



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 435**

51 Int. Cl.:
G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05812529 .5**

96 Fecha de presentación : **30.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1817589**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **Un marcador biológico para la inflamación.**

30 Prioridad: **02.12.2004 US 632198 P**
03.03.2005 US 657718 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.10.2009

73 Titular/es: **Can-Fite Biopharma Ltd.**
10 Barket Street, P.O. Box 7537
Petach Tikva 49170, IL

72 Inventor/es: **Fishman, Prina;**
Bar-Yehuda, Sara y
Madi, Lea

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 327 435 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

Un marcador biológico para la inflamación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la diagnosis y eficacia de la determinación de tratamiento de inflamación y en particular al uso de marcadores biológicos asociados a estados inflamatorios.

10 **Técnica anterior**

La siguiente es una lista de la técnica anterior que se considera que es pertinente para la descripción del estado de la técnica en el campo de la invención. El reconocimiento de estas referencias en el presente documento se realizará a veces mediante la indicación de su número entre paréntesis de la lista dada a continuación.

- 15 1. **Fishman P, Madi L, Bar-Yehuda S, Barer F, Del Valle L, Khalili K.** Evidence for involvement of Wnt signaling pathway in IB-MECA mediated suppression of melanoma cells. *Oncogene.*, 21: 4060-4064 (2002).
- 20 2. **Fishman P, Bar-Yehuda S, Rath-Wolfson L, Ardon E, Barrer F, Ochaion A, Madi L.** Targeting the A3 adenosine receptor for cancer therapy: inhibition of Prostate carcinoma cell growth by A₃AR agonist. *Anticancer Res.*, 23: 2077-2083 (2003).
- 25 3. **Madi L, Bar-Yehuda S, Barer F, Ardon E, Ochaion A, Fishman P.** A3 adenosine receptor activation in melanoma cells: association between receptor fate and tumor growth inhibition. *J. Bio. Chem.*, 278: 42121-42130 (2003).
- 30 4. **Ohana G, Bar-Yehuda S, Arich A, Madi L, Dreznick Z, Silberman D, Slosman G, Volfsson-Rath L, Fishman P.** Inhibition of primary colon carcinoma growth and liver metastasis by the A3 adenosine receptor agonist IB-MECA. *British J. Cancer.*, 89: 1552-1558 (2003).
- 35 5. **Fishman P, Bar-Yehuda S, Ohana G, Ochaion A, Engelberg A, Barer F, Madi L.** An agonist to the A3 adenosine receptor inhibits colon carcinoma growth in mice via modulation of GSK-3 and NF- κ B. *Oncogene*, 23: 2465-2471 (2004).
6. Solicitud de patente de Estados Unidos N° 20040167094A1.
7. **Szabo, C., et al.** Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)- 1 α production and collagen- induced arthritis by adenosine receptor agonists. *British J. Pharmacology*, 125: 379-387 (1998).
- 40 8. **Mabley, J., et al.** The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)- adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. *Europ. J. Pharmacology*, 466: 323-329 (2003).
9. **Baharav, E., et al.** The effect of adenosine and the A3 adenosine receptor agonist IB-MECA on joint inflamación and autoimmune diseases models. *Inter. J. Mol. Med.* 10 (suplemento 1) página S104, resumen 499 (2002).
- 45 10. Solicitud PCT, publicación N° WO2005/0063246, titulada "Method for Treatment of Multiple Sclerosis".
11. **Montesinos, M. Carmen, et al.** Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflamación by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis & Rheumatism*, 48: 240-247 (2003).
- 50 12. **Madi L, Ochaion A, Rath-Wolfson L, Bar-Yehuda S, Erlanger A, Ohana G, Harish A, Merimski O, Barer F, Fishman P.** The A3 Adenosine Receptor is Highly Expressed in Tumor vs. Normal Cells: Potential Target for Tumor Growth Inhibition. *Clinical Cancer Research*, 10: 4472-4479, 2004.
- 55 13. Solicitud de patente de Estados Unidos, publicación N° 20040137477 A1, titulada "A₃AR as a marker for a diseased state".
14. **Gessi, S. et al.** Elevated expression of A3 adenosine receptors in human colorectal cancer is reflected in peripheral blood cells *Clinical Cancer Research* 10: 5895-5901, 2004.
- 60

Antecedente de la invención

65 El receptor de adenosina A3, un receptor de la superficie celular asociado a la proteína G_i, se propuso como una diana para combatir cáncer e inflamación. El receptor se expresa en gran medida en diversos tipos de células tumorales mientras la expresión en tejidos normales adyacentes es relativamente baja. La activación del receptor por un agonista sintético específico induce la modulación de las rutas de la transducción de señal cadena abajo que incluyen el Wnt y el NF- κ B, dando como resultado inhibición del crecimiento tumoral (1-5).

Los estudios *in vivo* han mostrado que los agonistas A₃AR inhiben el desarrollo de carcinomas de colon, próstata y de páncreas así como melanoma y hepatoma. Los agonistas de A₃AR también se ha mostrado que actúan como agentes antiinflamatorios mediante la mejora del proceso inflamatorio en diferentes modelos autoinmunes experimentales tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y esclerosis múltiple (6-10). Se propuso también que los receptores A_{2A} y A₃ receptores median los efectos antiinflamatorios de metotrexato (11).

Los niveles de expresión del receptor de adenosina A₃ (A₃AR) están elevados en células de cáncer cuando se compara con las células normales (12). De este modo, el nivel de expresión de A₃AR se ha descrito como un medio para la diagnosis de cáncer (13).

Además, los niveles de expresión de A₃AR también se han descrito que están elevados en las células de sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal (14).

Descripción general de la invención

Un objeto de la divulgación es proporcionar un procedimiento para determinar un estado inflamatorio en un sujeto.

Otro objeto de la divulgación es proporcionar un procedimiento para determinar la gravedad de un estado inflamatorio en un sujeto.

Un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para determinar la eficacia de un tratamiento terapéutico antiinflamatorio de un sujeto.

Es un objeto adicional de la invención proporcionar un procedimiento para seleccionar sujetos para recibir un tratamiento terapéutico antiinflamatorio.

La presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que existe un incremento en el nivel de expresión del receptor de adenosina A₃ en los WBC de un sujeto que tiene una afección inflamatoria cuando se compara con los WBC de un sujeto sano. Además, se encontró que en los sujetos que responden a un tratamiento de fármacos antiinflamatorio existe una reducción en el nivel de expresión del receptor de adenosina A en sus WBC. Este hallazgo allana el camino para el uso del nivel de expresión del receptor de adenosina A₃ como un medio para diagnosis de un estado inflamatorio, así como otras aplicaciones descritas más adelante.

En un primer aspecto se proporciona un procedimiento de determinación de un estado inflamatorio en un sujeto que comprende determinar el nivel de expresión del receptor de adenosina A₃ (A₃AR) en los glóbulos blancos (WBC), por ejemplo, WBC circulantes, del sujeto. Un alto nivel de expresión de A₃AR es indicativo de un estado inflamatorio en el sujeto.

La muestra que comprende WBC puede ser una fracción sanguínea que contiene WBC. A veces, se puede desear usar una fracción que incluye una población específica de WBC tales como células mononucleares (MNC), subpoblaciones de MNC-monocitos o linfocitos, o una subpoblación de linfocitos, por ejemplo, células T, células B o sus subpoblaciones. Una muestra que comprende WBC también se puede a veces obtener a partir del sistema linfático, por ejemplo, a partir de ganglios linfáticos.

La determinación del nivel de expresión se puede llevar a cabo mediante la determinación del nivel de ARNm de A₃AR así como el nivel de la proteína de A₃AR. El término "nivel de expresión" como se usa en el presente documento de este modo incluye el ARNm de A₃AR así como el nivel de proteína de A₃AR o fragmentos de proteína de A₃AR en las células muestreadas.

Se encontró que la medicación puede influenciar el nivel de expresión de A₃AR. De este modo, la historia de la enfermedad pasada que incluye tratamiento anterior o actual, puede influenciar el nivel de expresión de A₃AR y puede necesitar tenerse en cuenta en el comportamiento de los procedimientos de la invención.

En un segundo aspecto, se proporciona un procedimiento para determinar la gravedad de un estado inflamatorio en un sujeto que comprende la determinación del nivel de expresión de A₃AR en WBC del sujeto; y comparando el nivel de expresión de A₃AR en las células con el nivel de patrones determinados anteriormente que correlacionan el nivel de expresión de A₃AR con la gravedad de la infección. Los patrones determinados anteriormente pueden comprender, por ejemplo, un conjunto de valores, que pueden ser una lista de valores discretos o una curva continua, que correlaciona los resultados con una medición de la gravedad de la inflamación; o puede ser un conjunto de descriptores, tal como una lista cuantitativa de posibles resultados y sus significados con respecto a la gravedad de la inflamación, por ejemplo, si el resultado se manifiesta como una reacción de color, los descriptores pueden enumerar el intervalo de resultados de color o intensidades de color y su significado con respecto a la gravedad de inflamación; o puede incluir representaciones gráficas o pictóricas de los resultados de ensayo esperados para las diferentes gravedades de inflamación o diferentes estados inflamatorios; o un conjunto de patrones de referencia, que se pueden llevar a cabo en paralelo con la muestra para la calibración y evaluación de los datos. Los patrones se pueden obtener de manera típica mediante el ensayo de nivel de expresión de A₃AR en una diversidad de muestras a partir de cada número de estados patológicos inflamatorios para obtener una medida estadística sobre la correlación entre el nivel de expresión y el estado patológico. La clasificación de los estados patológicos puede ser por ejemplo binaria: inflamación ligera e

inflamación grave. La clasificación también puede incluir una diversidad de estados diferentes, tal como, por ejemplo, inflamación ligera, moderada o grave. La clasificación también se puede realizar mediante el uso de un valor numérico, de acuerdo con el nivel de expresión, por ejemplo, un número entre 1 y 10, para la inflamación ligera a grave, etc. Como se apreciará, puede haber muchos tipos de clasificaciones y la invención no se limita a tipos específicos de clasificaciones.

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para determinar la eficacia de un tratamiento terapéutico antiinflamatorio de un sujeto, al que se ha administrado agonista de A₃AR. El tratamiento puede ser una monoterapia con un A₃AR o una terapia de combinación de A₃AR con otro fármaco, tal como una combinación de un A₃AR con metotrexato. El procedimiento comprende la determinación del nivel de expresión de A₃AR en los WBC del sujeto en dos o más momentos sucesivos, al menos uno de los cuales es durante un tratamiento antiinflamatorio, en el que una diferencia en el nivel es indicativo de la eficacia del tratamiento de fármaco. Los momentos sucesivos pueden, por ejemplo ser uno o más de antes de un tratamiento antiinflamatorio y uno o más durante el tratamiento, uno o más tomados durante el tratamiento y uno o más tomados durante el cese del tratamiento.

El nivel de expresión de A₃AR en WBC de acuerdo con algunas realizaciones de la invención se puede usar para determinar el estado de la gravedad de la inflamación, por ejemplo, para determinar la presencia o la ausencia de un estado inflamatorio. El nivel de expresión de A₃AR se puede usar para la determinación cuantitativa del grado de gravedad del estado inflamatorio. De este modo, el término “determinar” o “determinación” como se usa en el presente documento abarca la determinación tanto cuantitativa como cualitativa.

Un “estado inflamatorio” incluye cualquier estado de inflamación activa o subclínica. Mediante una realización preferida la invención se usa para determinar un estado inflamatorio en sujetos que padecen una enfermedad inflamatoria autoinmune. La inflamación se puede deber a una enfermedad inflamatoria, o puede ser un efecto secundario de algún otro tipo de enfermedad o trastorno. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias incluyen pero no se limitan a enfermedades inflamatorias del intestino, corpúsculo inflamatorio, hiperplasia fibrosa inflamatoria, enfermedad inflamatoria de la vesícula biliar, hiperplasia papilar inflamatoria y enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes pueden incluir cualquiera de los siguientes: artritis reumatoide, Miastenia grave (MG), miastenia grave congénita, esclerosis múltiple (MS), síndrome del hombre rígido, paraparesia espástica topical, encefalitis de Rasmussen, neuropatía axonal motora aguda, neuropatía axonal motora sensorial aguda, neuritis de los ganglios de la raíz dorsal, neuropatía pan autonómica aguda, neuritis braquial, leucoencefalitis hemorrágica necrotizante aguda, mielopatía necrotizante esporádica, degeneración cerebral paraneoplásica síndrome de Guillain-Barre, encefalitis límbica, ataxia Opsoclonus-mioclonus, neuronitis sensorial, neuropatía autonómica, neuropatía desmielizante, complejo SIDA-demenia, síndrome de Tourette, síndrome de Miller-Fisher, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis después del parto, tiroiditis Focal, tiroiditis juvenil, hipotiroidismo idiopático, diabetes mellitus de tipo I Type I (insulina dependiente), enfermedad de Addison, Hipofisitis, diabetes insípida autoinmune, Hipoparatiroidismo, Pénfigo vulgar, Pénfigo foliáceo, “Penfigoide buloso” gestaciones pengifoideas, pengifoide cicatrizal, Dermatitis herpetiformis, adquirida epidérmica bullosa, Eritema multiforme, Herpes gestatonis, Vitiligo, urticaria crónica, lupus discoide, alopecia universal/areata, Psoriasis, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica, síndrome de solapamiento de hepatitis activa crónica/cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Evans, trombocitopenia inducida por heparina, neutropenia autoinmune primaria, neutropenia autoinmune (primaria) de infancia, neutropenia autoinmune después de trasplante de médula ósea, hemofilia autoinmune adquirida, gastritis autoinmune y anemia pernicioso, enfermedad celíaca, Enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, Sialadenitis, fallo de ovario autoinmune prematuro, Azoospermia, Hipogonadismo, infertilidad masculina asociada a anticuerpos de esperma, orquitis autoinmune, fallos de ovario prematuro, ooforitis autoinmune, Uveitis, Retinitis, oftalmia simpática, retinocoroidiopatía de Birdshot, uveitis granulomatosa de Vogt-Koyanagi-Harada, degeneración de la retina, uveitis inducida por lentes, neuritis óptica, pérdida auditiva sensorineural autoinmune, enfermedad de Meniere, miocarditis autoinmune, bloqueo cardíaco congénito (lupus neonatal), enfermedad de Chagas, cardiotoxicidad por adriamicina, síndrome de miocarditis de Dressler, asma bronquial, enfermedad pulmonar intersticial fibrosa, glomerulonefritis de progresión rápida, nefritis autoinmune tubulointersticial, lupus sistémico eritematoso (SLE), síndrome antifosfolípídico, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, síndrome de Felty, Large granular linfocitosis granular mayor (LGL), síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica (escleroderma), síndrome de Crest, enfermedad del tejido conectivo mixto, Polimiositis/dermatomiositis, enfermedad de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss, púrpura de Henoch-Schonlein, Microscopio poliangiatis microscópica, Periarteritis nodosa, síndrome de Bechet, aterosclerosis, artritis temporal de células (gigantes), espondilitis anquilosante, poliendocrinopatía autoinmune, distrofia por candidiasis ectodérmica, vasculitis crioglobulémica esencial, angitis cutánea crioglobulénica, enfermedad de Lyme, fiebre cardíaca y enfermedad reumática, fasciitis eosinófila, hemoglobinuria paroxística por frío, polimialgia reumática, fibromialgia, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, cambios en la piel y manchas M, Policondritis recurrente, síndrome autoinmune linfoproliferativo, síndrome de TINU (nefritis tubulointersticial aguda y uveitis), Inmunodeficiencia variable común, deficiencia en TAP (transportador asociado a la presentación de antígeno), síndrome de Omenn, síndrome de HyperIgM, agammaglobulinemia de BTK, virus de inmunodeficiencia humana y después de trasplante de médula ósea.

La muestra que comprende WBC usada en los procedimientos puede incluir cualquiera de los tipos de células conocidas que completan este grupo. En particular, la muestra debe preferiblemente incluir células mononucleares (monocitos y/o linfocitos). A veces, la muestra puede incluir además, o como alternativa, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos o basófilos).

ES 2 327 435 T3

Se emplea un alto nivel de expresión de A_3AR como un indicador de un estado inflamatorio en el sujeto. El término “alto nivel” se ha de entender como un significado de un nivel de expresión significativamente mayor en células normales. Por ejemplo, el nivel de expresión de A_3AR en los WBC se puede comparar con un nivel de control, siendo el nivel de control coel nivel de expresión de A_3AR en los WBC normales de un sujeto. A veces puede ser útil
5 determinar el nivel de expresión mediante el ensayo de una muestra de prueba de un individuo en paralelo con uno o más patrones de referencia, por ejemplo, un indicador patrón de referencia de un estado normal y otro indicador de un estado inflamatorio; o un patrón de referencia indicador de un estado normal y dos o más estados patológicos diferentes.

10 El nivel de expresión determinado se compara con los patrones. Los patrones se pueden basar en los niveles determinados previamente de los individuos sanos y de individuos con un estado inflamatorio o con diferentes estados inflamatorios. Los patrones se pueden proporcionar, por ejemplo, en la forma de valores numéricos discretos o, en el caso del procedimiento de ensayo es colorimétrico, en la forma de una carta con diferentes colores o sombras para los estados sanos e inflamatorios; o se pueden proporcionar en la forma de una curva comparativa preparada en la base de
15 tales patrones.

Tales patrones se pueden preparar determinando el nivel de expresión de A_3AR (que puede ser el nivel de proteína de A_3AR , fragmento de proteína, o nivel de ARNm etc., como se ha descrito anteriormente) presente en los WBC obtenidos a partir de una diversidad de una diversidad de pacientes diagnosticados positivamente (mediante otros
20 medios, por ejemplo mediante un médico, mediante técnicas histológicas etc.) por tener inflamación a niveles variables de gravedad. La gravedad de la enfermedad para la preparación de los patrones también se puede determinar mediante diversos procedimientos convencionales tales como técnicas patológicas. El ensayo se lleva a cabo en paralelo con un número de patrones de sujetos sanos y sujetos de diferentes estados inflamatorios y se compara después con tales patrones el nivel determinado en la muestra ensayada.

25 Por ejemplo, un nivel de contenido de proteína de entre X_1 y X_2 por 1.000.000 de células se puede definir por ser indicativo del grado 1 de inflamación, un mayor contenido de proteína de Y_1 a Y_2 por 1.000.000 de células se puede definir por ser indicativo del grado 2 de inflamación, etc. Después que se han preparado tales patrones, es posible comparar el nivel de la expresión de A_3AR obtenido de un individuo específico con el correspondiente valor específico de los patrones, y de este modo obtener la valoración de la gravedad de la enfermedad.
30

La eficacia de un tratamiento terapéutico antiinflamatorio de un sujeto se puede determinar tomando muestras de WBC at en diversos momentos antes, durante y después del tratamiento. Por ejemplo, se puede tomar una primera muestra en un momento antes del inicio del tratamiento y se puede tomar una segunda muestra en un momento durante
35 el tratamiento. Una disminución en el nivel de de la expresión de A_3AR en la segunda muestra cuando se compara con la primera muestra sería indicativa que el tratamiento es eficaz. El grado de disminución puede ser indicativo del grado de eficacia del tratamiento, es decir, la correlación sería cuantitativa.

40 En otro ejemplo, se puede tomar una primera muestra durante el tratamiento y se puede tomar una segunda muestra en un momento durante el tratamiento posterior al momento de la primera muestra. Una disminución en el nivel de la expresión de A_3AR en la segunda muestra cuando se compara con la primera muestra sería indicativa que el tratamiento es eficaz.

45 En un tercer ejemplo, se puede tomar una primera muestra durante el tratamiento y se puede tomar una segunda muestra en un momento después que se haya discontinuado el tratamiento. En este caso, un incremento en el nivel de la expresión de A_3AR en la segunda muestra cuando se compara con la primera muestra sería indicativa que el tratamiento es eficaz.

50 De hecho, se pueden llevar a cabo diversas otras combinaciones, así como la toma de muestras en más de dos momentos.

La invención también proporciona un procedimiento para seleccionar sujeto que padece una cierta enfermedad inflamatoria, para recibir tratamiento terapéutico antiinflamatorio que comprende la administración al sujeto de un agonista del receptor de adenosina A_3 (A_3AR), comprendiendo el procedimiento la determinación del nivel de expresión de A_3AR en una muestra de PBMNC tomada del sujeto y seleccionar el sujeto para recibir dicho tratamiento terapéutico antiinflamatorio si dicho nivel está por encima del nivel predeterminado. Dicho nivel predeterminado puede ser un cierto nivel umbral para todos los sujetos. Dicho nivel predeterminado también puede ser un intervalo de niveles para diferentes grupos de pacientes, por ejemplo: para grupos de edad diferente; para diferentes estados patológicos; para diferentes historias patológicas-historias de medicación pasada (por ejemplo, se encontró que el metotrexato induce
60 un incremento A_3AR) número de años que tiene la enfermedad etc. Dicho nivel predeterminado se puede determinar mediante estudios clínicos que buscan la correlación entre la expresión del receptor y una respuesta del fármaco de acuerdo con uno de los criterios de respuesta aceptables, tal como ACR20, ACR50 y ACR70 establecido por el Colegio Americano de Reumatología o cualquier otro criterio de eficacia aceptable.

65 La selección de sujetos adecuados para el tratamiento antiinflamatorio se puede ejecutar mediante la determinación del nivel de expresión de A_3AR en una muestra de WBC con la retirada de dicho sujeto antes de tratamiento. El sujeto se selecciona si el nivel determinado de A_3AR está por encima de un umbral determinado.

El umbral es cierto múltiplo de la expresión de A₃AR en WBC de un sujeto sano. El umbral se determina en base del nivel de expresión medio en pacientes que tienen dicha enfermedad inflamatoria, y puede dicho promedio o cierto múltiplo o fracción del mismo. El umbral se determina en base a los estudios clínicos en pacientes humanos que se designan para determinar la correlación entre el nivel de expresión y la respuesta de los pacientes a dicho tratamiento terapéutico. Como se apreciará, el umbral puede ser diferente para diferentes enfermedades inflamatorias. Como también se puede apreciar, por su naturaleza tal criterio de selección se basa en estadísticas y de esta manera significa una cierta probabilidad de que un paciente seleccionado pueda responder a un tratamiento. De este modo, en tal criterio de selección, no se apreciará ninguna duda por una persona versada en la técnica, tal criterio de selección puede no ser completamente predictivo como respuesta y también pueden ser una cierta fracción de los pacientes seleccionados de esta manera que no responderán al tratamiento.

El procedimiento de selección también se puede aplicar para seleccionar candidatos para participar en estudios clínicos para ensayar la eficacia de tratamientos antiinflamatorios que comprenden la administración de un agonista de A₃AR a pacientes, o bien solo o en combinación con otros fármacos tal como metotrexato. Como apreciarán los expertos en la técnica, un estudio clínico (también conocido por los términos ensayo clínico o “protocolo clínico”), es un estudio científico en voluntarios humanos para determinar cómo una nueva medicina o tratamiento actúa en sujetos humanos. Los ensayos intervencionales determinan si los tratamientos experimentales o nuevas formas de usar las terapias conocidas son seguras y eficaces en ambientes controlados. Mediante los estudios clínicos los médicos encuentran nuevas y mejores formas para evitar, diagnosticar, controlar, y tratar enfermedad. Los estudios clínicos para los que se seleccionan los pacientes, de acuerdo con la invención, basándose en el nivel de A₃AR puede ser Fase I, Fase II, Fase III, Fase IV o cualquier otro tipo de estudio clínico.

Breve descripción de los dibujos

Figs. 1A-1D muestran transferencias de Western ejemplares y los gráficos de barras correspondientes de intensidad de mancha media y error estándar que muestra que A₃AR está regulado hacia arriba en tejidos inflamatorios y hematopoyéticos tras la aparición de la inflamación.

Fig. 2 muestra una transferencia de Western y el gráfico de barras correspondiente de intensidad de mancha media y error estándar que muestra que el nivel de expresión de A₃AR se correlaciona con la Puntuación Clínica de la Enfermedad en el modelo AIA. “0” indica animales ingenuos (animales sin inflamación) y “6”, “9” y “12” se refieren a animales inflamados y los números indican la puntuación de inflamatorio en estos animales.

Fig. 3 es un gráfico que muestra el cambio en la gravedad de artritis en función del tiempo en animales control y en animales AIA tratados con o bien metotrexato (MTX), CF101 (calidad clínica IB-MECA), una combinación de MTX y CF101 o vehículo solamente (control).

Figs. 4A-4B muestran transferencias de Western ejemplares y los gráficos de barras correspondientes con los errores estándar que muestran el nivel de expresión de la proteína A₃AR en células de ganglios linfáticos (Fig. 4A) y bazo (Fig. 4B) en animales ingenuos, en animal AIA y en animales AIA después de tratamiento con CF101 (calidad clínica IB-MECA).

Figs. 5A-5C muestran transferencias de Western ejemplares y los gráficos de barras correspondientes con los errores estándar que muestran el nivel de expresión de la proteína en pata (Fig. 5A), tejido sinovial (Fig. 5B) y células mononucleares sanguíneas periféricas (Fig. 5C) en AIA o bien tratados con vehículo o tratados con CF101.

Fig. 6 muestra una transferencia de Western y el gráfico de barras correspondiente que muestra el nivel de expresión de la proteína A₃AR en ganglios linfáticos en animales ingenuos, animales AIA y en animales AIA tratados con MTX.

Fig. 7 muestra una transferencia de Western y el gráfico de barras correspondiente que muestra el nivel de expresión de la proteína A₃AR en 7 sujetos sanos y en 7 pacientes RA.

Fig. 8 es un gráfico de barras que muestra el nivel de A₃AR en células mononucleares sanguíneas periféricas de pacientes RA antes y después de 3 meses de tratamiento con CF101. para cada paciente la respuesta en % de acuerdo con el criterio de ACR (criterio para determinar la eficacia de fármacos para tratar RA, establecido por el Colegio Americano de Reumatología).

Fig. 9 muestra transferencia de Western de la expresión de A₃AR en PBMNC y gráficos de barras correspondientes de la intensidad de expresión en 4 pacientes antes (columnas de color oscuro) y después (columnas de color gris) y durante el tratamiento con metotrexato, medida en unidades arbitrarias.

Ejemplos

Materiales y Procedimientos

5 *Inducción de modelo de artritis inducida por adyuvante (AIA) en ratas*

Se obtuvieron ratas hembra Lewis, de 8-12 semanas de edad de los laboratorios Harlan (Jerusalem, Israel). Se mantuvieron las ratas con una dieta de gránulos convencional y provistas de una toma de agua. Se realizaron los experimentos de acuerdo con las directrices establecidas por el Comité de Cuidado y uso de Animales en Can-Fite BioPharma, Petah Tikva, Israel. A las ratas se les inyectó por vía subcutánea (SC) en la base de la cola 100 μ l de suspensión compuesta de adyuvante de Freund incompleto (IFA) con 10 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* inactivado por calor, (Mt) H37Ra, (Difco, Detroit, Estados Unidos). Cada grupo contenía 10 animales.

Se inició el tratamiento con IB-MECA (10 μ g/kg) el día 14 después de la vacunación y se administró por vía oral mediante sonda nasogástrica, dos veces al día. Se trató otro grupo con Metotrexato (MTX) (1,5 mg/kg) por vía intraperitoneal cada 3 días, comenzando el día 14 después de la vacunación. El grupo de control en cada experimento recibió vehículo solamente (DMSO en una dilución correspondiente a la de los fármacos).

Se determinó la Puntuación de Actividad de Enfermedad Clínica como sigue: los animales se inspeccionaron cada segundo día para la evaluación de artritis clínica. El sistema de puntuación variaba entre 0-4 para cada miembro: 0- sin artritis; 1- enrojecimiento o inflamación de una articulación del dedo del pie/dedo; 2- enrojecimiento e inflamación de más de una articulación del dedo del pie/dedo, 3- complicación de las articulaciones del tobillo y del tarso y metatarso. 4- enrojecimiento o inflamación de la pata entera. Se calculó la puntuación clínica mediante la adición de la puntuación de 4 piernas individuales. La intensidad inflamatoria también se determinó de acuerdo con el incremento del diámetro de la pata posterior de la rata, mediado por un calibre (Mitotoyo, Tokyo, Japón).

Separación de tejidos inflamatorios y hematopoyéticos y preparación de extractos de proteína

a. *Tejidos inflamatorios*

Se diseccionaron las patas traseras por encima de la articulación del tobillo. Se rompió el tejido óseo en piezas, se congeló de manera rápida en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta uso. Para preparar un extracto de proteína, se añadió tampón RIPA (que contiene 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1% de NP40, 0,5% de Deoxicolato y 0,1% de SDS) al tejido de la pata (4 ml/gr de tejido). Se homogeneizó la mezcla sobre hielo con un politrón y se centrifugó.

Se retiró el tejido sinovial y se separaron las células sinoviales mediante la incubación del tejido en RPMI que contiene 1 mg/ml de Colagenasa IV y 0,1 mg/ml de ADNasa con una agitación vigorosa (200 rpm) a 37°C durante 30 min. Se recogió el sobrenadante que contiene las células sinoviales y se volvió a extraer el tejido sin digerir. Se combinaron los sobrenadantes de ambas extracciones y se lavaron las células con PBS. Se prepararon los extractos de proteína.

b. *Tejidos hematopoyéticos*

Se retiraron los ganglios linfáticos y se separaron las células mediante primero troceado del tejido y disgregación mediante una aguja de 22 G. Se retiraron los bazos y se sometieron a Lymphoprep (Nycomed AS, Oslo, Noruega) para la separación de células mononucleares. Se prepararon extractos de proteína.

Separación de células mononucleares de sangre periférica a partir de pacientes RA y sujetos sanos

Se extrajo sangre de sujetos sanos o pacientes RA. Se separaron las células mononucleares (linfocitos y monocitos) usando gradiente Ficoll- Hypaque. Se extrajo la proteína de las células mononucleares.

Estudio clínico

Se extrajo sangre de pacientes RA que se enrolaron en un estudio clínico patrocinado por Can-Fite BioPharma, en el que se evaluó el efecto de CF101, un IB-MECA de calidad clínica, en pacientes artríticos. Los pacientes recibieron al azar 0,1, 1,0 ó 4,0 mg de CF101 dos veces al día. Se extrajo sangre en dos momentos: (a) después de un período de lavado de 4-6 semanas de un tratamiento previo y antes que se iniciara un tratamiento con CF101 - esto se consideró como nivel de comienzo; (b) después de 3 meses de tratamiento con CF101. Se separaron las células mononucleares de sangre periférica y se extrajo la proteína como se ha descrito anteriormente. Además, se registraron los valores de la proteína C reactiva (CRP), el número de articulaciones sensibles e inflamadas, la evaluación global del médico, la evaluación del propio paciente, la puntuación de dolor y la puntuación de incapacidad y se calculó la puntuación de para cada paciente (ACR es una puntuación que se calcula de acuerdo con los criterios establecidos por el Colegio Americano de Farmacología, basándose en las mediciones anteriormente mencionadas, para evaluar la eficacia de fármacos para tratamiento de RA; ACR 20, ACR 50 y ACR 70 respectivamente representan un 20%, 50% y 70% de mejora en esta puntuación).

Análisis de nivel de expresión de proteína de A₃AR mediante transferencia de Western (WB)

Se llevaron a cabo análisis de transferencia de Western (WB) de sinovial, pata, bazo y ganglios linfáticos de acuerdo con el siguiente protocolo. Se enjuagaron a las muestras con PBS enfriado con hielo y se transfirieron a tampón de lisis enfriado con hielo (tampón TNN, tampón 50mM Tris pH = 7,5, 150 mM NaCl, NP 40). Se eliminó el desecho de células mediante centrifugación para 10 min, a 7500 x g. Se determinaron las concentraciones de proteína usando el reactivo de tinte de ensayo de proteína Bio-Rad. Se separaron cantidades iguales de la muestra (50 µg) mediante SDS-PAGE, usando geles de poliacrilamida al 12%. Las proteínas resueltas se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH, Estados Unidos). Las membranas se bloquearon con 1% de BSA y se incubaron con el anticuerpo primario contra A₃AR (dilución 1:1000) durante 24 h a 4°C. Después se lavaron las manchas y se incubaron con un anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente. Se registraron las bandas usando el kit de desarrollo de color BCIP/NBT (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).

Resultados

A₃AR está regulado hacia arriba en tejidos inflamatorios y hematopoyéticos

Se determinó el nivel de expresión de A₃AR en modelo AIA mediante análisis WB. En este punto, se obtuvieron extractos de proteína de tejido inflamado (pata) o del tejido hematopoyético periférico (células mononucleares de sangre periférica, ganglios linfáticos y bazo) y se analizaron como se ha descrito en Materiales y Procedimientos. Las Figs 1A-1D presentan los resultados de los análisis de WB, también se presentan en los correspondientes gráficos de barras, que proporcionan los resultados medios y la desviación estándar. Como se muestra, A₃AR está regulado hacia arriba en el tejido inflamado (Fig. 1A) así como en tejidos hematopoyéticos periféricos (Figs. 1B-1D).

El nivel de expresión de A₃AR en modelo AIA se correlaciona también con la Puntuación Clínica de la Enfermedad (Fig. 2) proporcionando una evidencia adicional para la correlación entre inflamación y expresión de A₃AR.

CF101 inhibe el development de AIA

Aproximadamente 21 después de la inmunización, la mayoría de los animales tratados desarrollaron progresivamente artritis. El tratamiento de CF101 (10 µg/kg, proporcionado por vía oral dos veces al día, comenzando el día 14 después de la inmunización) y tratamiento con metotrexato (MTX) dio como resultado una disminución significativa de la gravedad de la enfermedad, muy similar para ambos fármacos, como se evalúa mediante la puntuación clínica de artritis. La enfermedad era máxima los días 21-28 y se observó un efecto máximo de CF101 o MTX en estos días (Fig. 3).

A₃AR se expresa en gran medida en los tejidos inflamatorios y en tejidos hematopoyéticos periféricos de ratas AIA

Se detectó un bajo nivel de expresión de A₃AR en los tejidos de pata y sinoviales sanos. En los tejidos inflamatorios derivados de ratas AIA, se observó un notable incremento en el nivel de expresión de la proteína A₃AR (Figs. 4A-4B). Tras el tratamiento de IB-MECA el nivel de A₃AR se reguló hacia abajo (Figs. 4A-4B). Se observó un patrón similar en los tejidos hematopoyéticos periféricos, es decir un bajo nivel de expresión de A₃AR en el bazo y ganglio linfático (LN) derivado de animales ingenuos, alto en tejidos de AIA y una baja expresión in en los tejidos de ratas tratadas con IB-MECA (Figs. 5A-5C). En el LN derivado de ratas AIA tratadas con MTX, se observó un perfil similar de expresión de A₃AR (Fig. 6).

Se encuentra alto nivel de expresión de A₃AR en MNC derivadas de RA frente a bajo en sujetos sanos

Se encontró un bajo nivel de expresión de A₃AR en MNC de sujetos sanos mientras se detectó un alto nivel de expresión en MNC derivadas de pacientes RA (Fig. 7).

Correlación entre los parámetros de expresión de A₃AR y la eficacia clínica

Se extrajo sangre de pacientes 17 RA que participaron en un estudio clínico para ensayar el efecto de CF101 sobre la manifestación de enfermedad en tales pacientes. Se extrajo la sangre después de un período de lavado del tratamiento anterior y después de 3 meses de tratamiento, se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) y se determinó el nivel de A₃AR en estas células. Como se puede observar en la Fig. 8, de estos 17 pacientes, 5 no eran respondedores, a saber estos pacientes no habían incluso logrado una respuesta de ACR 20, mientras que los otros 13 pacientes eran respondedores ya que tenían al menos una respuesta de ACR 20 (como se puede observar en la Figura 8, 3 de los respondedores tenían una respuesta de ACR 70, 5 lograron una respuesta de ACR 50 y otros 4 solamente una respuesta de ACR 20).

Como además se puede observar en la Fig. 8, todos los respondedores de ACR 50 y ACR 70 tenían un alto nivel inicial de A₃AR, que se redujo después de 3 meses de tratamiento, mientras no existía esencialmente ningún cambio en el nivel de A₃AR en los no respondedores. El paciente marcado por un "*" (nº de paciente 1517), aunque no tenía respuesta a ACR (en vista del hecho que no había ningún cambio en el nivel de CRP, uno de los parámetros usados para calcular la puntuación de ACR - véase más adelante, estaba por debajo de 0%), tenía una mejora muy significativa en otros parámetros, particularmente el número de articulaciones inflamadas y sensibles.

ES 2 327 435 T3

Estos datos claramente demuestran la capacidad de uso del nivel de A_3AR con el fin de predecir una respuesta de un paciente a una terapia de fármaco antiinflamatorio, particularmente tal terapia que hace uso de agonistas de A_3AR como un fármaco que modifica la enfermedad.

5 *Regulación ascendente del Nivel de expresión de A_3AR en pacientes RA tratados con metotrexato*

Se tomaron muestras de sangre de 4 pacientes RA antes y después del inicio del tratamiento con metotrexato. Se separaron PBMNC y se ensayaron los niveles de A_3AR como se ha descrito anteriormente. Los resultados que se muestran en la Fig. 9, demuestran que el tratamiento con metotrexato induce un incremento en el nivel de A_3AR .

10

Estos datos muestran que la historia pasada de la enfermedad, en particular la medicación pasada, puede influir en el nivel de A_3AR en PBMNC y esta historia puede necesitar tenerse en cuenta para la realización del procedimiento de acuerdo con la invención.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para determinar la eficacia de un tratamiento terapéutico antiinflamatorio de un sujeto al que se ha administrado agonista de A₃AR, que comprende la determinación del nivel de expresión de A₃AR en muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) del sujeto, en dos o más momentos sucesivos, al menos uno de los cuales se realiza durante un tratamiento antiinflamatorio, en el que una diferencia en el nivel de expresión es indicativo de la eficacia del tratamiento de fármaco.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una o más de las primeras muestras se toman en momentos antes del inicio del tratamiento y una o más segundas muestras se toman en un momento durante el tratamiento, en el que una disminución del nivel de la expresión de A₃AR en una o más de las segundas muestras comparado con una o más de las primeras muestras es indicativo de que el tratamiento es eficaz.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una o más de las primeras muestras se toman en un momento durante el tratamiento posterior al momento de una o más de las primeras muestras, en el que una disminución en el nivel de la expresión de A₃AR en una o más segundas muestras cuando se compara con una o más primeras muestras es indicativo de que el tratamiento es eficaz.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una o más de las primeras muestras se toman en un momento después de que el tratamiento se haya descontinuado, en el que un incremento en el nivel de expresión de A₃AR en una o más de las segundas muestras comparado con una o más de las primeras muestras es indicativo de que el tratamiento es eficaz.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento terapéutico implica un fármaco antiinflamatorio.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el estado inflamatorio es el resultado de una enfermedad autoinmune.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide (RA).
- 35 8. A procedimiento para seleccionar un sujeto que padece una cierta enfermedad inflamatoria para recibir tratamiento terapéutico antiinflamatorio, que comprende la administración al sujeto de un agonista de A₃AR, comprendiendo el procedimiento la determinación del nivel de expresión de A₃AR en una muestra de PBMNC tomada del sujeto y seleccionar el sujeto para recibir dicho tratamiento antiinflamatorio terapéutico si está por encima del nivel predeterminado.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha muestra de PBMNC se toma de un sujeto antes de recibir tratamiento antiinflamatorio.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el estado inflamatorio es el resultado de una enfermedad autoinmune.
11. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide (RA).
12. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicho tratamiento antiinflamatorio terapéutico comprende suministrar a dicho sujeto IB-MECA.

50

55

60

65

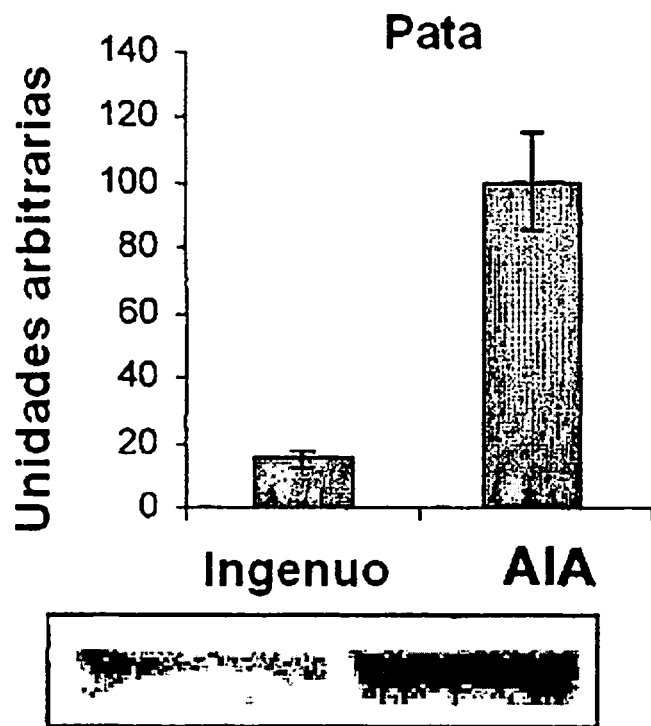


FIG 1 A

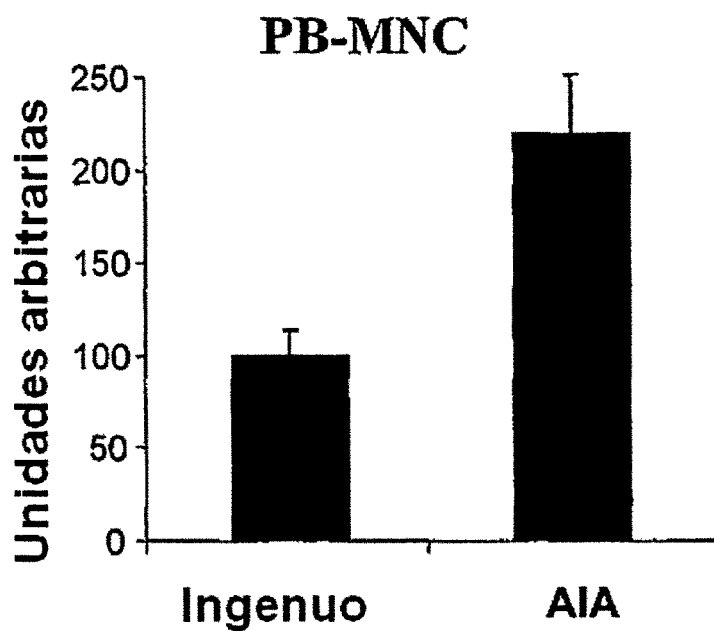


FIG 1B

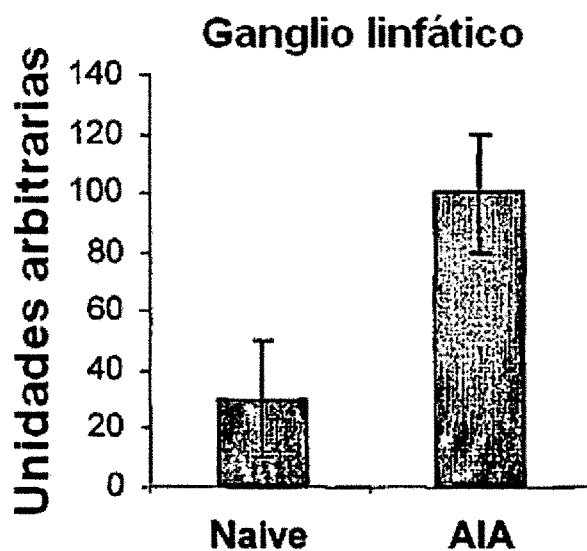
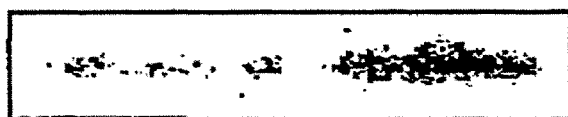


FIG. 1C



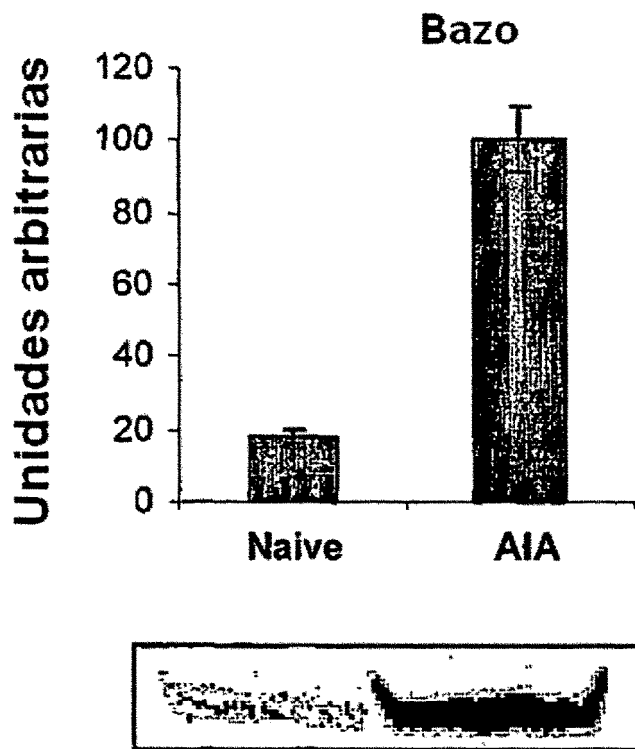


FIG. 1D

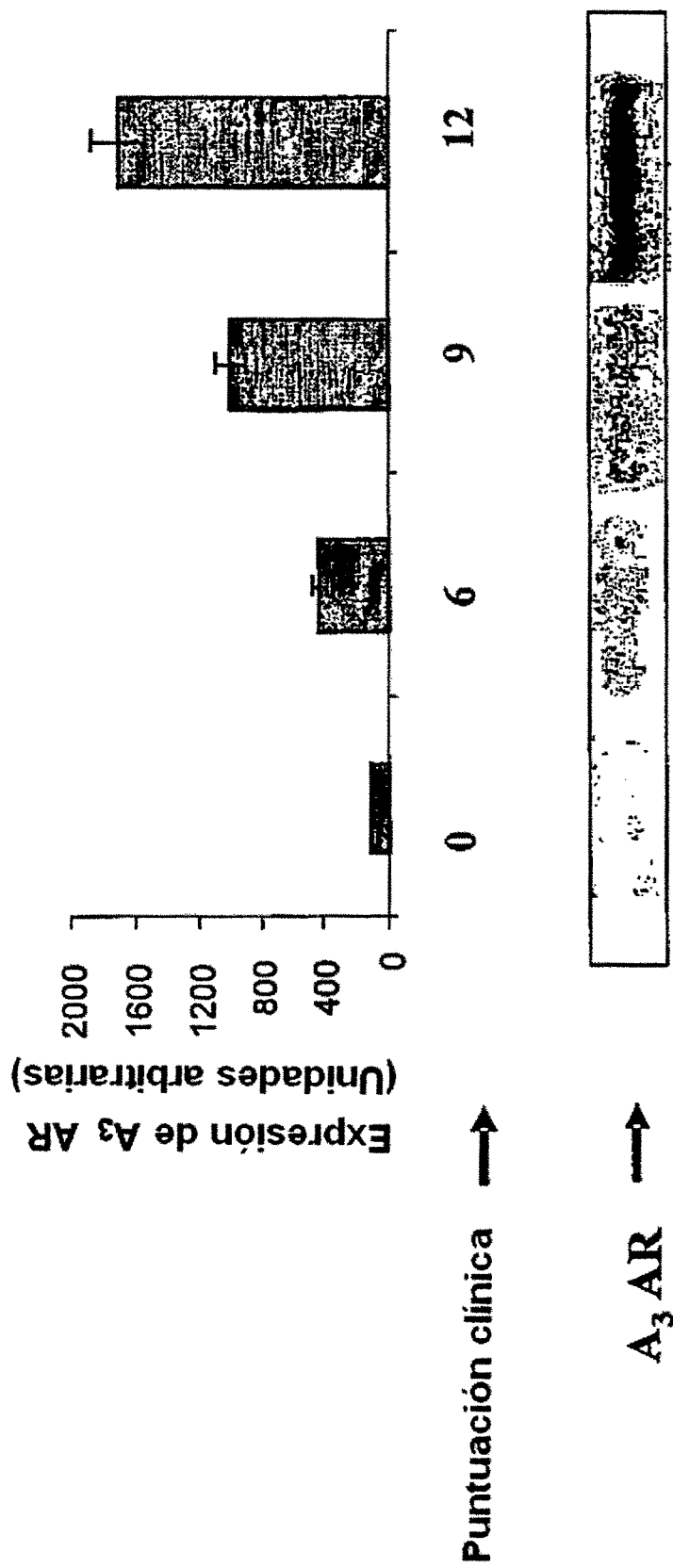
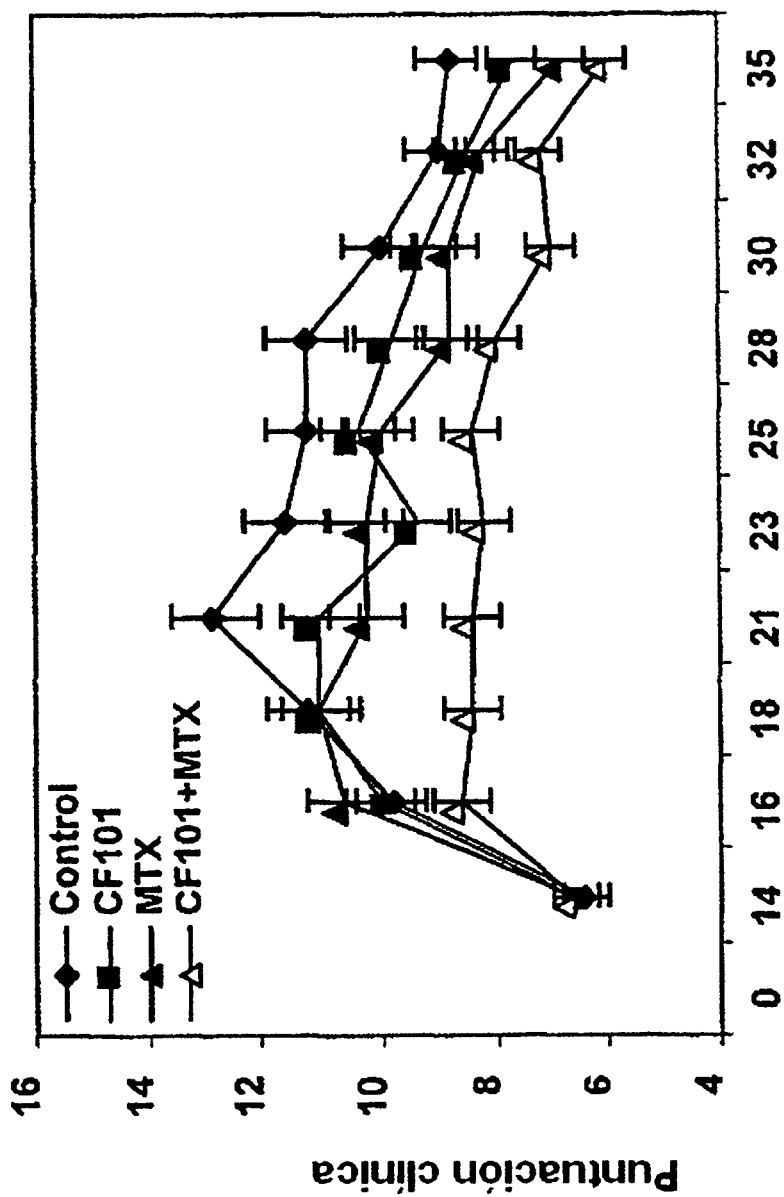


FIG.2



Días después de la inducción de la enfermedad

FIG. 3

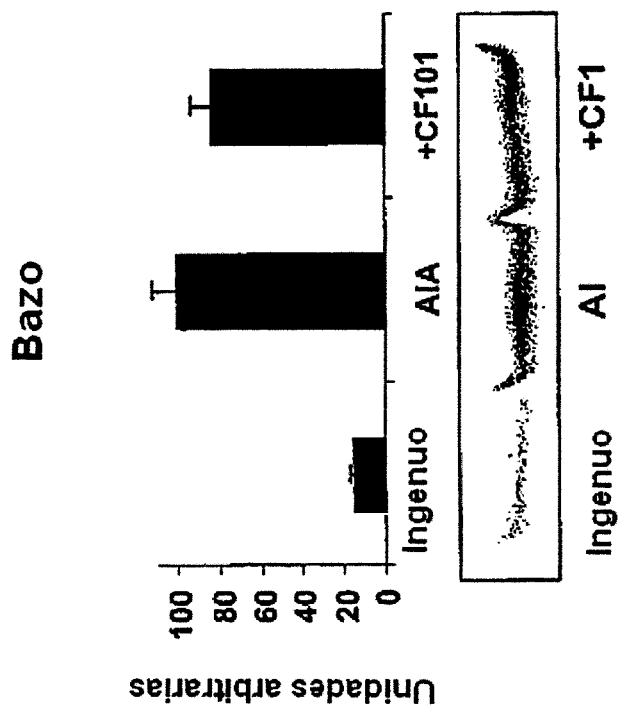


FIG.4B

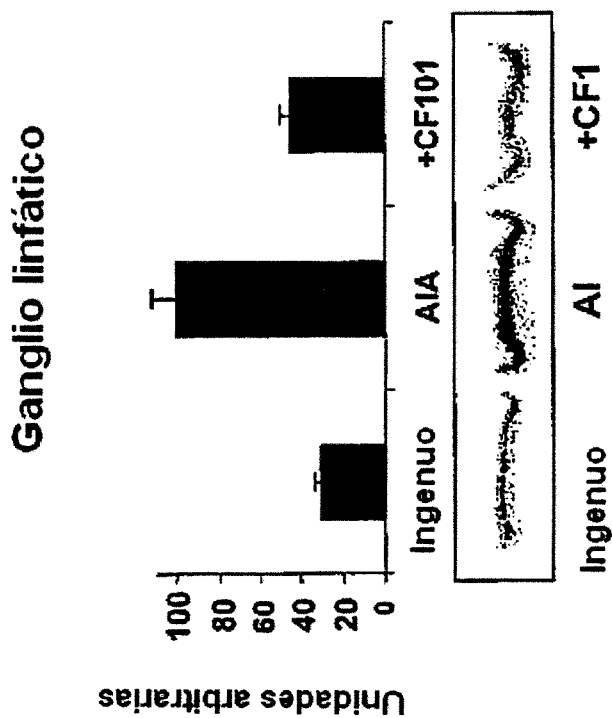
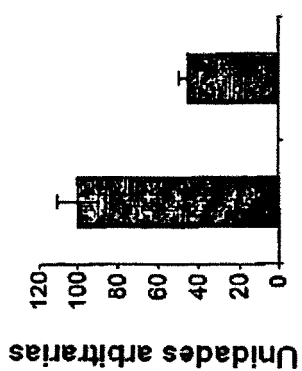


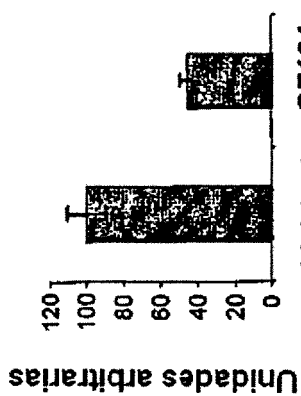
FIG.4A

Tejidos inflamados

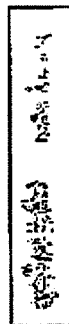
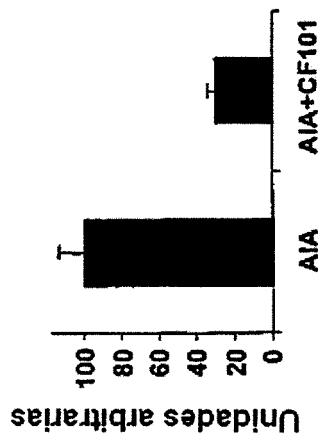
Tejido hematopoyético periférico



Pata



Sinovia



PB MNC

FIG.5A

FIG.5B

FIG.5C

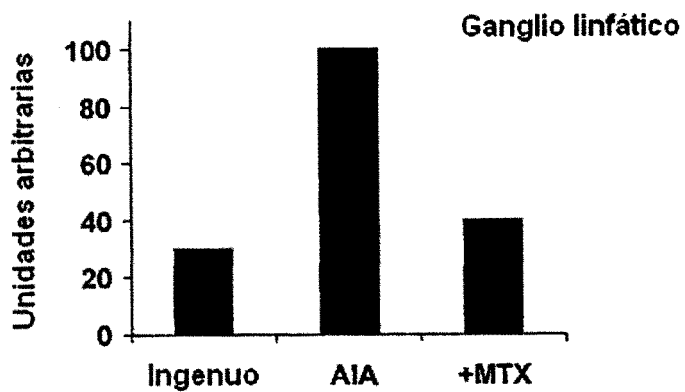


FIG. 6

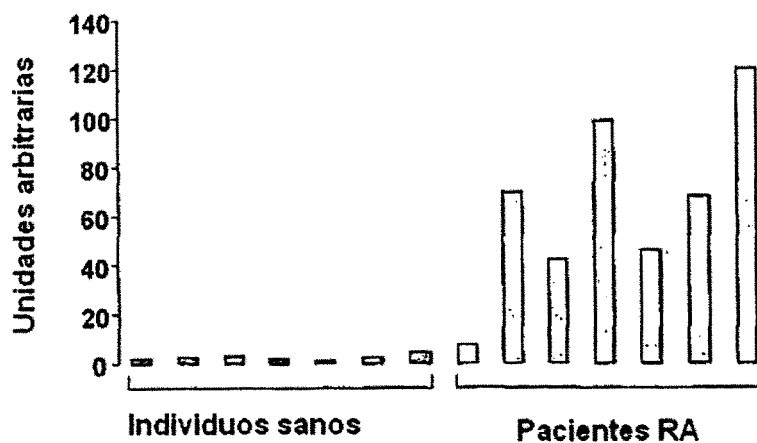
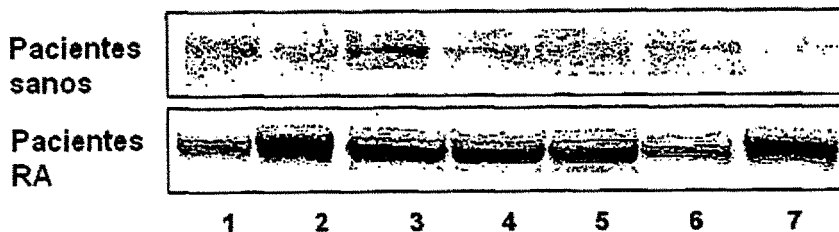


FIG. 7



FIG.8

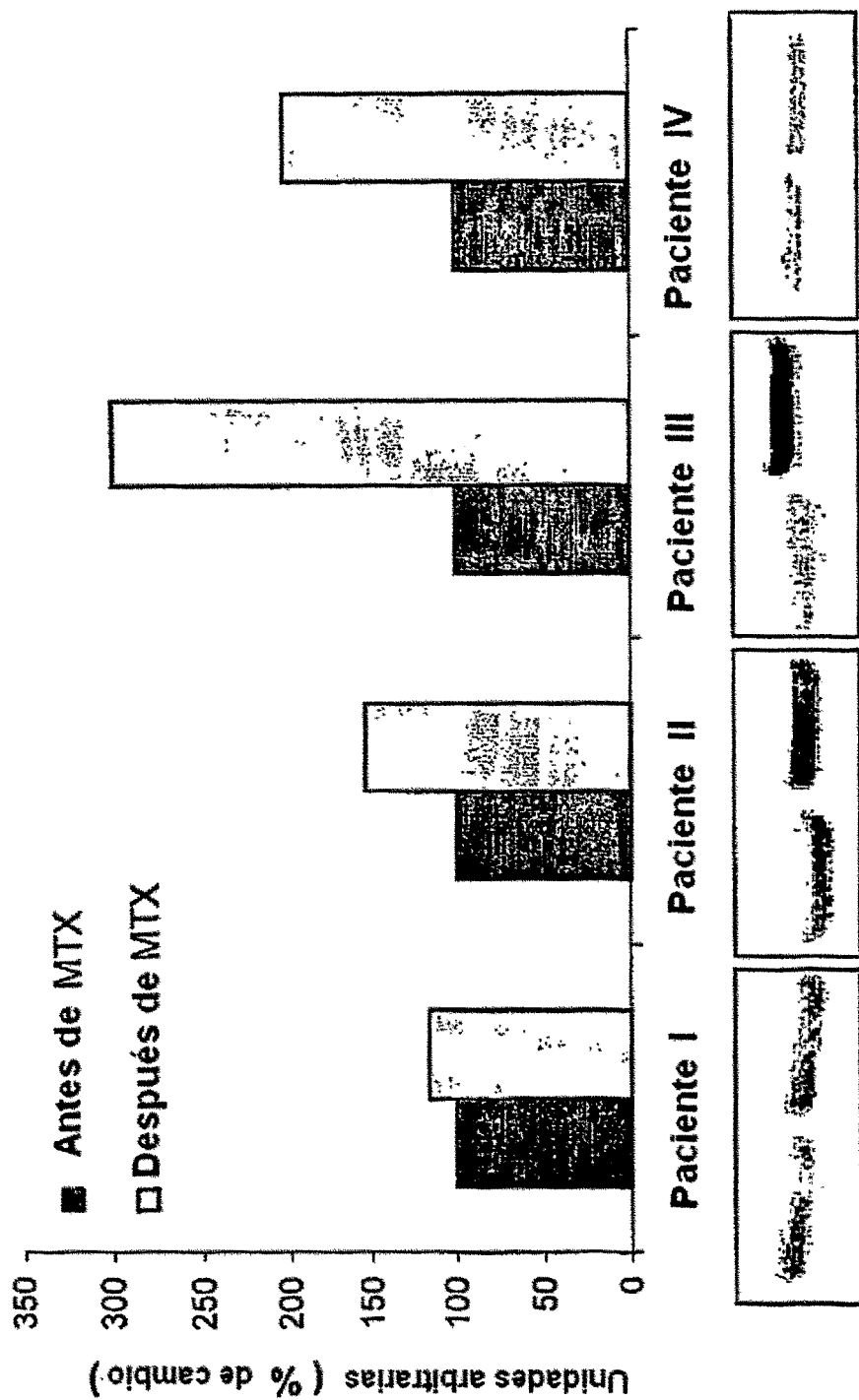


FIG.9