en la corriente sanguínea, en cantidades predecibles en función de un régimen de dosis determinado.

Los modos de utilización de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo enfermedades reumáticas (por ejemplo, osteoartritis, artritis psoriásica y artritis reumatoide) se exponen en la solicitud de patente australiana AU 9173636, las enseñanzas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. A modo de ejemplo, pero sin limitación, en una realización específica se pueden administrar los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) intra-articularmente para el tratamiento de artritis reumatoide y osteoartritis. A modo de ejemplo pero sin limitación, en otra realización específica, se pueden administrar los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) subcutáneamente o intramuscularmente para el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, esclerosis múltiple, mieloma múltiple o leucemias mielógenas (por ejemplo, AML y CML) y otras leucemias. A modo de ejemplo, pero sin limitación, en otra realización específica más pueden administrarse los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) por vía intravenosa para el tratamiento de lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, o para el tratamiento de

enfermedad de hospedador frente a injerto; o se pueden administrar por vía interventricular para el tratamiento de lesión cerebral como resultado de traumatismo.

5 En otra realización, también se contempla la terapia celular, por ejemplo, la implantación de células que producen un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra). Esta realización de la presente invención puede incluir implantar en pacientes células que son capaces de sintetizar y secretar un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra). Tales células que producen un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) pueden ser células que normalmente no producen un inhibidor de IL-1 pero que se han modificado para producir un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra). Las células también pueden ser células cuya capacidad para producir un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) se ha aumentado por transformación con un polinucleótido adecuado para la expresión y la secreción de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra). Para minimizar una reacción inmunológica posible en pacientes administrando un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) de una especie extraña, se prefiere que las células sean de la misma especie que el paciente (por ejemplo, humana) o que las células se encapsulen con un material que proporcione una barrera contra el reconocimiento inmune, o que las células se coloquen en una localización inmunológicamente privilegiada, tal como en el testículo, en el ojo o en el sistema nervioso central.

20 Las células humanas o animales distintas de humanas pueden implantarse en pacientes en envueltas o membranas poliméricas semipermeables biocompatibles para permitir la liberación de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra), pero para prevenir la destrucción de las células por el sistema inmune del paciente o por otros factores en detrimento desde el tejido circundante. Alternativamente, las propias células del paciente, transformadas *ex vivo* para producir un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra), pueden implantarse directamente en el paciente sin tal encapsulación. La metodología para la encapsulación de membrana de células vivas es familiar para aquellos expertos en la materia, y la preparación de células encapsuladas y su implantación en pacientes pueden lograrse.

30 Incluso en otra realización, también se contempla la terapia génica *in vivo*, en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) se introduce directamente en un paciente. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) se introduce en células diana a través de la inyección local de una construcción de ácido nucleico, con o sin un vector de transporte apropiado, tal como un vector vírico adenoasociado. Los vectores víricos alternativos incluyen pero no se limitan a vectores de retrovirus, adenovirus, virus del herpes simplex y virus del papiloma. La transferencia física puede lograrse *in vivo* por inyección local de la construcción deseada de ácido nucleico u otro vector de transporte apropiado que contenga la secuencia de ácido nucleico deseada, transferencia mediada por liposomas, inyección directa (ADN desnudo), transferencia mediada por receptor (complejo ligando-ADN) o bombardeo de micropartículas (pistola génica).

40 Las técnicas de terapia celular y génica ejemplares se desvelan en la Patente de EE.UU. N.º 4.892.538; la Patente de EE.UU. N.º 5.011.472; la Patente de EE.UU. N.º 5.106.627; el documento DE 4219626, el documento WO 94/20517 y el documento 96/22793.

45 Independientemente de la manera de administración, el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-1 requiere una dosis o un régimen de dosis total de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) eficaz para reducir o aliviar los síntomas de la enfermedad. Los factores que determinan la dosificación apropiada o el régimen de dosis total pueden incluir la enfermedad o afección que se vaya a tratar o prevenir, la severidad de la enfermedad y la ruta de administración, así como la edad, el sexo y el estado médico del paciente.

50 El experto en la materia podrá afinar mejor los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento de manera rutinaria, especialmente a la luz de la información sobre la dosificación y los ensayos que se describen en el presente documento. La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del producto o productos del inhibidor IL-1 (por ejemplo, un IL-an IL-1ra) en la formulación utilizada. Los inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) puede administrarse de una vez, o en los casos de trastornos graves o prolongados, se puede administrar de forma diaria en dosis menos frecuentes o se puede administrar con una dosis de bolo inicial seguido de una dosis continua o una administración sostenida. También se contempla la puesta en práctica de otros modos de dosificación continua o próxima a la continua. Por ejemplo, la formación de un derivado químico puede tener como resultado una forma de liberación sostenida que tiene el efecto de mantener una presencia continua en la corriente sanguínea, en cantidades predecibles en función de una dosis o un régimen de dosis total determinado. La dosis o régimen de dosis total se podrá determinar también a través del uso de ensayos conocidos para determinar las dosis utilizadas en combinación con los datos de respuesta a dosis apropiados.

65 Cuando se administra por vía parenteral, cada dosis unitaria, por ejemplo, puede consistir en hasta 200 mg, generalmente hasta 150 mg y más generalmente hasta 100 mg. Cuando se administra en una cavidad articular, la

composición farmacéutica se administra preferentemente en una sola inyección desde una jeringuilla de 3 a 10 ml que contiene una dosis, por ejemplo, de hasta 200 mg/ml, generalmente de hasta 150 mg y más generalmente de hasta 100 mg de producto IL-1 disuelto en solución salina isotónica tamponada con fosfato. La preparación se puede administrar en una cavidad articular a una frecuencia por ejemplo de una vez cada 7 a 10 días. Según dicho modo, se lleva a cabo la administración de modo continuo, por ejemplo de 4 a 5 veces, al mismo tiempo que se varía la dosis, si es necesario.

Como se contempla por la presente invención, puede administrarse un producto inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) como adjunto de otra terapia y también con otras formulaciones farmacéuticas adecuadas para la indicación que se esté tratando. Puede administrarse un producto inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) y cualquiera de una o más terapias adicionales o puede administrarse formulaciones farmacéuticas separadamente o en combinación.

En una realización específica, la presente invención se dirige al uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento y tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más inhibidores de TNF para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo inflamación aguda y crónica como caquexia/anorexia; síndrome de fatiga crónica; depresión, diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo I de inicio en la juventud y diabetes melitus); fibromialgia o analgesia; rechazo de hospedador frente a injerto; hiperalgesia, enfermedad intestinal inflamatoria; lesión isquémica, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de trauma, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, que pueden conducir a neurodegeneración); enfermedades del pulmón (por ejemplo, ARDS y fibrosis pulmonar); esclerosis múltiple; enfermedades oculares; dolor, pancreatitis; lesión por reperfusión; enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide; osteoartritis, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, escleroderma, esclerosis sistémica, vasculitis, vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos ("séptica"), síndrome de Sjögren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y artritis de célula gigante); shock séptico; efectos colaterales de terapia de radiación; enfermedad de articulación mandibular temporal; metástasis de tumor; o estado inflamatorio como resultado de una torcedura, tensión, daño de cartílago, trauma, cirugía ortopédica, infección y otros procesos de enfermedad. Tales inhibidores de TNF incluyen compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular del TNF. En una realización específica, la presente invención se dirige al uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más de los siguientes inhibidores de TNF: proteínas de unión a TNF (receptor TNF soluble tipo I y receptor TNF soluble tipo II ("sTNFR")), como se define en el presente documento), anticuerpos anti-TNF, factor estimulante de colonias de granulocitos; talidomida; BN 50730; tenidap; E 5531; tiapafant PCA 4248; nimesulida; panavir; rolipram; RP 73401; péptido T; MDL 201,449A; clorhidrato de (1R,3S)-Cis-1-[9-(2,6-diaminopurinil)]-3-hidroxi-4-ciclopenteno; (1R,3R)-trans-1-[9-(2,6-diamino)purina]-3-acetoxiciclopentano; clorhidrato de (1R,3R)-trans-1-[9-adenil]-3-azidociclopentano y (1R,3R)-trans-1-[6-hidroxi-purin-9-il]-3-azidociclopentano.

Las proteínas de unión a TNF se desvelan en la técnica (documentos EP 308 378, EP 422 339, GB 2 218 101, EP 393 438, WO 90/13575, EP 398 327, EP 412 486, WO 91/03553, EP 418 014, JP 127.800/1991, EP 433 900, Patente de EE.UU. N.º 5.136.021, GB 2 246 569, EP 464 533, WO 92/01002, WO 92/13095, WO 92/16221, EP 512 528, EP 526 905, WO 93/07863, EP 568 928, WO 93/21946, WO 93/19777, EP 417 563, Solicitud PCT Internacional N.º PCT/US97/12244).

Por ejemplo, los documentos EP 393 438 y EP 422 339 enseñan las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de un sTNFR-I (denominado en la solicitud "inhibidor de TNF de 30 kDa") y un sTNFR-II (denominado en la solicitud "inhibidor de TNF de 40 kDa") así como formas modificadas de los mismos (por ejemplo, fragmentos, derivados funcionales y variantes). El documento EP 393 438 y el documento EP 422 339 también desvelan métodos para aislar los genes responsables de codificar los inhibidores, clonar el gen en vectores adecuados y tipos celulares y expresar el gen para producir los inhibidores. Adicionalmente, se han desvelado también formas polivalentes (es decir, moléculas que comprenden más de un resto activo) de sTNFR-I y sTNFR-II. En una realización, la forma polivalente puede construirse, por ejemplo, por acoplamiento químico de al menos un inhibidor de TNF y otro resto químico con cualquier conector clínicamente aceptable, por ejemplo polietilenglicol (documento WO 92/16221 y documento WO 95/34326), mediante un conector peptídico (Neve et al. (1996), Cytokine, 8(5):365-370), acoplado químicamente a biotina y después uniéndose a avidina (documento WO 91/03553) y finalmente, construyendo moléculas de anticuerpo quimérico (Patente de EE.UU. 5.116.964, documento WO 89/09622, documento WO 91/16437 y documento EP 315062).

Los anticuerpos anti-TNF incluyen anticuerpo MAK 195F Fab (Holler y col. (1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147); anticuerpo monoclonal CDP 571 anti-TNF (Rankin et al. (1995), British Journal of Rheumatology, 34:334-342); anticuerpo monoclonal anti-factor de necrosis tumoral murino BAY X 1351 (Kieft y col.(1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9); anticuerpo monoclonal anti-TNF CentNF cA2 (Elliott y col. (1994), Lancet, 344:1125-1127 y Elliott y col. (1994), Lancet, 344:1105-1110).

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con el antígeno fas humano secretado o soluble o versiones recombinantes del mismo (documento WO 96/20206 y Mountz et al., J. Immunology, 155:4829-4837; y el documento EP 510 691). El documento WO 96/20206 desvela el antígeno fas humano secretado (nativo y recombinante, incluyendo una proteína de fusión Ig), métodos para aislar los genes responsables de codificar el antígeno fas humano recombinante soluble, métodos para clonar el gen en vectores y tipos celulares adecuados y métodos para expresar el gen para producir los inhibidores. El documento EP 510 691 enseña ADN que codifican para el antígeno fas humano, incluyendo el antígeno fas soluble, vectores que expresan dichos ADN y transformantes transfectados con el vector. Cuando se administran parenteralmente, las dosis de una proteína de fusión de antígeno fas soluble o secretado son cada una generalmente de aproximadamente 1 microgramo/kg a aproximadamente 100 microgramos/kg.

El tratamiento de la presente invención de enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo inflamación crónica y aguda tales como enfermedades reumáticas incluye el uso de fármacos de primera línea para controlar el dolor y la inflamación clasificados como fármacos anti-inflamatorios no esteroides (AINE). Los tratamientos secundarios incluyen corticosteroides, fármacos antireumáticos de lenta actuación (SAARD) y fármacos de modificación de la enfermedad (DM). La información referente a estos compuestos se puede encontrar en el Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 16ª edición, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, NJ (1992) y en Pharmaprojects, PJB Publications Ltd.

La presente invención se dirige al uso de un inhibidor de IL-1 y un anticuerpo monoclonal anti-IL-1) y metotrexato para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1 como se define en las reivindicaciones 1, 5 y 7- Los AINE deben su acción antiinflamatoria, al menos en parte, a la inhibición de la síntesis de prostaglandina ((Goodman y Gilman en "The Pharmacological Basis of Therapeutics," MacMillan 7th Edition (1985)). Los AINE pueden caracterizarse en nueve grupos: (1) derivados del ácido salicílico; (2) derivados del ácido propiónico; (3) derivados del ácido acético; (4) derivados del ácido fenámico; (5) derivados del ácido carboxílico; (6) derivados del ácido butírico; (7) oxicams; (8) pirazoles y (9) pirazonas.

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más derivados de ácido salicílico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Tales derivados de ácido salicílico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acetaminosalol, aloxiprina, aspirina, benorilato, bromosaligenina, acetilsalicilato cálcico, difusinal trisalicilato magnésico colina, etersalato, fendosal, ácido gentsílico, glicolsalicilato, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfolina, salicilato de 1-naftilo, olsalazina, parsalmida, acetilsalicilato de fenilo, salicilato de fenilo, salacetamida, ácido O-acético de salicilamida, salsalato y sulfasalazina. Los derivados de ácido salicílico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más derivados de ácido propiónico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido propiónico, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, dexindoprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, furclopuprofeno, ibuprofeno, ibuprofeno de aluminio, ibuproxam, indoprofeno, isoprofeno, cetoprofeno, loxoprofeno, miroprofeno, naproxeno, oxaprozina, picetoprofeno, pimeprofeno, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, piridoxiprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tioxaprofeno. Los derivados de ácido propiónico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más derivados de ácido acético, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido acético, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acemetacina, alclofenac, amfenac, bufexamac, cinmetacina, clopirac, delmetacina, diclofenac sódico, etodolac, felbinac, fenclofenac, fenclorac, ácido fenclozico, fentiazac, furofenac, glucametacina, ibufenac, indometacina, isofezolac, isoxepac, lonazolac, ácido metiacínico, oxametacina, oxpinac, pimetacina, proglumetacina, sulindac, talmetacina, tiaramida, tiopinac, tolmetina, zidometacina y zomepirac. Los derivados de ácido acético estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más derivados de ácido fenámico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido fenámico, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: ácido enfenámico, etofenamato, ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, meclofenamato sódico, ácido

medofenámico, ácido mefanámico, ácido niflúmico, talniflumato, terofenamato, ácido tolfenámico y ufenamato. Los derivados de ácido fenámico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

- 5 Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más derivados de ácido carboxílico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido carboxílico, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: clidanac, diflunisal, flufenisal, inoridina, cetorolac y tinoridina. Los derivados de ácido carboxílico estructuralmente
10 relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

- 15 Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más derivados de ácido butírico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido butírico, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: bumadizona, butibufeno, fenbufeno y xenbucina. Los derivados de ácido butírico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

- 20 Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más oxicamos, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los oxicamos, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam y 4-hidroxi-1,2-benzotiazina 1,1-dióxido de 4-(N-fenil)-carboxamida. Los oxicamos
25 estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

- 30 Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más pirazoles, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los pirazoles, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: difeminazol y epirizol. Los pirazoles estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

- 35 Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de una o más pirazolonas, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Las pirazolonas, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas comprenden: apazona, azapropazona, bezpiperilona, fepazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenylbutazona, pipebuzona, propilfenazona,
40 ramifenazona, suxibuzona y tiazolinobutazona. Las pirazolonas estructuralmente relacionadas que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

- 45 Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de los siguientes AINE: ácido ϵ -acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, anitrazafeno, antrafenina, bendazac, lisinato de bendazac, benzidamina, beprozina, broperamol, bucoloma, bufezolac, ciproquazona, cloximato, dazidamina, deboxamet, detomidina, difenpiramida, difenpiramida, difisalamina, ditazol, emorfazona, mesilato de fanetizol, fenflumizol, floctafenina, flumizol, flunixina, fluproquazona, fopirtolina, fosfosal, guaimesal, guaiazolena, isonixirna, lefetamina HCl, leflunomida, lofemizol, lotifazol, clonixinato de lisina,
50 meseclazona, nabumetona, nictindola, nimesulida, orgoteina, orpanoxina, oxaceprolm, oxapadol, paranilina, perisoxal, citrato de perisoxal, pifoxime, piroxeno, pirazolac, pirfenidona, proquazona, proxazol, tielavina B, tiffamizol, timegadina, tolectina, tolpadol, triptamida y aquellos designados por el número de código de compañía tales como 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (ácido 4-benzoil-1-indancarboxílico), TVX2706, U60257, UR2301 y WY41770. Los AINE
55 estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

- 60 Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más corticosteroides, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo inflamación aguda y crónica tales como enfermedades reumáticas, enfermedad de injerto frente a hospedador y esclerosis múltiple. Los corticosteroides, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen hidrocortisona y compuestos que derivan de hidrocortisona, tales como 21-acetoxipregnenolona, alclomerasona, algestona, amcinonida, beclometasona,
65

betametasona, valerato de betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, butirato de clobetasona, clocortolona, clprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacon, desonida, desoximerasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronida, flumetasona, flumetasona pivalato, flunisolida, acetonida flucinolona, fluocinonida, fluorocinolona
 5 acetonida, butilo de fluocortina, fluocortolona, hexanoato de fluorocortolona, valerato de diflucortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednidane, fluprednisolona, flurandenolida, formocortal, halcinonida, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona, succinato de hidrocortisona 21-sódica, tebutato de hidrocortisona, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednicolona, furoato de mometasona, parametasona,
 10 prednicarboato, prednisolona, 21-diedriaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sódica, succinato de prednisolona sódica, 21-*m*-sulfobenzoato de prednisolona sódica, 21-estearoglicolato de prednisolona sódica, tebutato de prednisolona, 21-trimetilacetato de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, 21-dietilaminoacetato de prednilideno, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetonida, triamcinolona benetonida y triamcinolona hexacetona. Los corticosteroides estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más fármacos antirreumáticos de actuación lenta (SAARD) o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD),
 20 ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo inflamación aguda y crónica tales como enfermedades reumáticas enfermedad de injerto frente a hospedador y esclerosis múltiple. Los SAARD o DMARD, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden alocupreido sódico, auranofina, aurotioglucosa, aurotioglucánido, azatioprina, brequinar sódico, bucilamina, 3-aurotio-2-propanol-1-sulfonato cálcico, clorambucilo, cloroquina, clobuzarit, cuproxolina, ciclofosfamida, ciclosporina, dapsona, 15-desoxiespergualina, diacereina,
 25 glucosamina, sales de oro (por ejemplo sal de oro de cicloquina, tiomato de oro sódico, tiosulfato de oro sódico), hidroxicloquina, hidroxiourea, cebuzona, levamisol, lobenzarit, melitina, 6-mercaptapurina, metotrexato, mizoribina, mofetilo de micofenolato, mioral, mostaza de nitrógeno, D-penicilamina, imidazoles de piridinol tales como SKNF86002 y SB203580, rapamicina, tioles, timopoyetina y vincristina. Los SAARD o DMARD estructuralmente
 30 relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más inhibidores de COX2, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el
 35 tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo inflamación crónica y aguda. Los ejemplos de inhibidores de COX2, los ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen, por ejemplo, celecoxib. Los inhibidores de COX2 estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

Se describe el uso de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína IL-an IL-1ra e IL-1ra) en combinación (tratamiento previo, post-tratamiento o tratamiento concurrente) con cualquiera de uno o más antimicrobianos, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento
 40 de enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo inflamación aguda y crónica. Los antimicrobianos incluyen, por ejemplo, ampicilina, amoxicilina, aureomicina, bacitracina, ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefaclor, cefalexina, cefradina, ciprofloxacina, ácido clavulánico, cloxacilina, dicloxacilano, eritromicina, flucloxacilano, gentamicina, gramicidina, meticilano, neomicina, oxacilano, penicilina y vancomicina. Los antimicrobianos estructuralmente
 45 relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares también se destinan a abarcarse por este grupo.

Es especialmente ventajoso formular composiciones de los compuestos antiinflamatorios adicionales en formas de dosificación unitarias para la facilidad de administración y la uniformidad de la dosificación. "Forma de dosificación unitaria" como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas ajustadas como
 50 dosificaciones unitarias para los pacientes a tratarse, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos antiinflamatorios adicionales calculados para producir el efecto terapéutico deseado en asociación al vehículo farmacéutico requerido. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimiento, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son compatibles con el ingrediente activo y con el modo de administración y otros ingredientes de la formulación y no deletéreos para el receptor.

Para la administración terapéutica oral, el compuesto antiinflamatorio adicional puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares, o puede incorporarse directamente con el alimento en la dieta. Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también lo siguiente: un aglutinante tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico, un agente disgregante tal
 65 como almidón de maíz, ácido alginico y similares; un agente lubricante tal como estearato magnésico; un agente

edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, aceite de verde de invierno o sabor a cereza o a naranja. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además del material del tipo descrito en el presente documento, un vehículo líquido. Diversos materiales distintos pueden estar presentes como un recubrimiento o de otra manera modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden recubrirse con shellac, azúcar o ambos. Por supuesto, cualquier material usado para preparar cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el compuesto antiinflamatorio adicional puede incorporarse en una preparación y formulación de liberación sostenida. La cantidad del compuesto antiinflamatorio adicional en tal composición terapéuticamente útil es tal que se obtendrá una dosificación adecuada.

Para la administración terapéutica parenteral, cada compuesto antiinflamatorio adicional puede incorporarse con una solución inyectable estéril. La solución inyectable estéril puede prepararse incorporando el compuesto antiinflamatorio adicional en la cantidad requerida en un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado, con diversos ingredientes distintos, seguido de esterilización filtrada. En el caso de dispersiones, cada una debe prepararse incorporando el compuesto antiinflamatorio adicional en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los ingredientes distintos requeridos de aquellos enumerados en el presente documento. En el caso de soluciones inyectables estériles, cada una puede prepararse incorporando un polvo del compuesto antiinflamatorio adicional y, opcionalmente, cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo, donde el polvo se prepara mediante cualquier técnica apropiada (por ejemplo secado al vacío y secado por congelación).

El uso de tales medios y agentes se conoce bien en la técnica (véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, páginas 1435-1712). Los ingredientes suplementarios activos también pueden incorporarse en las composiciones.

La dosis específica del compuesto antiinflamatorio adicional se calcula de acuerdo con el peso aproximado del cuerpo o el área superficial del paciente. Otros factores para determinar la dosificación apropiada pueden incluir la enfermedad o afección inflamatoria aguda o crónica a tratarse o prevenirse, la gravedad de la enfermedad, la ruta de administración y la edad, el sexo y la condición médica del paciente. El refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cada una de las formulaciones mencionadas en el presente documento se realiza rutinariamente por aquellos expertos en la materia. Las dosificaciones también pueden determinarse a través del uso de ensayos conocidos para determinar dosificaciones usadas junto con datos de respuesta a dosis apropiados.

De esta manera, por ejemplo, está dentro del alcance de la presente invención que las dosis de los compuestos antiinflamatorios adicionales seleccionadas para tratar una enfermedad inflamatoria aguda o crónica particular tales como enfermedades reumáticas puedan variarse para lograr un efecto terapéutico deseado. Donde uno de los compuestos antiinflamatorios adicionales tiene efectos secundarios, pueden darse a pacientes durante periodos de tratamiento alternos de terapia de combinación. Por ejemplo, el tratamiento crónico de metotrexato se asocia a toxicidad gastrointestinal, hepática, de la médula ósea y pulmonar (Sandoval et al. (1995), British Journal of Rheumatology, 34:49-56).

Los ensayos para monitorizar la mejora de una enfermedad pueden incluir ensayos específicos dirigidos, por ejemplo, a la determinación de la respuesta sistémica a la inflamación, que incluyen la velocidad de sedimentación de eritrocitos (ESR) y los reactivos de fase aguda (APR). Se realizan observaciones del hinchamiento, etc. de las partes corporales afligidas. La mejora de la rigidez y estar apretado (donde sea aplicable) y la reducción del dolor del paciente también se observan. Si la condición del paciente es estable, el paciente se re-trata con la misma dosificación semanalmente y se evalúa semanalmente. Con la condición de que la condición del paciente sea estable, el tratamiento puede continuarse. Después de seis meses de tratamiento, se determinan los cambios anatómicos del esqueleto por formación de imágenes radiológicas, por ejemplo por radiografía de rayos X.

Al final de cada periodo, el paciente se evalúa de nuevo. La comparación de las evaluaciones radiológicas de pre-tratamiento y post-tratamiento, ESR y APR indican la eficiencia de los tratamientos. De acuerdo con la eficiencia de los tratamientos y la condición del paciente, la dosificación puede aumentarse o mantenerse constante durante la duración del tratamiento.

Se describe un método con, opcionalmente, una de las siguientes combinaciones para tratar o prevenir enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo inflamación aguda y crónica tales como enfermedades reumáticas y los síntomas asociados a las mismas. Una combinación es un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o un hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) con uno o más de metotrexato, leflunomida, un inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina), ciprofloxacina, antígeno fas secretado o soluble y un inhibidor de TNF (por ejemplo, sTNFR). Las combinaciones preferidas incluyen el producto o productos de proteína IL-1ra y metotrexato, o el producto o productos de proteína IL-1ra y leflunomida. Otra combinación preferida de dicho producto o productos de proteína IL-1ra con uno o más de

metotrexato, leflunomida, sulfasazina e hidroxiclorocina.

5 El método puede comprender la administración (por ejemplo, por vía intraarticular, subcutánea o intramuscular) de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc) formulado opcionalmente con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), formulación de tampón citrato o formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento, tratamiento concurrente) con metotrexato para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-1 incluyendo inflamación crónica y aguda como caquexia/anorexia; síndrome de fatiga crónica; depresión, diabetes (por ejemplo, diabetes de tipo I de inicio en la juventud y diabetes melitus); fibromialgia o analgesia; rechazo de hospedador frente a injerto; 10 hiperalgesia, enfermedad intestinal inflamatoria; lesión isquémica, incluyendo isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, que pueden conducir a neurodegeneración); enfermedades del pulmón (por ejemplo, ARDS y fibrosis pulmonar); esclerosis múltiple; enfermedades oculares, dolor, pancreatitis; lesión por reperfusión; enfermedades reumáticas (por ejemplo, artritis reumatoide; osteoartritis, artritis juvenil (reumatoide), poliartitis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis enteropática, polimiositis, dermatomiositis, escleroderma, esclerosis sistémica, vasculitis, vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos ("séptica"), Síndrome de Sjögren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y artritis de célula gigante); shock séptico; efectos colaterales de terapia de radiación; enfermedad de articulación mandibular temporal; metástasis de tumor; o estado inflamatorio como resultado de una torcedura, tensión, daño de cartílago, traumatismo, cirugía ortopédica, infección 20 y otros procesos de la enfermedad.

25 El método puede comprender la administración (por ejemplo, intraarticular, subcutánea o intramuscular) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento concurrente) con metotrexato y/o leflunomida y/o sTNFR para tratar artritis (por ejemplo osteoartritis, artritis psoriásica y/o artritis reumatoide) y los síntomas asociados con ellos.

30 El método puede comprender la administración (por ejemplo, intraarticular, subcutánea o intramuscular) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento concurrente) con activador de plasminógeno tisular y/o sTNFR para tratar la lesión cerebral como resultado de un traumatismo, epilepsia, hemorragia o ictus, cada uno de los cuales puede dar lugar a neurodegeneración. 35

40 El método puede comprender la administración (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento concurrente) con uno o más de un corticosteroide, ciclosporina o un interferón (por ejemplo interferón alfa, interferón beta, interferón gamma e interferón consenso) y/o un inhibidor de TNF (por ejemplo, sTNFR) para tratar esclerosis múltiple.

45 El método puede comprender la administración (por ejemplo, intravenosa) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento concurrente) con uno o más de metotrexato, leflunomida, un corticosteroide, FK506, ciclosporina, una proteína fas soluble y/o sTNFR para tratar el rechazo de injerto frente a hospedador.

50 El método puede comprender la administración (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento concurrente) con G-CSF y/o sTNFR para tratar la enfermedad inflamatoria del intestino. 55

60 El método puede comprender la administración (por ejemplo, subcutánea o intramuscular) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento concurrente) con un interferón (por ejemplo interferón alfa, interferón beta, interferón gamma e interferón consenso) para tratar mieloma múltiple o mielógeno (por ejemplo, AML y CML) y otras leucemias.

65 El método puede comprender la administración (por ejemplo, subcutánea o intraventricular o intratecal) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento

concurrente) con un AINE (por ejemplo, indometacina) y/o sTNFR para tratar la enfermedad de Alzheimer.

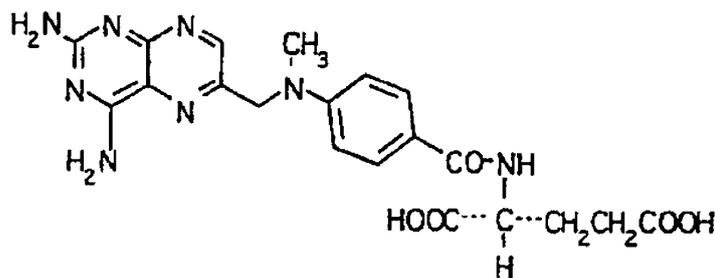
El método puede comprender la administración (por ejemplo, inyección local, subcutánea o intramuscular) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato), opcionalmente con tratamientos convencionales, para tratar la enfermedad de la articulación mandibular temporal.

El método puede comprender la administración (por ejemplo, inyección local, subcutánea o intramuscular) de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación (tratamiento previo, postratamiento y tratamiento concurrente) con osteoprotogerina (Solicitud de Patente Europea N.º 96309363,8) en el tratamiento de osteoporosis o enfermedad de Paget.

El método puede comprender la administración (por ejemplo, inyección local, subcutánea o intramuscular) de inhibidores de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra o IL-1ra Fc, opcionalmente formulado con un polímero de liberación controlada (por ejemplo, un dextrano o hialuronano), la formulación de tampón citrato o la formulación de tampón fosfato) en combinación con terapia génica (por ejemplo, usando el adenovirus humano) para modular la respuesta inflamatoria a los antígenos de vector (Zhang y col. (1997), *Arthritis & Rheumatism*, 40(9):S220 (1138)).

El resultado sorprendente e inesperado que se ha expuesto en el presente documento es la capacidad de IL-1ra y metotrexato para actuar sinérgicamente en el tratamiento de diversos síntomas asociados a enfermedades mediadas por IL-1, incluyendo estados inflamatorios agudos y crónicos. "Sinérgicamente" se usa en el presente documento para referirse a una situación donde el beneficio transmitido por la administración conjunta de un inhibidor de IL-1 (por ejemplo, un producto o productos de proteína de IL-1ra e IL-1ra) y uno o más compuestos antiinflamatorios adicionales es superior a la suma algebraica de los efectos que resultan de la administración por separado de los componentes de la combinación. Tal como se demuestra en el experimento que se expone más adelante, en un modelo de artritis adyuvante, la combinación de tratamiento de rhIL-1ra y metotrexato es sinérgica en lo que se refiere al tratamiento de inflamación sistémica (por ejemplo, esplenomegalia) y la pérdida de peso asociada con artritis reumatoide. Por lo tanto, el tratamiento de rhIL-1ra y metotrexato combinado tiene la ventaja de conseguir el mismo resultado con una dosis más baja o una administración menos frecuente de metotrexato, reduciendo así el efecto tóxico y, potencialmente, con la ventaja de una actividad persistente incluso después de que haya terminado el tratamiento.

El metotrexato es un anti-metabolito y un fármaco inmunosupresor. El metotrexato es un agente anti-inflamatorio eficaz que tiene utilidad en el tratamiento de psoriasis discapacitante y grave y artritis reumatoide (Hoffmeister (1983), *The American Journal of Medicine*, 30: 69-73 y Jaffe (1988), *Arthritis and Rheumatism*, 31: 299). El metotrexato es ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino]benzoil]-L-glutámico y tiene la fórmula estructural:



En los documentos de referencia que se citan a continuación se describe la preparación de metotrexato (Seeger y cols. (1949), *J. Am. Chem. Soc.*, 71: 1753; el metabolismo de metotrexato (Freeman (1958), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 122: 154 y Henderson y cols., (1965), *Cancer Res.* 25: 1008); la toxicidad de metotrexato (Condit y cols., (1960), *Cancer*, 13: 222-249; los modelos farmacocinéticos de metotrexato (Bischoff y cols., (1970), *J. Pharm. Sci.* 59: 149); el metabolismo y farmacocinética de metotrexato (Evans (1980), *Appl. Pharmacokinet. Williams y cols. [eds], pp. 518-548 (Appl. Ther. Inc.)*); la farmacología clínica de metotrexato (Bertino (1981), *Cancer Chemother.*, 3: 359-375 y Jolivet y cols. (1983), *N. Engl. J. Med.* 309: 1094-1104); y la experiencia clínica de metotrexato en artritis reumatoide (Weinblatt y cols. (1985), *N. Eng. J. Med.*, 312: 818-822; Furst (1985), *J. Rheumatol.*, 12(12): 1-14; Williams y cols. (1985), *Arthritis Rheum.*, 28: 721-730 y Seitz y cols. (1995), *British Journal of Rheumatology*, 34 602-609). Adicionalmente, se han publicado numerosas patentes donde se describe el agente activo metotrexato y métodos para la síntesis de metotrexato o productos intermedios potenciales en la síntesis de metotrexato: patentes de EE.UU. N.º 2.512.572; 3.892.801; 3.989.703; 4.057.549; 4.067.867; 4.079.056; 4.080.325; 4.136.101; 4.224.446; 4.306.064; 4.374.987; 4.421.913 y 4.767.859.

El mecanismo de acción de metotrexato apenas se comprende, aunque se han demostrado varias de las actividades de este fármaco que, probablemente, contribuyan a su eficiencia (Segal y cols., (1990), *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 20 190-198). Se han postulado los siguiente mecanismos de acción para metotrexato: inhibición de las rutas dependientes de foliato y metabolismo de proteína (Morgan y cols., (1987); *Arthritis and Rheumatism*, 30: 1348-1356); inhibición de desplazamiento de neutrófilos en articulaciones artríticas (Van de Kerkhof y cols., (1985), *British Journal of Dermatology*, 113: 251-255; Ternowitz y cols., (1987), *Journal of Investigative Dermatology*, 89: 192-196 and Sperling (1992), *Arthritis and Rheumatism*, 35: 376-384); actividad inhibidora de IL-6 (Segal (1991), *Arthritis and Rheumatism*, 34(2): 146-152) y el efecto anti-proliferativo específico local en células implicadas en artritis (Rodenhuis y cols. (1987), *Arthritis and Rheumatism*, 30: 369-374). Se ha demostrado que metotrexato bloquea la ruta de interleucina-1 beta/receptor de interleucina (Brody y cols., (1993), *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 31(10): 667-674); no obstante, aunque metotrexato pueda inhibir los efectos proliferativos de IL-1 y disminuir la producción de IL-1 de monocito a corto plazo en determinados pacientes, su efecto no es sostenido y no es probable que explique la eficacia a largo plazo de metotrexato (Barrera y cols., (1996), *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 25(4): 234-253).

El metotrexato puede administrarse por vía oral, intraperitoneal, subcutánea o intravenosa. Es preferible la administración oral. Lo siguiente es un ejemplo sobre el procedimiento para la administración combinada de un producto o productos de proteína IL-1ra (por ejemplo, IL-1ra) y tratamiento con metotrexato para tratar a un paciente humano. El paciente ingiere un comprimido o cápsula de metotrexato tres veces a la semana, una dosis semanal total de 5 a 50 mg/paciente/semana. Asimismo, se inyecta al paciente por vía intravenosa un producto o productos de proteína IL-1ra (por ejemplo, IL-1ra) a una dosis diaria de 50 a 150 mg. Los expertos en la materia apreciarán que las dosis aquí presentadas son dosis preferibles. La dosis de partida del compuesto que se utilice en particular se reduce cuando el paciente presente una reacción adversa, o se puede cambiar o reducir el fármaco utilizado en combinación con el compuesto o compuestos, por ejemplo, dependiendo de las diferentes formulaciones, rutas, planes de dosis y/u otras variables conocidas entre las personas especializadas en este campo, como puedan ser la tolerancia al fármaco por parte del paciente, su eficacia y su toxicidad.

Preferentemente, se trata al paciente con una dosis de partida semanal de metotrexato comprendida entre 5 mg y 7,5 mg (oral o intramuscularmente) y una dosis diaria de producto o productos de proteína IL-1ra (por ejemplo, IL-1ra) a una dosis comprendida entre 50 mg y 150 mg (por vía intravenosa). Se aumenta la dosis de metotrexato en 5 mg cada 2 a 3 semanas. Se determina el nivel de dosis máxima a un punto donde el paciente presente una mejora, que preferentemente consiste generalmente en menos de aproximadamente 25 mg de metotrexato por semana, más preferentemente entre 5 y 25 mg de metotrexato por semana. A continuación, se puede evaluar al paciente con un examen físico y un extenso análisis de laboratorio. El análisis incluye la evaluación para determinar la toxicidad. Otro control de laboratorio adicional en el caso de metotrexato incluye también preferentemente un recuento de células de la sangre completo cada 2 semanas durante los primeros 3 meses y mensualmente después. Entre las precauciones adicionales se incluyen preferentemente valoraciones mensuales de los niveles en suero de albúmina, alanina amino transferasa, bilirrubina, creatinina y nitrógeno en la urea de la sangre. También es preferible un análisis de orina mensual.

Ejemplos

Los métodos convencionales para muchos de los procedimientos que se describen en los siguientes ejemplos, o procedimientos alternativos, se encuentran en manuales muy conocidos sobre biología molecular como por ejemplo Sambrook y cols., *Molecular Cloning*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1987) y Ausabel y cols., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, Nueva York (1990). Todas las sustancias químicas fueron de calidad analítica o calidad USP.

Ejemplo 1

Se utilizó un modelo animal de artritis reumatoide inducido por un adyuvante para investigar la terapia de combinación de un inhibidor de IL-1 y metotrexato. Se canularon ratas Lewis macho (Charles River, Portage, MI) (5 por grupo) que pesaban al menos 200 g con catéteres yugulares y se les dejó que se recuperaran durante varios días. A continuación, se las colocó en jaulas para infusión y se las aclimató durante una semana antes de iniciar las inyecciones adyuvantes.

El día 0, se inyectaron a todas las ratas tratadas 100 µl de adyuvante Completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a la que se añadió adyuvante sintético, N,N-dioctildecildecil-N', N-bis(2-hidroxi-etil)-propanodiamina, 75 mg/ml. En los días 0-14 se comenzó el tratamiento con metotrexato en carboximetil celulosa al 1 % (Sigma) y se administró oralmente (0,06 mg/kg). El día 8, se administró el tratamiento con antagonista de receptor de IL-1 recombinante humano derivado de E. coli (preparado generalmente de acuerdo con las directrices de la patente de EE.UU. N.º 5.075.222, rhuIL-1ra) formulado en una composición farmacéutica (citrato sódico 10 milimolar, cloruro sódico 140 milimolar, EDTA 0,5 milimolar, polisorbato al 0,1 % (p/p) en agua, pH 6,5) por infusión IV continua (5 mg/kg/hora) a cada uno de los grupos de ratas que se estaba tratando tanto con adyuvante completo de Freund como metotrexato y a otro grupo de ratas que se estaba tratando solamente con adyuvante completo de Freund.

Se tomaron los pesos corporales el día 0 y cada día a partir del 8 día hasta la terminación el día 15. Se realizaron las medidas con calibrador y la puntuación clínica el día 8 y cada día hasta la terminación. En este momento, se determinaron los pesos del cuerpo del animal, la pata y el bazo.

- 5 Tal como se puede observar en las Figuras 2 y 3, las ratas tratadas con rhUL-1ra en solitario presentaron un 57 % de inhibición de la artritis (inflamación de la pata), no presentaron ningún beneficio significativo en esplenomegalia y presentaron un 25 % de inhibición del cambio de peso corporal. Las ratas tratadas con metotrexato tenían un 55 % de inhibición de inflamación de la pata, y no presentaron inhibición del peso del bazo y un 23 % de inhibición del cambio de peso corporal. La terapia de combinación presentó un 100 % de inhibición de la inflamación de la pata, un
10 49 % de inhibición de la esplenomegalia y 106 % de inhibición del cambio de peso corporal.

Ejemplo 2

- 15 Se canularon ratas de Lewis macho (Charles River, Portage, MI) (5-7/grupo) que pesaban al menos 200 g con catéteres yugulares y se les dejó que se recuperaran durante varios días. A continuación, se les colocó en jaulas para infusión y se les aclimató durante al menos una semana antes de iniciar las inyecciones de adyuvante.

- El día 0, se les inyectaron a las ratas 100 µl de adyuvante completo de Freund's (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al que se añadió adyuvante sintético, N,N-dioctildecildecil-N', N-bis(2-hidroxi-etil)-propanodiamina, 75 mg/ml. En los días 0-14, se comenzó el tratamiento con metotrexato en carboximetil celulosa al 1 % (Sigma) y se administró por vía oral (0,06 mg/kg). El día 8, se administró el tratamiento con rhUL-1ra formulado en una composición farmacéutica (citrato sódico 10 milimolar, cloruro sódico 140 milimolar, EDTA 0,5 milimolar, polisorbato al 0,1 % (p/p) en agua, pH 6,5) por infusión IV continua (5 mg/kg/hora). Se tomaron los pesos corporales el día 0 y cada día desde el día 8 hasta la terminación el día 15. Se realizaron las medidas con calibrador y la puntuación clínica el día 8 y
20 cada día hasta el día de la terminación. En este tiempo, se determinaron los pesos del cuerpo del animal, la pata y el bazo.

- Tal como se puede observar en las Figuras 4 y 5, las ratas tratadas con rhu IL-1ra en solitario presentaron un 22 % de inhibición de la inflamación de la pata, un 24 % de inhibición de la esplenomegalia y ninguna inhibición del cambio de peso corporal. Las ratas tratadas con metotrexato presentaron un 57 % de inhibición en la inflamación de la pata, un 22 % de inhibición de la esplenomegalia y un 59 % de inhibición del cambio de peso corporal. La combinación de rhUL-1ra y metotrexato tuvo como resultado un 90 % de inhibición de la inflamación de la pata, un 77 % de inhibición de esplenomegalia y un 65 % de inhibición del cambio de peso corporal asociado con artritis/inflamación sistémica.

35

Ejemplo 3

- Se canuló a las ratas Lewis macho (Charles River, Portage, MI) (5-7/grupo) que pesaban al menos 250-300 g en el subcutis de la parte dorsal y se les dejó que se recuperaran durante varios días. A continuación, se las colocó en jaulas para infusión y se les aclimató durante al menos 4 días antes de iniciar las inyecciones adyuvantes.

- El día 0, se les inyectaron 100 µl de adyuvante completo de Freund's (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al que se añadió adyuvante sintético N,N-dioctildecildecil-N', N-bis(2-hidroxi-etil)-propanodiamina, 75 mg/ml. En los días 0-14 se inició el tratamiento con metotrexato en carboximetil celulosa al 1% (Sigma) y se administró por vía oral (0,048, 0,06 o 0,075 mg/kg). El día 8, se comenzó el tratamiento con rhUL-1ra formulado en una composición farmacéutica (citrato sódico 10 milimolar, cloruro sódico 140 milimolar, EDTA 0,5 milimolar, polisorbato al 0,1 % (p/p) en agua, pH 6,5) por infusión subcutánea continua (5 mg/ml/hora; 0,1 ml/hora). Se tomaron los pesos corporales el día 0 y cada día a partir del día 8 hasta la terminación el día 15. Se realizaron las medidas con calibrador y la puntuación clínica el día 8 y cada día hasta la terminación. En este tiempo se determinaron los pesos del cuerpo del animal, la pata y el
45 bazo.

- La infusión subcutánea continua de rhUL-1ra a una velocidad de 5 mg/ml/hora, días 8-15 en ratas artríticas adyuvantes tuvo como resultado un 6 % de inhibición del peso de la pata final. El tratamiento de ratas artríticas adyuvantes con una dosis oral diaria de metotrexato (0,075, 0,060 o 0,048 mg/kg) en los días 0-14, tuvo como resultado 47, 27 o 0 % (respectivamente) de inhibición del peso de la pata final. El tratamiento concurrente de rhUL-1ra y metotrexato a las mismas dosis aumentó la inhibición a un peso de la pata final de 84, 44 o 21 %. Por lo tanto, se observaron ventajas clínicas estadísticamente significativas cuando las dosis de metotrexato fueron 0,075 o 0,06 mg/kg. En el caso de una terapia de combinación, la inhibición de la inflamación de la pata fue significativamente mayor que la que se dio con rhUL-1ra o metotrexato en solitario cuando la dosis de metotrexato fue 0,075 mg/kg. El análisis de la inflamación de la pata según las medidas con calibrador secuenciales de las articulaciones del tobillo revelaron una inhibición de la artritis cuando se analizaron los datos del área bajo la curva. Las ratas tratadas con rhUL-1ra en solitario presentaron un 6 % de inhibición de la inflamación, mientras que aquellas a las que se administró 0,075 mg/kg de metotrexato presentaron un 45 % de disminución del diámetro de la articulación del tobillo a lo largo del tiempo. Como contraste, las ratas a las que se les administró una terapia de combinación presentaron un 78 % de inhibición de la artritis. Estadísticamente, se observó un beneficio de combinación estadísticamente significativo en el área bajo la curva del diámetro del tobillo en las ratas a las que se les administró 0,048 pero no
55
60
65

0,06 mg/kg de metotrexato.

La evaluación histológica de las articulaciones del tobillo de las ratas tratadas con rhull-1ra demostró un 8 % de inhibición de la inflamación y un 53 % de inhibición de la resorción ósea. El tratamiento con metotrexato tuvo como resultado una inhibición significativa de respuesta a dosis de estos parámetros a 0,075 (44 % de inhibición de la inflamación y 58 % de inhibición de la resorción ósea) o 0,06 (26 % de inhibición de la inflamación y 55 % de inhibición de la resorción ósea) pero no 0,048 mg/kg (8 % de inhibición de la inflamación y 11 % de inhibición de la resorción ósea). El beneficio de la combinación fue sobre todo espectacular en las ratas a las que se les administró 0,075 mg/kg de dosis de metotrexato en combinación con rhull-1ra. En estas ratas, se inhibió la inflamación en un 85 % y disminuyó la resorción ósea en un 97 %. Estas diferencias aumentaron significativamente con respecto a las observadas en cada uno de los tratamientos en solitario para ambos parámetros. Se observaron también beneficios de la combinación similares a 0,06 mg/kg de dosis de metotrexato en combinación con rhull-1ra (44 % de inhibición de la inflamación y 84 % de inhibición de la resorción ósea) y con 0,048 mg/kg de dosis de metotrexato en combinación con rhull-1ra (23 % de inhibición de la inflamación y 68 % de inhibición de la resorción ósea).

Ejemplo 4

Se canularon ratas Lewis macho (Charles River, Portage, MI) (5-7 /grupo) que pesaban al menos 250-300 g en el subcutis de la parte dorsal y se les dejó que se recuperaran durante varios días. A continuación, se las colocó en jaulas para infusión y se las aclimató durante al menos 4 días antes de iniciar las inyecciones adyuvantes.

El día 0, se inyectaron a las ratas 100 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al que se añadió un adyuvante sintético, N,N-dioctildecildecil-N',N-bis(2-hidroxi-etil) propanadiamina, 75 mg/ml. En los días 0-14, se comenzó el tratamiento de metotrexato en carboximetil celulosa al 1 % (Sigma) y se administró por vía oral (0,048, 0,06 o 0,075 mg/kg). El día 8, se inició el tratamiento con rhull-1ra formulado en una composición farmacéutica (citrato sódico 10 milimolar, cloruro sódico 140 milimolar, EDTA 0,5 milimolar, polisorbato al 0,1 % (p/p) en agua, pH 6,5) por infusión IV continua (5 mg/kg/hora). Se tomaron los pesos del cuerpo el día 0 y cada día desde el día 8 hasta la terminación el día 15. Se realizaron las medidas con calibrador y la puntuación clínica el día 8 y cada día después hasta la terminación. En este tiempo se determinaron los pesos del cuerpo del animal, la pata y el bazo.

La infusión subcutánea continua de rhull-1ra a una velocidad de 5 mg/kg/hora, días 8-15 en ratas artríticas adyuvantes tuvo como resultado un 6% de inhibición del peso de la pata final. El tratamiento de ratas artríticas adyuvantes con dosis orales diarias de metotrexato (0,075, 0,060 o 0,048 mg/kg) los días 0-14, tuvo como resultado un 47, 27 o 0 % (respectivamente) de inhibición del peso de la pata final. El tratamiento concurrente con rhull-1ra y metotrexato a estas mismas dosis aumentó la inhibición del peso de la pata final a 84, 44 o 21 %. Por lo tanto, se observó un beneficio clínico estadísticamente significativo cuando las dosis de metotrexato fueron 0,075 o 0,06 mg/kg. En el caso de una terapia de combinación, la inhibición de la inflamación de la pata fue significativamente mayor que la que se produjo con rhull-1ra o con metotrexato en solitario cuando la dosis de metotrexato fue 0,075 mg/kg. El análisis de la inflamación de la pata según las medidas con calibrador secuenciales de las articulaciones del tobillo revelaron una inhibición de la artritis cuando se analizaron los datos como el área bajo la curva. Las ratas tratadas con rhull-1ra en solitario presentaron un 6% de inhibición de la inflamación, mientras que las ratas a las que se administró 0,075 mg/kg de metotrexato presentaron un 45% de disminución del diámetro de la articulación del tobillo a lo largo del tiempo. En contraste, las ratas a las que se les administró una terapia de combinación presentaron un 78 % de inhibición de la artritis. Se observó un beneficio de la combinación estadísticamente significativo en el área bajo la curva de inhibición del diámetro del tobillo en las ratas a las que se les había administrado 0,048, pero no 0,06 mg/kg, de metotrexato.

La evaluación histológica de las articulaciones del tobillo a partir de las ratas tratadas con rhull-1ra demostró un 8 % de la inhibición y un 53 % de la inhibición de la resorción ósea. El tratamiento con metotrexato tuvo como resultado una significativa inhibición como respuesta a dosis de estos parámetros a 0,075 (44 % de inhibición de la inflamación y 58 % de inhibición de la resorción ósea) o 0,06 (26 % de inhibición de la inflamación y 55 % de inhibición de la resorción ósea) pero no 0,048 mg/kg (8 % de inhibición de la inflamación y 11 % de la inhibición de la resorción ósea). El beneficio de la combinación fue sobre todo sorprendente en las ratas a las que se les administró 0,075 mg/kg de dosis de metotrexato en combinación con rhull-1ra. En estas ratas, se inhibió la inflamación en un 85% y la resorción ósea disminuyó en un 97 %. Estas diferencias aumentaron significativamente con respecto a las observadas con cada uno de los tratamientos por separado para ambos parámetros. Se observó un beneficio de la combinación similar a una dosis de 0,06 mg/kg de metotrexato en combinación con rhull-1ra (44 % de inhibición de la inflamación y 84 % de inhibición de la resorción ósea) y con 0,048 mg/kg de dosis de metotrexato en combinación con rhull-1ra (23 % de inhibición de la inflamación y 68 % de inhibición de la resorción ósea).

Ejemplo 4

Materiales: interferón consenso (r-metIFN-con₁) se generó un interferón sintético sustancialmente de acuerdo con las enseñanzas de la Patente de Estados Unidos 4.695.623.

Métodos: Se inmunizaron cobayas de cepa 13 hembras (175-200 g) con 0,5 ml de una emulsión que contenía 12 g de cerebro y espina (cobaya) en 24 ml de solución salina tamponada con fosfato, 24 ml de adyuvante de Freund completo que contenía 2,5 mg/ml M. Tuberculosis H37Ra. La emulsión se inyectó intradérmicamente (4-5 sitios) en la región del cuello de las cobayas. Todas las inyecciones de r-metIFN-con₁, vehículo o rhIL-1ra se dieron subcutáneamente.

La evaluación de la enfermedad clínica se basó en un sistema convencional de puntuación 0-5 y se llevó a cabo cada día durante un periodo de 14 días. El espectro de la puntuación fue: 0, normal; 1: debilidad de las extremidades posteriores; 2, paresia en 2 extremidades posteriores o parálisis en una extremidad posterior; 3, parálisis en ambas extremidades posteriores; 4, moribunda y 5 muerte. Las cobayas que sobrevivieron se sacrificaron el día 14, y su médula espinal y su cerebro se retiraron para la examinación histológica.

La puntuación clínica integrada para cada cobaya durante el transcurso entero de la enfermedad se calculó como el área bajo la curva de las puntuaciones clínicas diarias frente al tiempo (unidades arbitrarias). Los valores de los grupos tratados se compararon estadísticamente frente a aquellos del grupo control vehículo usando la prueba de Mann-Whitney.

Resultados: rhIL-1ra a 100 mg/kg o 10 mg/kg s.c. 3x un día empezando el día 0 atenuó los síntomas clínicos un 53 % y un 49 % respectivamente (Figura 6). En el mismo estudio r-metIFN-con₁ dado cada día empezando el día 0 atenuó los síntomas clínicos un 30 % (Figura 6). La combinación de rhIL-1ra (100 mg/kg s.c.) + r-metIFN-con₁ (0,03 mg/kg s.c.) o rhIL-1ra (10 mg/kg s.c.) + r-metIFN-con_{1n} (0,03 mg/kg s.c.) atenuó los síntomas clínicos un 73 % y un 84 % respectivamente (Figura 7). Adicionalmente, la combinación mejoró significativamente la ganancia de peso en estos animales en comparación con los animales tratados con vehículo (Figura 8).

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amgen Inc.

<120> Terapia de Combinación Usando un Inhibidor de IL-1 para Tratar Enfermedades Mediadas por IL-1

<130> EP17035I

<140> Aún no asignado

<141> 25-08-2008

<150> EP97954087.9

<151> 08-12-1997

<150> 60/032.790

<151> 06-12-1996

<150> 60/036.353

<151> 23-01-1997

<150> 60/039.311

<151> 07-02-1997

<150> 60/052.025

<151> 09-07-1997

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 462

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(462)

<223> ADNc

<400> 1

ES 2 615 357 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | cga | ccc | tct | ggg | aga | aaa | tcc | agc | aag | atg | caa | gcc | ttc | aga | atc | 48 |
| Met | Arg | Pro | Ser | Gly | Arg | Lys | Ser | Ser | Lys | Met | Gln | Ala | Phe | Arg | Ile | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| tg | gat | g | aac | cag | aag | acc | ttc | tat | ctg | agg | aac | aac | caa | cta | g | 96 |
| Trp | Asp | Val | Asn | Gln | Lys | Thr | Phe | Tyr | Leu | Arg | Asn | Asn | Gln | Leu | Val | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| gct | gga | tac | ttg | caa | gga | cca | aat | gtc | aat | tta | gaa | gaa | aag | ata | gat | 144 |
| Ala | Gly | Tyr | Leu | Gln | Gly | Pro | Asn | Val | Asn | Leu | Glu | Glu | Lys | Ile | Asp | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| gtg | gta | ccc | att | gag | cct | cat | gct | ctg | ttc | ttg | gga | atc | cat | gga | ggg | 192 |
| Val | Val | Pro | Ile | Glu | Pro | His | Ala | Leu | Phe | Leu | Gly | Ile | His | Gly | Gly | |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| aag | atg | tgc | ctg | tcc | tgt | gtc | aag | tct | ggt | gat | gag | acc | aga | ctc | cag | 240 |
| Lys | Met | Cys | Leu | Ser | Cys | Val | Lys | Ser | Gly | Asp | Glu | Thr | Arg | Leu | Gln | |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| ctg | gag | gca | g | aac | atc | act | gac | ctg | agc | gag | aac | aga | aag | cag | gac | 288 |
| Leu | Glu | Ala | Val | Asn | Ile | Thr | Asp | Leu | Ser | Glu | Asn | Arg | Lys | Gln | Asp | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| aag | cgc | ttc | gcc | ttc | atc | cgc | tca | gac | agt | ggc | ccc | acc | acc | agt | ttt | 336 |
| Lys | Arg | Phe | Ala | Phe | Ile | Arg | Ser | Asp | Ser | Gly | Pro | Thr | Thr | Ser | Phe | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | | |
| gag | tct | gcc | gcc | tgc | ccc | ggt | tg | ttc | ctc | tgc | aca | gcg | atg | gaa | gct | 384 |
| Glu | Ser | Ala | Ala | Cys | Pro | Gly | Trp | Phe | Leu | Cys | Thr | Ala | Met | Glu | Ala | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| gac | cag | ccc | gtc | agc | ctc | acc | aat | atg | cct | gac | gaa | ggc | gtc | atg | gtc | 432 |
| Asp | Gln | Pro | Val | Ser | Leu | Thr | Asn | Met | Pro | Asp | Glu | Gly | Val | Met | Val | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| acc | aaa | ttc | tac | ttc | cag | gag | gac | gag | tag | | | | | | | 462 |
| Thr | Lys | Phe | Tyr | Phe | Gln | Glu | Asp | Glu | | | | | | | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | | | | | | | |

<210> 2
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 615 357 T3

Met Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile
 1 5 10 15
 Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val
 20 25 30
 Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp
 35 40 45
 Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly
 50 55 60
 Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln
 65 70 75 80
 Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp
 85 90 95
 Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe
 100 105 110
 Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala
 115 120 125
 Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val
 130 135 140
 Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
 145 150

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de cantidades terapéuticamente eficaces de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 y un fármaco antiinflamatorio adicional para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria aguda o crónica, donde dicho anticuerpo monoclonal anti-IL-1 y al menos un compuesto antiinflamatorio adicional se preparan para la administración separada o combinada, donde el compuesto antiinflamatorio es metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino]benzoil]-L-glutámico).
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, donde dicha enfermedad antiinflamatoria es una enfermedad inflamatoria de una articulación, preferentemente, dicha enfermedad inflamatoria de una articulación es artritis reumatoide.
- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 y al menos un compuesto antiinflamatorio adicional, donde el al menos un compuesto antiinflamatorio adicional es metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metilamino]benzoil]-L-glutámico).
- 20 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, donde dicho metotrexato está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 25 mg.
- 25 5. Uso de un compuesto antiinflamatorio, distinto de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1, en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad aguda o crónica en un mamífero en combinación con la administración de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1, donde el compuesto antiinflamatorio es metotrexato.
- 30 6. El uso de 5 donde la cantidad de metotrexato en el medicamento es hasta aproximadamente 25 mg.
- 35 7. Uso de un anticuerpo monoclonal anti-IL-1 en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria aguda o crónica en un mamífero en combinación con la administración de un compuesto antiinflamatorio adicional, donde el compuesto antiinflamatorio es metotrexato.
8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde el anticuerpo monoclonal anti-IL-1 en el medicamento está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 200 mg.
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde dicho metotrexato se prepara para la administración oral.

FIG. 1

```

5' ATGCGACCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
M2 R P S G R K S S K M Q A F R I W D V N 60
CAGAAGACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCTGGATACTTGCAAGGACCAAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
Q K T F Y L R N N Q L V A G Y L Q G P N 120
GTCAATTTAGAAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
V N L E E K I D V V P I E P H A L F L G 180
ATCCATGGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGACCAGACTCCAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
I H G G K M C L S C V K S G D E T R L Q 240
CTGGAGGCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
L E A V N I T D L S E N R K Q D K R F A 300
TTCATCCGCTCAGACAGTGGCCCCACCACCAGTTTGTAGTCTGCCGCCTGCCCCGGTTGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
F I R S D S G P T T S F E S A A C P G W 360
TTCCTCTGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
F L C T A M E A D Q P V S L T N M P D E 420
GGCGTCATGGTCACCAAATCTACTTCCAGGAGGACGAGTAG 3'
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
G V M V T K F Y F Q E D E * 462

```

FIG. 2

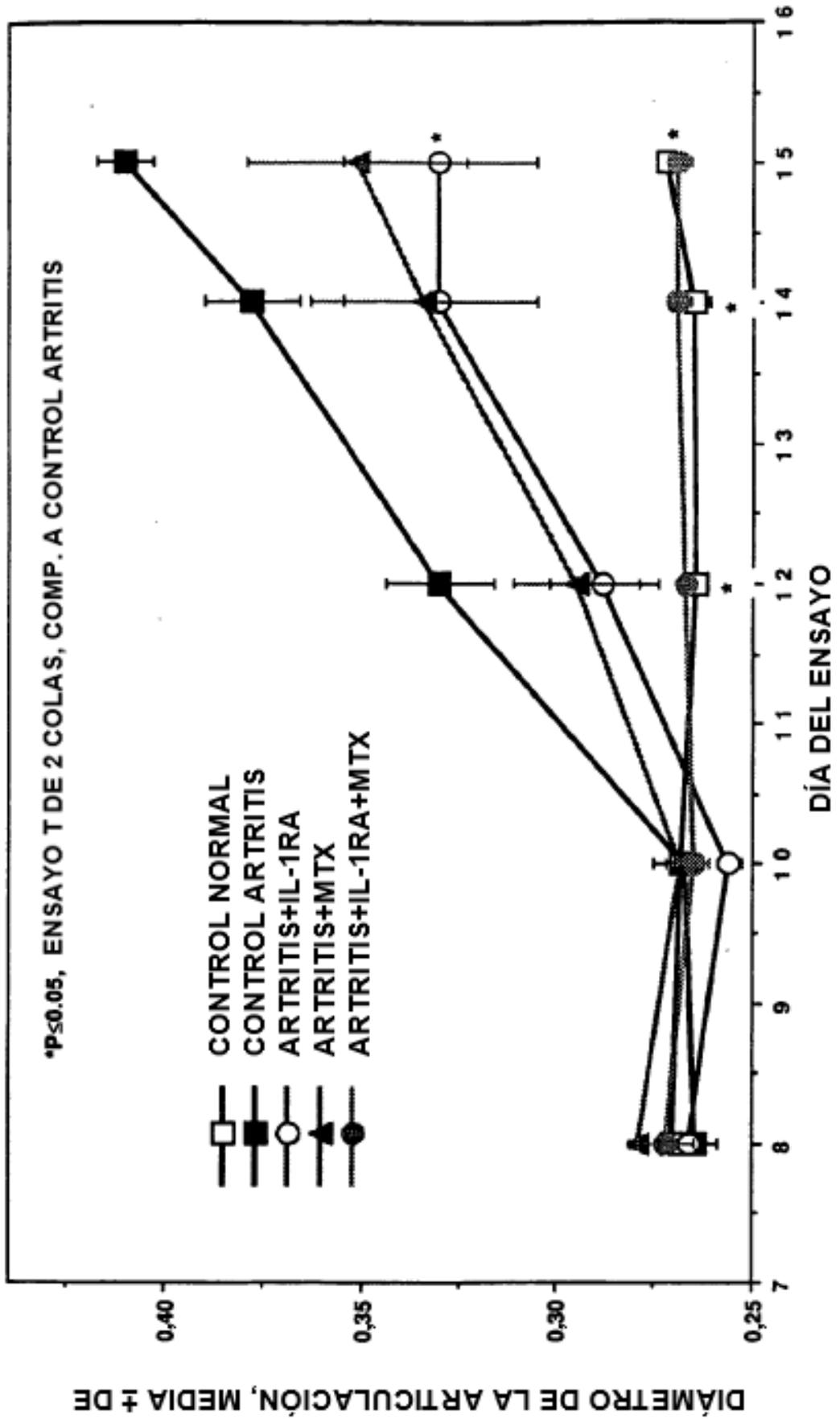


FIG. 3

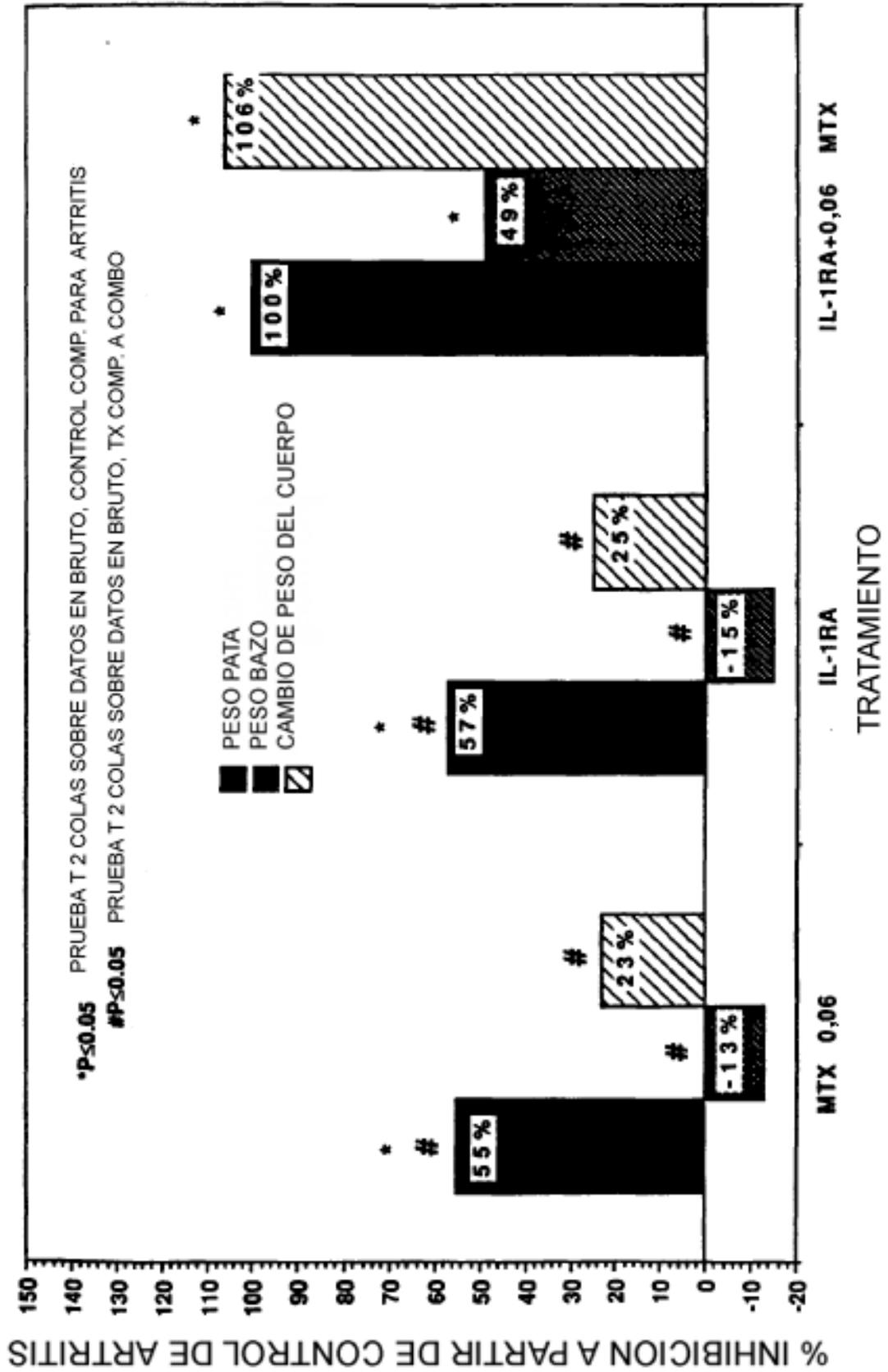


FIG. 4

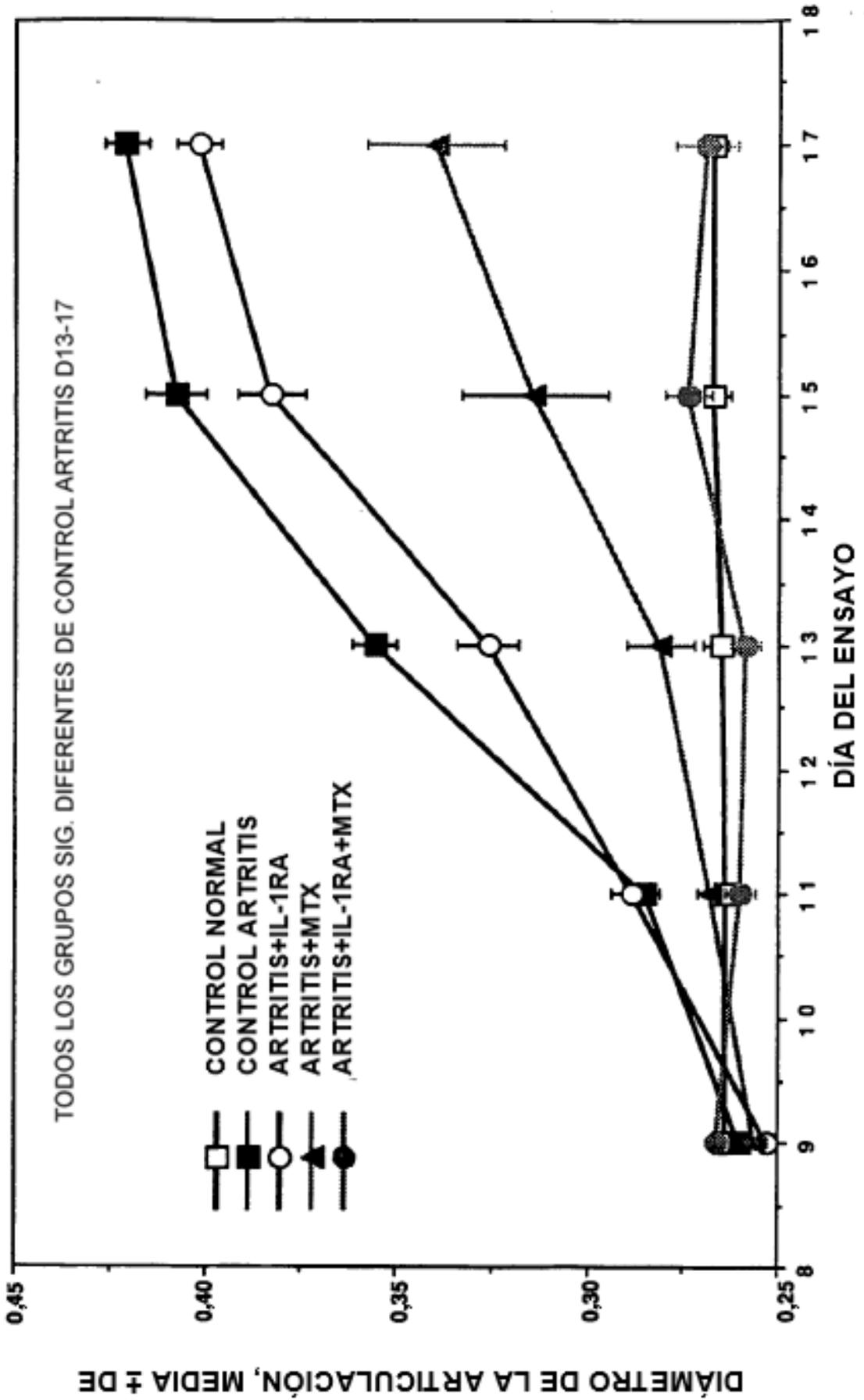


FIG. 5

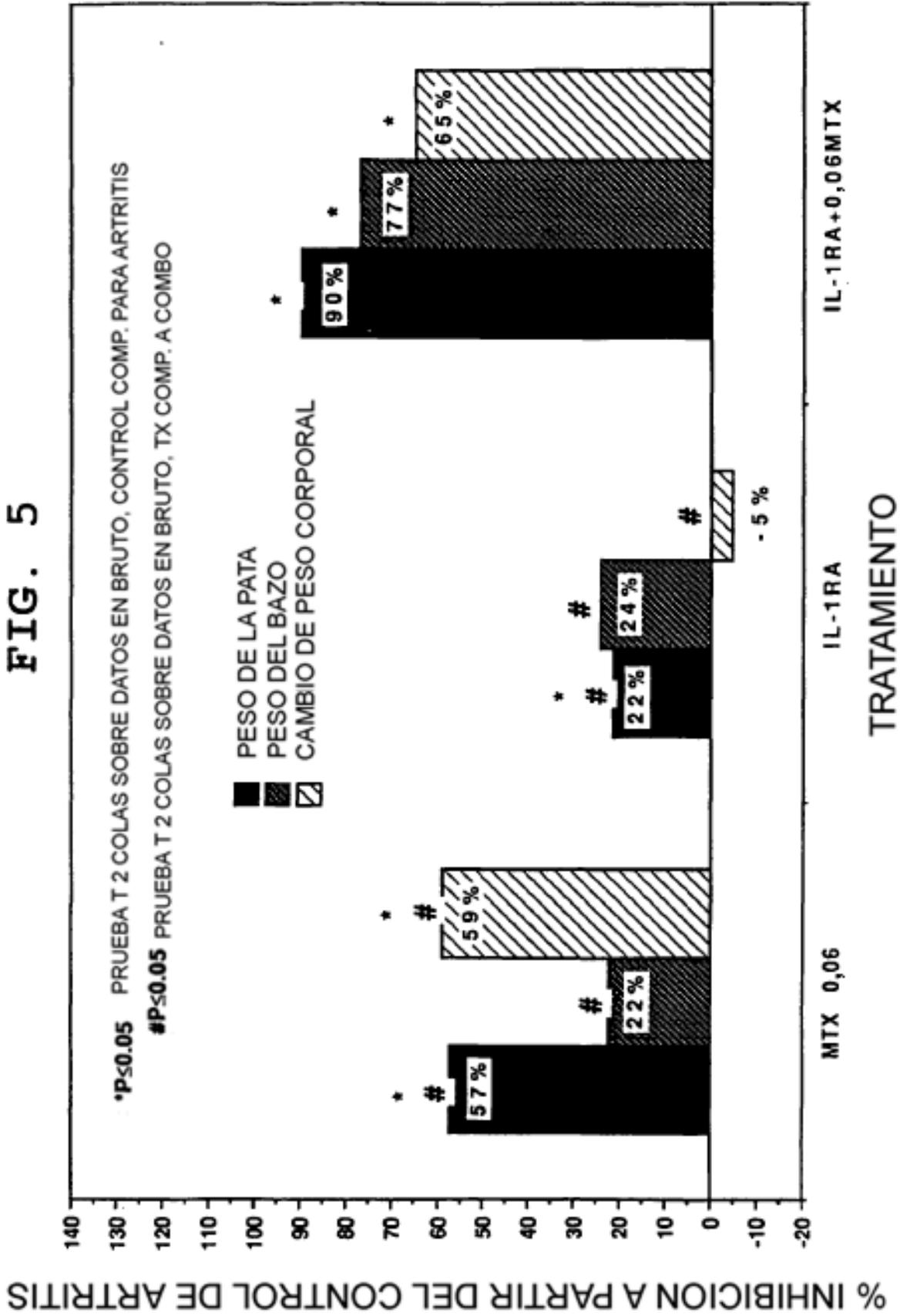


FIG. 6

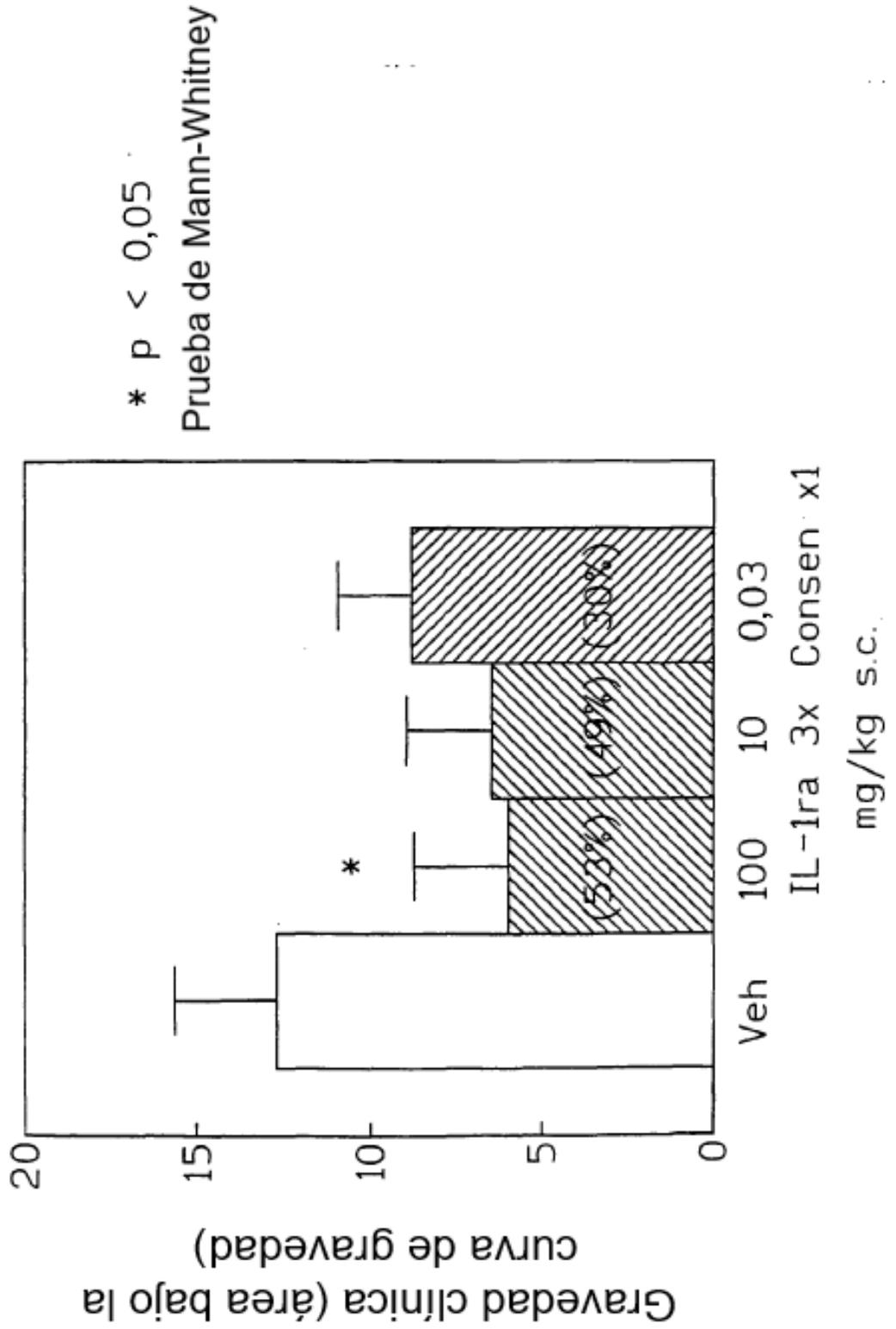


FIG. 7

