



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 346 691**

51 Int. Cl.:
G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06795161 .6**
96 Fecha de presentación : **26.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1915620**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.04.2008**

54 Título: **Diagnóstico, tratamiento y prevención de trastornos vasculares usando autoanticuerpos IL-1 α .**

30 Prioridad: **02.08.2005 US 704450 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2010

73 Titular/es: **XBiotech, Inc.**
1055 West Hastings Street, Suite 300
Vancouver, BC V6E 2E9, CA

72 Inventor/es: **Simard, John y**
Bendtzen, Klaus

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Diagnóstico, tratamiento y prevención de trastornos vasculares usando autoanticuerpos IL-1 α .

5 Campo de la invención

La invención se refiere al diagnóstico, el tratamiento y la prevención de trastornos relacionados con la aterosclerosis. Más específicamente, la invención se refiere al uso de autoanticuerpos IL-1 α para diagnosticar, tratar y prevenir trastornos relacionados con la aterosclerosis.

10 Antecedentes de la invención

Durante décadas se ha investigado la aterosclerosis por su papel en al menos tres enfermedades, cardiopatía (HD), arteriopatía periférica (PAD) y enfermedad cerebrovascular (CD). Los procesos patológicos de estas categorías de enfermedades son similares, y la aterosclerosis se considera actualmente una enfermedad sistémica independientemente de que lecho vascular se vea afectado. En consecuencia, la carga social de la aterosclerosis es enorme: en 2002 hubo en Estados Unidos un número estimado de 71.100.000 personas afectadas por cardiopatías, que se tradujo en 947.428 fallecimientos, con un coste de 393.500 millones de dólares estadounidenses. Hay 5.400.000 estadounidenses que viven con los efectos de apoplejías, lo que representó un coste estimado en asistencia sanitaria en 2005 de 56,8 dólares estadounidenses. Se espera que la carga total de la aterosclerosis aumente.

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica. En muchos pacientes es insidiosa y afecta a más de un lecho vascular. La detección precoz de la aterosclerosis o la identificación de pacientes susceptibles de desarrollar aterosclerosis es crucial para prevenir la morbilidad. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de identificar procedimientos para identificar pacientes en riesgo de desarrollar aterosclerosis, así como procedimientos para tratar pacientes que ya están afectados con un trastorno relacionado con la aterosclerosis.

La solicitud de patente de Estados Unidos US2004/0185514 da a conocer un procedimiento para diagnosticar enfermedades cardiovasculares en un ser humano evaluando la valoración frente a PAF de anticuerpos en un sujeto.

Dinarelli, 1993, TiPS 14, páginas 155-159 y Daradik y col., 2005, J. Vasc. Surg., 41 páginas 321-331 sugieren que la IL-1 α puede estar implicada en la aterosclerosis. La solicitud de patente WO 2004/100987 también ha dado a conocer procedimientos de uso de antagonistas de IL-1 para prevenir o tratar la aterosclerosis.

Suzuki y col., 1990, J. Immunol., 145, páginas 2140-2146 desvela la presencia de autoanticuerpos IL-1 α en el suero de pacientes con artritis reumatoide.

Juovenne y col., 1997, Scand. J. Immunol., 46, páginas 413-418 desvela la presencia de anticuerpos IL-1 α en un subconjunto de pacientes con poliartritis crónica y la asociación entre niveles elevados de los autoanticuerpos y un pronóstico mejor.

Ogushi y col., 2001, J. Med. Invest., 48, páginas 181-189 muestra que se detectaron autoanticuerpos IL-1 α en cinco de once pacientes con fibrosis pulmonar idiopática en su primer día de hospital y en todos los pacientes en su vigésimo primer día de hospital. Se concluyó que los autoanticuerpos IL-1 α se generaron como respuesta al proceso inflamatorio de dicha enfermedad y que pueden actuar como un factor de regulación para la IL-1 α .

Garonne y col., 1996, Mol. Immunol., 33 páginas 649-658 desvela la generación y la caracterización de anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-1 α .

No obstante, ninguno de estos documentos de la técnica anterior desvela o sugiere el objeto tal como se define en las reivindicaciones de la presente solicitud.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la observación de que una valoración elevada de autoanticuerpos IL-1 α en humanos reduce el riesgo de cardiopatía isquémica o su progresión a cardiopatía coronaria. La presente invención proporciona un medio poderoso para detectar un individuo en riesgo de desarrollar aterosclerosis o un trastorno relacionado con la aterosclerosis determinando la valoración de autoanticuerpos IL-1 α de un individuo. La invención también proporciona procedimientos de uso de autoanticuerpos IL-1 α para reducir el riesgo, la progresión o los síntomas de la enfermedad vascular (por ejemplo, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica y enfermedad cerebrovascular).

La IL-1 α se libera en cantidades suficientes como para inducir una afinidad elevada, una valoración alta, respuestas de anticuerpos de neutralización en hasta el 50% de los pacientes analizados, principalmente en ancianos. Hansen y col., Eur. J. Clin. Invest. 24, 212-18, 1994. Además, la capacidad de individuos de desarrollar anticuerpos IL-1 α proporciona un efecto protector frente a alguna función desconocida de la IL-1 α en la progresión de procesos inflamatorios patológicos en la pared arterial (aterosclerosis).

La correlación entre el riesgo de trastornos vasculares y las valoraciones de autoanticuerpos IL-1 α es sorprendente, porque se cree que la IL-1 α ejerce su actividad biológica principalmente en el nivel intracelular, como una sustancia autocrina, en la estrecha proximidad de la célula que produce IL-1 α , como una molécula asociada a la membrana o como una sustancia estrictamente paracrina. Además, no existe actualmente un mecanismo que explique el papel de la IL-1 α en la progresión de la aterosclerosis. De este modo, no se espera que un anticuerpo dirigido a la IL-1 α tenga valor terapéutico en el tratamiento o la prevención de enfermedades relacionadas con la aterosclerosis.

Autoanticuerpos IL-1 α

Los “autoanticuerpos IL-1 α ” de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos de longitud completa aislados a partir de linfocitos B (incluidos linfocitos B activados y/o inmortalizados), sangre, suero o plasma; fragmentos de anticuerpos funcionales que contienen sitios de unión a la IL-1 α de anticuerpos IL-1 α de longitud completa (por ejemplo, fragmentos F(ab) $'$ 2, fragmentos F(ab) $'$, fragmentos Fab, fragmentos Fv bicatenarios y anticuerpos monocatenarios); moléculas de inmunoglobulina recombinantes producidas por expresión de ADNc procedente de linfocitos B o por expresión de nucleótidos sintéticos que codifican las moléculas de inmunoglobulina; autoanticuerpos monoclonales (producidos tal como se describe más adelante); y anticuerpos IL-1 α sintéticos (producidos tal como se describe más adelante). Un anticuerpo IL-1 α es, típicamente, una molécula IgG, en particular una molécula IgG $_4$ (Garrone y col., Mol. Immunol. 33, 649-58, 1996), pero puede ser una molécula IgM, IgE, IgA o IgD. Los anticuerpos IL-1 α incluyen también cualquiera de las moléculas descritas anteriormente que estén acopladas a otra molécula (tal como un receptor, ligando, enzima, toxina, portador, etc.) y autoanticuerpos producidos combinando las porciones variables de un autoanticuerpo de un isotipo con las regiones constantes de otro isotipo.

Los autoanticuerpos IL-1 α se unen, preferentemente, con una afinidad alta a la IL-1 α . Los anticuerpos IL-1 α de afinidad alta tienen, típicamente, una constante de afinidad en el equilibrio (K_a , o la recíproca de KD) para la unión a IL-1 α de entre 10^{14} M $^{-1}$ y 5×10^{-7} M $^{-1}$ (por ejemplo, 5×10^7 , 10^{-13} , 5×10^8 , 10^{-12} , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} , 10^{12} , 5×10^{12} , 10^{13} o 5×10^{13} M $^{-1}$). La unión específica de un autoanticuerpo IL-1 α a una IL-1 α puede determinarse usando cualquier procedimiento apropiado incluidas, por ejemplo, técnicas tales como el análisis de interacción bimolecular (BIA) a tiempo real (Sjolander & Urbaniczky, Anal. Chem. 63, 2338-45, 1991, y Szabo y col., Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705, 1995). La K_a puede calcularse a partir de una representación de Scatchard de datos de unión específicos, tal como se conoce en la técnica. Véase también la patente de Estados Unidos 5.959.085.

Los autoanticuerpos IL-1 α de la invención neutralizan preferentemente la bioactividad de la IL-1 α (por ejemplo, la secreción de IL-2 inducida por IL-1 α) *in vitro* e *in vivo*. Más preferentemente, los autoanticuerpos IL-1 α reducen o eliminan la unión de la IL-1 α a su receptor. La actividad de neutralización y la actividad de unión al receptor pueden analizarse tal como se describe en Satoh y col., Immunopharmacology 27, 107-18, 1994.

Los procedimientos y las composiciones descritos anteriormente comprenden autoanticuerpos IL-1 α humanos, así como autoanticuerpos IL-1 α de otros mamíferos, incluidos, pero no limitados a, otros primates (por ejemplo, gorilas, chimpancés, babuinos, monos ardilla), mascotas (por ejemplo, gatos, conejos, perros, caballos), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, cabras, caballos) y animales de investigación (por ejemplo, gatos, perros, cobayas, conejos, ovejas, cabras, cerdos, chimpancés y babuinos).

Procedimientos de obtención de autoanticuerpos

Se pueden obtener autoanticuerpos IL-1 α por medio de una variedad de procedimientos. En algunas realizaciones, se obtienen preparaciones de autoanticuerpos IL-1 α policlonales a partir de linfocitos B, sangre, plasma o suero, bien a partir de muestras individuales o bien a partir de mezclas de muestras de 2 o más individuos. Las fuentes de linfocitos B incluyen sangre periférica, amígdalas, vegetaciones y bazo. Véase la patente de Estados Unidos 5.959.085. El (los) individuo(s) puede(n) estar sano(s) o puede(n) tener una enfermedad autoinmunitaria, en particular una enfermedad autoinmunitaria en la que se sobreproducen autoanticuerpos IL-1 α . Estas enfermedades incluyen, por ejemplo, el síndrome de Schnitzler (Saurat y col., J. Allergy Clin. Immunol. 88, 244-56, 1991), trastornos ampollosos autoinmunitarios (por ejemplo, penfigus/penfigoide) (Garrone y col., 1996), y artritis inflamatoria crónica (Garrone y col., 1996). Pueden identificarse donantes de sangre que sean positivos en presencia de autoanticuerpos IL-1 α en circulación usando procedimientos conocidos, tales como ELISA, radioinmunoprecipitación, análisis de Western blot, etc. Véase, por ejemplo, Satoh y col., 1994; Saurat y col., 1991; Svenson y col., J. Clin. Invest. 92, 2533-39, 1993; Bendtzen y col., Mol. Biotechnol. 14, 251-61, 2000; Svenson y col., Scand. J. Immunol. 29, 489-92, 1989; Svenson y col., Scand. J. Immunol. 32, 695-701, 1990; Svenson y col., J. Clin. Invest. 92, 2533-39, 1993; y Svenson y col., Cytokine 4, 125-33, 1992. En algunas realizaciones, se obtiene plasma usando plasmaféresis o aféresis.

En algunas realizaciones, el suero del donante se analiza usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) de IL-1 α . Debido a que se puede correlacionar una cantidad muy baja de IL-1 α libre en el suero con la presencia de autoanticuerpos de neutralización dirigidos contra la IL-1 α , el ensayo permite una evaluación muy rápida y la preselección del suero del donante para los que tienen un potencial alto para proporcionar anticuerpos de neutralización apropiados. Este enfoque puede simplificar el proceso de evaluación inicial y reducir el tiempo de desarrollo. Hay disponibles kits de ensayo de IL-1 α , por ejemplo, de Abazyme LLC; Alpco Diagnostics; Antigenix America Inc.; Autogen Bioclear UK Ltd; Bender MedSystems; Biosource International; BioVision; Cayman Chemical; Cell Sciences; CHEMICON; CytoLab Ltd., Endogen; GE Healthcare (anteriormente Amersham Biosciences); Leinco Technologies, Inc.; PeproTech; y R&D Systems.

Los autoanticuerpos IL-1 α pueden purificarse a partir de sangre, plasma o suero, individual o combinado, usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como ultrafiltración, diálisis, lavado tras inmovilización sobre un soporte proteico no específico o cromatografía de afinidad sobre un soporte proteico no específico. Véase el documento US 2005/0147603. Los autoanticuerpos IL-1 α humanos pueden purificarse a partir de preparaciones comerciales de IgG humano (por ejemplo, SANDOGLOBULIN(R) (Sandoz, Copenhague, Dinamarca), GAMMAGARD(R) (Baxter, Allerød, Dinamarca) o NORDIMMUN(R) (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca). Véase Ross y col., J. Interferon Res. 14, 159-60, 1994; Svenson y col., J. Clin. Invest. 92, 2533-39, 1993. La purificación de afinidad de autoanticuerpos IL-1 α se describe, por ejemplo, en Satoh y col., 1994.

En algunas realizaciones, puede analizarse la unión de IL-1 α radioetiquetada de conjuntos de plasma o suero recogido de, por ejemplo, 100 donantes, a IgG, usando cromatografía de afinidad a proteína G. Una radioetiqueta adecuada es ¹²⁵I. Se analiza la unión del rastreador radioetiquetado a IgG en conjuntos y se puede evaluar la recuperación de la IL-1 α natural añadida a estos conjuntos usando un ELISA de IL-1 α . El plasma o el suero de donantes que forman parte de un conjunto positivo pueden analizarse de nuevo individualmente y puede determinarse la unión saturable de IL-1 α a IgG en un 10% del plasma (evaluado por medio de la unión de saturación de IL-1 α radioetiquetado a IgG). Por ejemplo, pueden incubarse diluciones de plasma de donante muy positivo en autoanticuerpos IL-1 α con IL-1 α etiquetado con ¹²⁵I (3.500 cpm) con un volumen final 200 μ l. El trazador unido a IgG puede evaluarse por cromatografía de afinidad a proteína G. La IL-1 α etiquetada con ¹²⁵I unida a IgG y la libre pueden separarse por precipitación secundaria de anticuerpos. La disociación media o las constantes de afinidad y las capacidades de unión de IL-1 α a IgG pueden calcularse usando representaciones de Scatchard.

Los donantes con sueros muy positivos, es decir, los que contienen autoanticuerpos IL-1 α con avidez en el rango picomolar en las concentraciones de anticuerpo en plasma de entre 0,1 nM y 35 nM, pueden usarse para recoger linfocitos B que producen autoanticuerpos IL-1 α a partir de la sangre periférica. No obstante, los autoanticuerpos IL-1 α útiles pueden mostrar un intervalo de avidez entre el rango femptomolar y el nanomolar que puede considerarse útil para tratamiento, dependiendo de la diana y de la farmacocinética deseada para el tratamiento de anticuerpos. Las concentraciones en plasma de autoanticuerpos IL-1 α pueden variar significativamente y, dependiendo de la sensibilidad y eficacia de la clonación o enriquecimiento, pueden encontrarse en el intervalo de 0,1 picomolar a 0,1 nanomolar o, por el contrario, pueden encontrarse en concentraciones elevadas en el intervalo de 35 nM a 3.500 nM, como es el caso de tumores malignos de linfocitos B del plasma. Los linfocitos de sangre periférica que producen autoanticuerpos IL-1 α pueden estimularse para que proliferen en cultivo y, por lo tanto, pueden immortalizarse usando metodologías bien conocidas en la técnica, usando, por ejemplo, un virus (por ejemplo, el virus de Epstein Barr, EBV), un agente químico o un ácido nucleico (tal como un oncogén). Después, las células immortalizadas pueden clonarse usando procedimientos conocidos, para proporcionar una fuente fiable de grandes cantidades de autoanticuerpos IL-1 α .

En algunas realizaciones, los linfocitos B de las muestras de sangre de donantes apropiados se immortalizan en cultivo heterogéneo con EBV en presencia de células mononucleares irradiadas y un agonista de receptores tipo toll (tal como un oligonucleótido CpG), que actúa como activador policlonal de linfocitos B de memoria y aumenta su susceptibilidad a la infección por EBV. Después se seleccionan los linfocitos B immortalizados para linfocitos B de memoria positivos a IgG por medio de una combinación de separación de células activas por fluorescencia y de separación magnética. La presencia de autoanticuerpos IL-1 α específicos en los sobrenadantes de los cultivos que contienen 10 linfocitos B de memoria positivos a IgG puede analizarse después de 12-14 días. Se vuelven a plaquear los cultivos positivos y se usa dilución limitante para aislar individualmente clones de linfocitos B immortalizados con producción apropiada de autoanticuerpos IL-1 α . Véanse, por ejemplo, el documento WO 91/09115 y la patente de Estados Unidos 5.959.085.

En otras realizaciones, los linfocitos aislados se usan para producir hibridomas tal como se conoce en la técnica. (Véanse, Methods in Enzymology, Vol. 121, secciones I y II, 1986; Garrone y col., 1996) Pueden propagarse *in vitro* hibridomas que producen autoanticuerpos IL-1 α tal como se conoce en la técnica para proporcionar una fuente constante de autoanticuerpos. Alternativamente, pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones células de hibridoma, que después generarán tumores. Estos tumores están acompañados por la producción de fluido ascítico que contiene los anticuerpos monoclonales deseados. Los anticuerpos monoclonales pueden recuperarse a partir del fluido ascítico usando procedimientos convencionales tales como ultrafiltración, ultracentrifugación, diálisis y cromatografía de inmunoadfinidad.

Puede obtenerse ARN a partir de un clon de linfocito B immortalizado o un clon de hibridoma y usarse como plantilla para una reacción de amplificación (por ejemplo, PCR) para obtener ADNc que codifica un anticuerpo IL-1 α . Véase el documento de patente de Estados Unidos 5.959.085. El ADNc que codifica un autoanticuerpo IL-1 α de longitud completa o un fragmento funcional del mismo puede estar incluido en un vector de expresión y usarse para expresar el autoanticuerpo IL-1 α en células huésped procariotas o eucariotas usando metodologías de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Garrone y col., 1996. Las células huésped pueden usarse después para propagar el autoanticuerpo IL-1 α . Alternativamente, puede aislarse cualquier autoanticuerpo IL-1 α particular y determinarse su secuencia de aminoácidos usando procedimientos bien conocidos. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos pueden sintetizarse y usarse en un vector de expresión para producir clones de autoanticuerpos IL-1 α . Si se desea, puede reemplazarse la región constante de cadena pesada original de un autoanticuerpo IL-1 α por una región constante de un isotipo diferente (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA, IgD, IgM o IgE). Véase el documento de patente de Estados Unidos 5.959.085.

Los autoanticuerpos IL-1 α pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Merrifield, J Am. Chem. Soc. 85, 2149-54, 1963; Roberge y col., Science 269, 202-04, 1995. La síntesis de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o automáticas. La síntesis automática puede realizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos modelo 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Opcionalmente, pueden sintetizarse por separado fragmentos de un autoanticuerpo IL-1 α y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

Los autoanticuerpos IL-1 α pueden obtenerse examinando colecciones de anticuerpos, tales como HuC AL[®] (Knapik y col., J. Mol. Biol. 296, 57-86, 2000), colecciones de presentación en fagos de scFv (por ejemplo, Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catálogo n.º. 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos de Stratagene SURZAP[™], catálogo n.º. 240612) y similares. Véanse los documentos WO 92/18619; WO 92/20791; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; Fuchs y col., Bio/Technology 9, 1370-72, 1991; Hay y col. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse y col. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty y col., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths y col. (1993) EMBO J. 12:725-734; Hawkins y col. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson y col. (1991) Nature 352:624-628; Gram y col. (1992) PNAS 89:357&3580; Garrad y col. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom y col. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; y Barbas y col. (1991) PNAS 88:7978-7982.

Si se desea, se pueden realizar modificaciones a los autoanticuerpos IL-1 α para potenciar su afinidad por la IL-1 α . Véase el documento de patente de Estados Unidos 6.914.128.

Procedimientos de evaluación

De acuerdo con la invención, una valoración baja de autoanticuerpos IL-1 α o la presencia de autoanticuerpos anti-IL-1 α humana de baja afinidad indica una probabilidad de que el individuo progresará hacia un trastorno relacionado con aterosclerosis o que la gravedad del trastorno relacionado con aterosclerosis del individuo aumentará. Un individuo tiene una "valoración baja" de autoanticuerpos IL-1 α si se detecta una respuesta positiva en un inmunoanálisis (por ejemplo, un radioinmunoanálisis ELISA o análisis de Western blot) en una dilución del suero del individuo de no más de aproximadamente 1:100 (por ejemplo, una dilución de 1:1, 1:10, 1:50 ó 1:100). Un individuo tiene una "valoración alta" de autoanticuerpos IL-1 α si puede detectarse todavía una respuesta positiva en el inmunoanálisis en una dilución de más de aproximadamente 1:100 (por ejemplo, 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, etc.). Los autoanticuerpos IL-1 α de baja afinidad tienen, típicamente, una K_d para la unión a IL-1 α entre 10 M⁻¹ y 10⁷ M⁻¹ (por ejemplo, 10,5 x 10², 10³, 5 x 10³, 10⁴, 5 x 10⁴, 10⁵, 5 x 10⁵, 10⁶, 5 x 10⁶ y 10⁷ M⁻¹).

Una muestra biológica de ensayo (que comprende, por ejemplo, sangre, plasma, suero) de un individuo se puede analizar para determinar una valoración de análisis de autoanticuerpos IL-1 α . El individuo puede estar sano, o aparentemente sano, o puede saber que padece un trastorno relacionado con la aterosclerosis. El trastorno relacionado con la aterosclerosis puede ser, por ejemplo, una enfermedad cerebrovascular, una enfermedad vascular periférica, una cardiopatía isquémica o una arteriopatía coronaria.

Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para detectar autoanticuerpos IL-1 α en la muestra biológica de análisis del individuo. Estos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, unión a IL-1 α radioetiquetado, ELISA, unión competitiva de IL-1 α a su receptor, IL-1 α etiquetado con FITC usando citometría de flujo, análisis de Western blot, etc. Véanse, por ejemplo, Bendtzen y col., Mol. Biotechnol. 14, 251-61, 2000; Ross y col., Blood 90, 2376-80, 1997; Hansen y col., Immunol. Lett. 30, 133, 1991; Svenson y col., Scand. J. Immunol. 29, 489-92, 1989; Svenson y col., Scand. J. Immunol. 32, 695-701, 1990; Svenson y col., Cytokine 4, 125-33, 1992; Saurat y col., J. Allergy Clin. Immunol. 88, 244-56, 1991. Los radioinmunoanálisis, tal como los descritos en Bendtzen y col., Mol. Biotechnol. 14, 251-61, 2000, son preferentes. Las valoraciones de autoanticuerpos frente a IL-1 α en una muestra biológica de análisis puede calcularse usando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Los ensayos pueden realizarse bien cualitativamente o bien cuantitativamente. Alternativamente, usando IL-1 α etiquetada con FITC para la identificación de linfocitos B que expresan un autoanticuerpo IL-1 α , la frecuencia de linfocitos B específicos de IL-1 α puede correlacionarse con los niveles de IL-1 α en suero y, por lo tanto, ser un indicador del riesgo de desarrollar aterosclerosis o un trastorno relacionado.

Composiciones farmacéuticas y procedimientos terapéuticos

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden autoanticuerpos IL-1 α de afinidad alta tal como se han definido anteriormente. Los autoanticuerpos IL-1 α pueden proceder de una única fuente (por ejemplo, un único individuo, un clon de un clon de linfocito B inmortalizado o un único hibridoma) o de dos o más fuentes, incluidas dos o más preparaciones de autoanticuerpos IL-1 α monoclonales o una mezcla de autoanticuerpos IL-1 α monoclonales o policlonales. Las composiciones farmacéuticas son no pirógenas.

Vehículos farmacéuticamente aceptables

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles y todos ellos. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de entre agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerina, etanol, etc., así como combinaciones de los mismos. En determinados casos se incluyen uno o más agentes isotónicos, tales como azúcares,

polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender, además, cantidades secundarias de coadyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la durabilidad en almacenamiento o la eficacia de los autoanticuerpos IL-1 α .

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden presentarse en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables o de infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferente depende del modo de administración deseado y de la aplicación terapéutica.

10 Por ejemplo, los autoanticuerpos IL-1 α pueden liofilizarse dando una forma cristalina muy pura. El producto final puede administrarse en forma de polvo liofilizado estéril adecuado para reconstitución e infusión parenteral. El polvo liofilizado puede envasarse en viales estériles, que contienen cada uno entre, por ejemplo, 1-1.000 mg de autoanticuerpos IL-1 α . Cada vial puede contener ingredientes no médicos adicionales, tales como uno o más de los siguientes: sacarosa, polisorbato 80, fosfato de sodio monobásico, monohidrato, polietilenglicol y fosfato de sodio
15 dibásico y dihidrato.

En algunas realizaciones, los autoanticuerpos IL-1 α de un vial pueden reconstituirse inmediatamente antes de su uso con, por ejemplo, 1-30 ml de agua estéril para inyección (USP), con un pH resultante de aproximadamente 7,2. Puede incluirse conservantes. Si el producto no contiene conservantes, el producto se usa, típicamente, inmediatamente después de la reconstitución y no se vuelve a introducir al recipiente ni se almacena. La dosis total del producto reconstituido puede diluirse adicionalmente hasta 50-500 ml con inyección de cloruro de sodio al 0,9%, USP. La concentración de la infusión puede variar entre 0,04 mg/ml y 40 mg/ml. La infusión puede iniciarse, por ejemplo, dentro de aproximadamente 1-4 horas después de la reconstitución. Preferentemente, la solución de infusión se administra durante un periodo de aproximadamente 2 horas usando un juego de infusión con un filtro (tamaño de poro 1,2 μ m o inferior) de unión a proteína inferior, en línea, estéril, no pirógeno.
25

En otras realizaciones, los autoanticuerpos IL-1 α se formulan en una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral, por ejemplo, en forma de una solución inyectable. Los autoanticuerpos IL-1 α pueden encontrarse en una forma farmacéutica líquida o liofilizada, por ejemplo en un vial incoloro o ámbar, ampolla o jeringa prellenada. Los tampones adecuados incluyen L-histidina, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio y fosfato de potasio. Puede usarse cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración 0-300 nM (por ejemplo, 150 mM para una forma farmacéutica líquida). Pueden incluirse crioprotectores en una forma farmacéutica liofilizada (por ejemplo, 0-10% de sacarosa, trehalosa o lactosa). También pueden incluirse en la forma farmacéutica liofilizada agentes voluminizadores, tales como manitol. Pueden usarse estabilizantes, tales como
35 L-metionina, tanto en formas farmacéuticas líquidas como liofilizadas. Pueden incluirse tensioactivos, por ejemplo polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para tratar trastornos relacionados con la aterosclerosis, incluidos cardiopatía isquémica, arteriopatía coronaria, arteriopatía periférica y enfermedad cerebrovascular. Los individuos se tratan, preferentemente, con preparaciones farmacéuticas que comprenden autoanticuerpos de la misma especie (es decir, los seres humanos se tratan con autoanticuerpos IL-1 α humanos). Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un individuo que tiene síntomas de uno o más trastornos o puede administrarse profilácticamente a individuos en riesgo de desarrollar uno o más de estos trastornos. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que reduce la cantidad de IL-1 α libre en el suero del individuo o que aumenta la valoración de autoanticuerpos IL-1 α en el individuo en al menos el doble. Preferentemente, los síntomas en el individuo de un trastorno relacionado con aterosclerosis se reducen (por ejemplo, calambres en las caderas, muslos o pantorrillas; angina de pecho).
45

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por medio de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas la vía/el modo de administración preferente es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Tal como apreciará un experto, la vía y/o el modo de administración variará en función de los resultados deseados. En algunas realizaciones, los autoanticuerpos IL-1 α pueden prepararse con un vehículo que protegerá los autoanticuerpos contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos, en general, por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.
50

Tanto la dosis como el programa de administración de preparaciones farmacéuticas de la invención puede variar en función del riesgo del individuo de desarrollar un trastorno relacionado con aterosclerosis, los síntomas y la gravedad de la enfermedad del individuo y la especie del individuo. Las dosis típicas de autoanticuerpos IL-1 α se encuentran en el intervalos de 0,001 μ g a 400 mg/kg (por ejemplo, 0,001 μ g, 0,01 μ g, 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1,0 μ g, 10 μ g, 100 μ g, 1 mg, 2 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg o 400 mg). La dosis puede administrarse, por ejemplo, diariamente durante 4 días, una vez por semana, dos veces al mes, una vez cada 12 semanas, una vez cada 24 semanas o una vez cada 90 días.
65

ES 2 346 691 T3

La descripción anterior describe la presente invención en general. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante referencia a los ejemplos específicos siguientes, que se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

5 Ejemplo 1

Correlación entre la cardiopatía isquémica y la valoración de autoanticuerpos IL-1 α

Se analizó la valoración de autoanticuerpos IL-1 α en muestras de suero de varones inscritos en el Copenhagen Male Study (CMS; Gyntelberg, Dan Med Bull 1973;20:1-4). La edad de los varones variaba de 53 a 75 años (media = 63). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

15

20

25

Quinto (nº de individuos)	Valoración de aAb-IL-1 α	Porcentaje con cardiopatía isquémica a los 10 años de seguimiento
1 (132)	0	20,5 %
2-4 (379)	baja	18,7 %
5 (137)	alta	12,2 %

30

Tal como se indica en la Tabla 1, a los 10 años de seguimiento de estos pacientes existía una disminución de la incidencia de cardiopatía isquémica en los individuos que presentaban valoraciones altas de autoanticuerpos IL-1 α .

Ejemplo 2

Anticuerpos frente a IL- en pacientes con cardiopatía isquémica

35

Se analizó el suero de 20 pacientes dentro de los 3 días posteriores a la cirugía de revascularización aortocoronaria y se comparó con 20 varones de la misma edad sin signos de cardiopatía isquémica. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

40

TABLA 2

45

50

	Varones con cardiopatía isquémica	Varones sanos	total
Autoanticuerpos + IL-	0	12	12
Autoanticuerpos – IL-	20	8	28
	20	20	40
P < 0,0001 (análisis exacto de Fischer, bilateral)			

55 Ejemplo 3

Aislamiento y estimulación de células mononucleares

Este ejemplo describe un procedimiento adecuado para aislar y estimular células mononucleares. Se obtienen células mononucleares (CMN) de donantes sanos usando donantes negativos en autoanticuerpos IL-1 α . Las CMN se purifican a partir de capas leucocíticas mediante centrifugación en LYMPHOPREP™ (Nycomed). Las células se lavan en RPMI 1640 que contiene L-glutamina 2 mM (Sigma, San Luis, Estados Unidos), 25 μ g/ml de gentamicina (GIBCO (R) BRL5 Life Technologies, Paisley, Escocia) y suero AB humano normal al 5%. Se genera IL-1 α nativo (nIL-1 α) estimulando las CMN a 37°C en aire humidificado con CO₂ al 5% en presencia de 100 μ g/ml de *E. coli* LPS (Difco Laboratories, Detroit, Estados Unidos). Después de 12 h, se recoge el sobrenadante y se almacena a -2°C hasta su uso.

65

Cromatografía de afinidad a proteína G

La cromatografía de afinidad de 100 μ l de muestras de plasma se lleva a cabo a 4°C usando columnas que contienen 2000 μ l de proteína G-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences). La solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 (PBS) suplementada con Triton X-100 al 0,1% (v/v) y gelatin (Sigma) al 0,1% (p/v) se usa como solución tampón de desplazamiento. El material unido se eluye con glicina 0,1 M/HCl, pH 2,4.

Análisis de especificidad

Los análisis de especificidad de anticuerpos se llevan a cabo con preparaciones diferentes de IL-1 α natural y recombinante junto con rIL-1 α radioetiquetado. Las muestras de plasma que dan positivas en anti-IL-1 α se diluyen para unirse a aproximadamente un 60% de un total de IL-1 α de 15 ng/200 μ l, incluida tanto la IL-1 α no etiquetada y la IL-1 α del trazador (15 pg/200 μ l de IL-1 α etiquetada con ¹²⁵I). La mezcla de plasma, trazador y competidor se preincuba durante 1 h a 37°C y después se somete a cromatografía de afinidad a proteína G. El recuento de las fracciones correspondientes al trazador unido a IgG y al libre se realiza en un contador gamma (contador gamma 1470 WIZARD™, Wallac, Finlandia). Además, la IL-1 α libre se mide por ELISA.

Análisis de muestras de plasma por RIA y ELISA

Las muestras de plasma se recogen por separado de donantes de sangre de acuerdo con los protocolos apropiados y los controles de calidad de los componentes de la sangre. Inicialmente, se analiza la anti-IL-1 α de las muestras en miniconjuntos. Se ajustan miniconjuntos de 90 muestras de plasmas al 25% (v/v) en PBS suplementado con Triton X-100 al 0,1% (v/v) (Sigma), gelatina al 0,1% (p/v) (Sigma) y EDTA 2 mM (Bie & Berntsen, Rødovre, Dinamarca) (PBS+) y se añade IL-1 α etiquetada con ¹²⁵I (3.500 cpm); el volumen final es de 200 μ l. Después de incubar durante 20 h a 4°C, las fracciones que representan al trazador unido a IgG y al trazador libre se separan mediante proteína G y se realiza el recuento. Además, se trata la actividad de unión de la anti-IL-1 α con respecto a la IL-1 α natural. Esto puede realizarse midiendo la recuperación de 1 ng/ml de IL-1 α natural en presencia de conjuntos de plasma al 25% en un ELISA de IL-1 α .

ELISA de IL-1 α

Este ELISA en sándwich se basa en anticuerpos IL-1 α antihumano de conejo policlonal específico. Ha sido completamente validado con respecto a la interferencia de anticuerpos IL-1 α humanos naturales. Véase Hansen y col., Scand. J. Immunol. 1991. 33: 777-781.; Hansen y col., Cytokine 1993. 5: 72-80.

Se cubren placas IMMUNO® MAXISORP® (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con IgG IL-1 α antihumano de conejo purificado con afinidad a proteína A. Los sitios no enlazados se bloquean con PBS que contiene polvo de leche desnatada la 4% (p/v), albúmina de suero humano al 1% (p/v) (HSA) (SSI, Copenhagen, Dinamarca) y TWEEN (R) 20 al 0,005% (v/v) (Merck). Los pocillos se lavan con PBS/TWEEN® 20 al 0,005% después de cada una de las etapas siguientes: 1) se incuban 100 μ l de analito durante 18 h a 4°C; 2) se incuban 100 μ l de IgG IL-1A anti-humano de conejo biotinilado (2 μ g/ml) en PBS/TWEEN® 20 al 0,005% (v/v)/HSA al 0,5% (p/v) durante 2 h a 20°C; 3) se incuban 100 μ l de estreptavidina-peroxidasa (0,1 μ g/ml; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Estados Unidos) en PBS/Tween 20 al 0,005% (v/v)/HSA al 0,5% (p/v) durante 45 min a 20°C. Las actividades enzimáticas se cuantifican usando diclorhidrato de 1,2-fenilendiamina (DakoCytomation). El intervalo de operación del ELISA es de 150 pg/ml a 5.000 pg/ml. Los coeficientes de variación interensayo e intraensayo se mantienen inferiores al 15%.

ELISA de IL-1 α de alta sensibilidad

Los niveles de IL en plasma se cuantifican usando un ELISA Quantikine High Sensitivity de IL-1A (R&D Systems, Minneapolis, MN, Estados Unidos). Según la homologación y las instrucciones del fabricante, este ELISA detecta la IL-1 α unida tanto al sIL-1 α R como a los autoanticuerpos IL-1 α .

Precipitación secundaria de anticuerpos y representaciones de Scatchard

Las características de unión de los anticuerpos IL-1 α en muestras de plasma seleccionadas positivas en anticuerpos se evalúan tal como se descrito previamente (Hansen y col., Eur. J. Immunol. 1995. 25:348-354). Las muestras de plasma apropiadamente diluidas se mezclan con IL-1 α etiquetado con ¹²⁵I que varía de 50.000 cpm a 700 cpm en PBS+ con un volumen final de 100 μ l. Después de incubar a 4°C durante 20 h, se añaden 200 μ l de IgG antihumana de conejo (A424; DakoCytomation) para precipitar más del 95% de la IgG. Después de incubar durante 1 h a 4°C, se añaden tres volúmenes de PBS. Las muestras se centrifugan inmediatamente durante 20 min (3000 x g a 4°C), después de lo cual se realiza el recuento de las cantidades de IL-1 α en las pellas (unidas a la IgG) y los sobrenadantes (libre). Las afinidades de los autoanticuerpos IL-1 α para la unión a IL-1 α se calculan usando representaciones de Scatchard.

REIVINDICACIONES

1. Uso de autoanticuerpos IL-1 α en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con la aterosclerosis en un sujeto carente de una valoración alta de autoanticuerpos IL-1 α , en el que una valoración alta de autoanticuerpos IL-1 α se define como una muestra biológica obtenida del sujeto que da un resultado positivo en un inmunoanálisis de autoanticuerpos IL-1 α cuando la muestra está diluida en más de 1:100.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que los autoanticuerpos IL-1 α tienen una K_a para la IL-1 α de entre 10⁷ y 10¹⁴ M⁻¹.

3. El uso de la reivindicación 1, en el que el individuo es un ser humano y los anticuerpos IL-1 α son anticuerpos humanos.

4. El uso de la reivindicación 1, en el que los autoanticuerpos IL-1 α se seleccionan del grupo constituido por:

- a) anticuerpos monoclonales,
- b) fragmentos F(ab)'₂,
- c) fragmentos F(ab)',
- d) fragmentos Fab,
- e) anticuerpos Fv bicatenarios,
- g) anticuerpos producidos combinando una porción variable de un autoanticuerpo de un isotipo con la región constante de otro isotipo,
- h) anticuerpos obtenidos examinando una colección,
- i) anticuerpos obtenidos a partir de linfocitos B,
- j) anticuerpos obtenidos a partir de sangre,
- k) anticuerpos obtenidos a partir de plasma,
- l) anticuerpos obtenidos a partir de suero, y
- m) anticuerpos de i), j), k) o l) obtenidos a partir de mezclas de muestras de dos o más individuos.

5. El uso de la reivindicación 1, en el que los autoanticuerpos son moléculas de inmunoglobulina recombinante producidas mediante expresión de ADNc procedente de linfocitos B o mediante expresión de secuencias de nucleótidos sintéticas que codifican las moléculas de inmunoglobulina.

6. El uso de la reivindicación 1, en el que el trastorno relacionado con la aterosclerosis es cardiopatía isquémica, arteriopatía coronaria, arteriopatía periférica o enfermedad cerebrovascular.

7. Un procedimiento de evaluación de un individuo para determinar el riesgo relativo del individuo de desarrollar un trastorno relacionado con la aterosclerosis, que comprende:

determinar una valoración de autoanticuerpos IL-1 α en el individuo diluyendo una muestra biológica obtenida del individuo y después analizar la muestra diluida resultante respecto a una respuesta positiva en un inmunoanálisis; y

identificar al individuo como poseedor de un riesgo creciente de desarrollar el trastorno relacionado con la aterosclerosis si la respuesta positiva en el inmunoanálisis se obtiene en una dilución de la muestra inferior a 1:100; o

identificar al individuo como poseedor de un riesgo decreciente de desarrollar el trastorno relacionado con la aterosclerosis si la respuesta positiva en el inmunoanálisis se obtiene en una dilución de la muestra superior a 1:100.