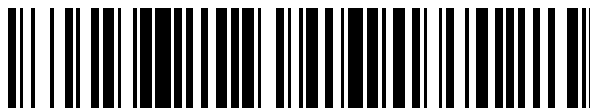


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 151**

21 Número de solicitud: 201031094

51 Int. Cl.:

A61K 31/422 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

16.07.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.02.2012

Fecha de la concesión:

03.12.2012

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA
CENTRO DE INNOVACION E TRANSFERENCIA
DE TECNOLOXIA EDIFICIO EMPRENDIA,
CAMPUS SUR
15782 Santiago de Compostela, (A Coruña), ES;
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN,
DESARROLLO E INNOVACIÓN DEL COMPLEJO
HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE SANTIAGO
(IDICHUS) y
SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS)**

72 Inventor/es:

**CONDE MURO, Carmen;
GONZALEZ MARTINEZ-PEDRAYO, Antonio;
GOMEZ-REINO CARNOTA, Juan Jesus;
OSORA PUENTE, Beatriz y
GARCIA PEREZ, Samuel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE INHIBIDORES DE EDG2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE.**

57 Resumen:

Uso de inhibidores de EDG2 para el tratamiento de la artritis reumatoide.

La presente invención se refiere al nuevo uso de inhibidores de EDG2 para el tratamiento de la artritis reumatoide, particularmente en aquellos pacientes que presentan niveles elevados de moléculas proinflamatorias a pesar de haber sido tratados con antiinflamatorios, es decir, que no responden a dichos tratamientos.

ES 2 373 151 B1

DESCRIPCIÓN

Uso de inhibidores de EDG2 para el tratamiento de la artritis reumatoide.

5 La presente invención se enmarca en el campo de la Biología Molecular, la Biología Celular, la Biotecnología y la Biomedicina. La presente invención se refiere al uso de inhibidores de EDG2 para el tratamiento de la artritis reumatoide, particularmente en aquellos pacientes que presentan niveles elevados de moléculas proinflamatorias a pesar de haber sido tratados con antiinflamatorios.

10

Estado de la técnica anterior

15 La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a las articulaciones periféricas y cursa con dolor, inflamación y, en muchos casos, incapacidad funcional, consecuencia de la destrucción progresiva del cartílago y hueso de las articulaciones afectas (Firestein GS; *Nature* 2003, 423:356-61; Huber LC *et al. Rheumatology* 2006, 45:669-675; Pope RM. *Nature Rev Immunol* 2002, 2:527-535).

20 La AR se caracteriza por la hiperplasia de los sinoviocitos residentes y por la infiltración de células inflamatorias del torrente circulatorio. Los sinoviocitos y las células inflamatorias secretan interleuquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y metaloproteasas que perpetúan la inflamación. La hiperplasia sinovial es un factor decisivo en la destrucción articular y hay evidencias que parecen indicar que el mecanismo responsable de dicha hiperplasia es la resistencia a la apoptosis de las células sinoviales. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que solamente un pequeño porcentaje de células sinoviales sufren apoptosis dependiente del ligando de Fas, TNF α (del inglés “*tumor necrosis factor α* ”) y TRAIL (del inglés “*TNF-related apoptosis-inducing ligand*”), a pesar de expresar receptores de muerte celular (Baier A *et al. Curr Opin Rheumatol* 2003, 15:274-279; Korb A *et al. Apoptosis* 2009, 14:447-454).

25 La apoptosis es un proceso muy regulado y fundamental en muchas situaciones fisiológicas. Se pueden distinguir dos vías principales, la vía extrínseca, mediante la activación de receptores de muerte, y la vía intrínseca o mitocondrial. En la vía extrínseca, la unión de FasL, TNF α y TRAIL a sus receptores lleva al reclutamiento de FADD (del inglés “*Fas associated Death Domain*”) y pro-caspasa-8, los cuales forman el DISC (del inglés “*Death-Inducing Signalling Complex*”), donde la caspasa-8 se activa. A su vez, la caspasa-8 activa la caspasa-3, que causa finalmente la fragmentación del ADN y la muerte celular. La vía mitocondrial se induce en situaciones de hipoxia, privación de factores de crecimiento y exposición a drogas citotóxicas, llevando a la liberación del citocromo c y a la activación de caspasa-9 mediada por Apaf-1 (del inglés “*Apoptosis protease-activating factor-1*”) (Ashkenazi A. *et al. Science* 1998, 281:1305-1308; Green DR *et al. Science* 2004, 305:626-629; Wajant H. *Science* 2002, 296:1635-1636).

30 En los últimos años se han desarrollado nuevos tratamientos biológicos basados en la inhibición de citoquinas inflamatorias como TNF α , interleuquina 1 (IL-1) e interleuquina 6 (IL-6), que han permitido prevenir en muchos casos la progresión de la enfermedad hacia la destrucción del cartílago y hueso. Sin embargo, alrededor de un 40% de los pacientes no responden a estas terapias y, en un porcentaje aún mayor, la respuesta es parcial (Chen YF *et al. Health Technol Assess*, 2006, 10(42): iii-iv, xi-xiii, 1-229.; Rubbert-Roth A *et al. Arthritis Res Ther* 2009, 11 Sup 1 :S1).

35 El receptor de ácido lisofosfatídico 1 (LPA1; LPAR1, EDG2, Gpcr26, GPR26, Mrec1.3, rec.1.3, vzg-1, VZG1) es un receptor acoplado a proteínas G que en humanos está codificado por el gen *LPAR1* o *EDG2*. Nochi y colaboradores (J. Immunology, 2008, 181 (7):5111-9) han descrito que el receptor de ácido lisofosfatídico 1 (LPAR1 o EDG2) se expresa en altos niveles en los sinoviocitos de pacientes con AR y que la unión del ácido lisofosfatídico (LPA) a este receptor activa la expresión de la ciclooxigenasa 2, una molécula implicada en la inflamación. Además, Zhao C y colaboradores (Mol Pharmacol, 2008; 73:587-600) han mostrado que la unión del LPA a este receptor también induce, en sinoviocitos de pacientes con AR, la secreción de otras citoquinas inflamatorias como IL-6 e IL-8. Mototani y colaboradores (Hum Mol Genet. 2008, 15; 17(12):1790-7) han descrito que determinados polimorfismos en el gen *EDG2* aumentan la probabilidad de padecer osteoartritis de rodilla. Ikegawa y Mototani (EP2153847A1) han descrito el uso de agentes inhibitorios de EDG2 para el tratamiento de una variedad de afecciones que cursan con destrucción del cartílago y el hueso, entre las que se menciona la artritis reumatoide. Estos autores describen el efecto antiinflamatorio de los agentes inhibitorios de EDG2 y proponen su uso para disminuir la inflamación en todos aquellos pacientes que sufran enfermedades del cartílago y el hueso.

40 La mayor parte de los tratamientos de la AR, tanto farmacológicos como biológicos, están dirigidos a disminuir la inflamación, por lo que aquellos pacientes que no responden a tratamientos antiinflamatorios no disponen de ninguna solución. Por ello, se necesita un nuevo enfoque terapéutico para controlar la enfermedad en la totalidad de los pacientes con AR, incluidos aquellos que no responden a tratamientos antiinflamatorios.

Descripción de la invención

65 La presente invención se refiere al nuevo uso de inhibidores de EDG2 para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), particularmente en aquellos pacientes que presentan niveles elevados de moléculas proinflamatorias tras el tratamiento con antiinflamatorios, es decir, que no responden a dichos tratamientos.

Los autores de la presente invención han demostrado que la inhibición de EDG2 corrige la hiperplasia de los sinoviocitos en un ambiente inflamatorio, con $TNF\alpha$ elevado, el cual media la apoptosis de dichas células. Por tanto, los autores de la presente invención han demostrado que la inhibición de EDG2 es eficaz para mejorar la evolución clínica de la AR en un ambiente inflamatorio donde hay niveles elevados de moléculas inflamatorias y, más concretamente, donde hay niveles elevados de $TNF\alpha$.

Además, los autores de la presente invención han observado que la inhibición de EDG2 no corrige la inflamación, y por tanto no disminuye los niveles de las moléculas inflamatorias.

Por tanto, la presente invención pretende aportar una solución al tratamiento de la AR de forma específica en aquellos pacientes que no responden a las terapias convencionales, conocidas en el estado de la técnica, y cumplen con los requisitos especificados a lo largo de la invención relacionados con los niveles de moléculas proinflamatorias, aportando con ello al campo de la técnica una herramienta muy útil en la solución de un problema todavía sin resolver. Así pues, el uso de los inhibidores de EDG2 en este tipo de pacientes supone una mejora de la calidad de vida de los mismos, aspecto que hasta la fecha ha permanecido desatendido.

En este sentido, la presente invención se refiere al uso de una composición farmacéutica (en adelante composición farmacéutica de la invención) que comprende al menos un inhibidor de una proteína cuya secuencia tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1 para preparar un medicamento para el tratamiento de la AR. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende al menos un inhibidor de una proteína cuya secuencia tiene al menos un 97%, más preferiblemente un 98%, aún más preferiblemente un 99% de identidad con SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende al menos un inhibidor de una proteína cuya secuencia es SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del receptor de ácido lisofosfatídico 1 o EDG2 de humano. Las secuencias de aminoácidos de EDG2 de chimpancé, vaca, perro, ratón, rata y gallo presentan una alta homología con la secuencia de humano, como muestra la tabla 1.

TABLA 1

% de identidad de secuencia para el gen y la proteína EDG2 de humanos con distintas especies

Especie	% Identidad	
	Proteína	ADN
<i>Homo sapiens</i>		
<i>Pan troglodytes</i>	100	100
<i>Canis lupus familiaris</i>	98,6	94,6
<i>Bos taurus</i>	96,7	91,7
<i>Rattus norvegicus</i>	97,3	89,6
<i>Mus musculus</i>	96,4	90,2
<i>Gallus gallus</i>	95,5	83,7

El término “inhibidor” se refiere a una sustancia o molécula capaz de reducir o eliminar la actividad del receptor EDG2, bien bloqueando su función o bien reduciendo su presencia.

La expresión “% de identidad de secuencia” se refiere al porcentaje de aminoácidos de una secuencia candidata que es idéntico a los aminoácidos de SEQ ID NO: 1, después de alinear las secuencias para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. El % de identidad de secuencia se puede determinar por cualquiera de los procedimientos o algoritmos establecidos en la técnica, tales como ALIGN o BLAST. En el presente documento, el % de identidad de secuencia se calcula dividiendo el número de aminoácidos que son idénticos después de alinear SEQ ID NO: 1 y la secuencia candidata, entre el número total de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y multiplicando el resultado por 100.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se usa para el tratamiento de la AR de pacientes que presentan mayor cantidad de al menos una molécula proinflamatoria, respecto de un control, a pesar de haber sido tratados con al menos un agente antiinflamatorio. Preferiblemente, la molécula proinflamatoria es TNF . Aún más preferiblemente, es $TNF\alpha$.

El término “cantidad”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere al valor absoluto o relativo que se obtiene al detectar y cuantificar una molécula proinflamatoria en una muestra aislada de un paciente de AR. Este dato se puede comparar con el obtenido para individuos sanos, que sirven de control.

Un agente antiinflamatorio puede ser cualquier molécula conocida que tenga un efecto antiinflamatorio. Se conocen múltiples agentes antiinflamatorios, entre los que se encuentran los AINES (antiinflamatorios no esteroides), corticoides, metotrexato, anti-TNF o anti-interleuquina 6 (anti-IL-6). Las dos últimas son terapias basadas en el bloqueo de TNF o de IL-6 mediante el uso de anticuerpos.

5 En la presente descripción, se entiende por moléculas proinflamatorias aquellas moléculas que participan en la inflamación, promoviendo dicho proceso. Existe una gran variedad de moléculas proinflamatorias, entre las que se encuentran la interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 8 (IL-8), las prostaglandinas, el óxido nítrico, el interferón γ y el TNF. Además, existen algunas enzimas proinflamatorias, como la fosfolipasa de tipo II o PLA₂, la ciclooxigenasa 2 (COX-2) o la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), que activan la síntesis de factor activador de plaquetas, leucotrienos, prostanooides u óxido nítrico. Dentro de los mediadores inflamatorios implicados en la patogénesis de la AR se encuentran las quimioquinas. Estas moléculas son potentes quimioatrayentes de las células implicadas en la respuesta inflamatoria y se ha detectado la expresión de quimioquinas y de sus receptores en el líquido sinovial y en los sinoviocitos de pacientes con AR. El factor de necrosis tumoral o TNF α (del inglés “*tumor necrosis factor alpha*”) es el primer miembro de la superfamilia de TNF, a la que pertenecen algunas citoquinas implicadas en la fase aguda del proceso inflamatorio. Los miembros de esta superfamilia tienen un origen filogenético común y la mayoría tienen también una función común: promueven la apoptosis y la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Los autores de la presente invención han estudiado los niveles de algunas moléculas proinflamatorias, como son la IL-6, la IL-8, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2), la COX-2, la colagenasa 1 (MMP-1) y la estromelisina-1 (MMP-3).

La IL-6 es una glucoproteína segregada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la interleuquina 1 y se incrementa en respuesta a TNF α . Es una citoquina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria.

La IL-8 es una citoquina de la familia de las quimioquinas, de naturaleza proinflamatoria. Su síntesis se realiza en fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión, la formación de lípidos bioactivos y amplifica la respuesta inflamatoria local.

MCP-1 induce a los monocitos a entrar en el tejido desde el torrente sanguíneo para convertirse en macrófagos tisulares.

COX-2 es responsable de la biosíntesis de prostanooides implicados en respuesta inflamatoria.

La MMP-1 y la MMP-3 son enzimas proteolíticas encargadas de la degradación de la matriz extracelular en la AR. MMP-3 desempeña un papel importante como mediadora de la respuesta inflamatoria en la articulación.

En una realización preferida, el uso de la invención comprende un aumento en la apoptosis de las células sinoviales. Preferiblemente, dicha apoptosis es mediada por TNF α . Cuando la apoptosis es mediada por TNF α , el ligando TNF α se une a su receptor y activa así la señalización celular que dirige hacia la muerte celular controlada.

En una realización preferida de la invención, el inhibidor es un ácido nucleico (en adelante llamado ácido nucleico de la invención). Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia nucleotídica que codifica para un ARN de interferencia de una proteína cuya secuencia tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica que codifica para el ARN de interferencia tiene como secuencias diana SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y/o SEQ ID NO: 21. En otra realización preferida de la invención, el inhibidor es un ARN de interferencia de una proteína cuya secuencia tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el inhibidor es un ARN de interferencia cuyas secuencias diana son SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y/o SEQ ID NO: 21.

Un ARN de interferencia es una pequeña molécula de unos 20-25 nucleótidos de ARN de doble cadena que interfiere con la traducción de un ARN mensajero (ARNm) y por tanto impide la producción de un péptido o proteína, provocando su deficiencia. En la presente memoria, siRNA (del inglés “*small interfering RNA*”) se refiere a un ARN de interferencia.

Una secuencia diana de un ARN de interferencia o de un ADN que codifica para un ARN de interferencia es una secuencia del ARNm del gen cuya expresión se interfiere, donde se van a unir los ARN de interferencia para impedir la producción del péptido o proteína codificado por dicho ARNm.

En una realización preferida de la invención, el inhibidor es un vector que comprende el ácido nucleico de la invención. En una realización preferida de la invención, el ácido nucleico es un vector apropiado para la terapia génica. Un vector es una molécula de ácido nucleico usada para transferir material genético a una célula. Aparte de dicho material genético, un vector también puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la traducción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones.

El término “terapia génica”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a la transferencia de un material genético de interés (ADN o ARN) a un huésped para tratar o prevenir una enfermedad o afección genética o adquirida. El material genético de interés codifica un producto (un polipéptido o proteína, un péptido o un ARN funcional) cuya producción *in vivo* se desea. Por ejemplo, el material genético de interés puede codificar un ARN de interferencia de valor terapéutico.

En otra realización preferida de la invención, el inhibidor es un antagonista de EDG2. Preferiblemente, el antagonista es ki16425.

El término “antagonista”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a una sustancia que se une a un receptor impidiendo la unión del agonista de dicho receptor, sin provocar ningún efecto. En este caso, el antagonista impide la unión del ácido lisofosfatídico (LPA) a su receptor, EDG2.

En otra realización preferida de la invención, el inhibidor de EDG2 es un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo.

El término “anticuerpo”, tal y como se emplea en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión y fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con una proteína. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

En una realización preferida, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral. En otra realización preferida, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral. Preferiblemente, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración intravenosa. Preferiblemente, el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración intraarticular. La administración oral es aquella que se realiza por la boca. La administración parenteral es aquella que se realiza a través de una inyección o infusión. Algunos ejemplos de administración parenteral son la inyección subcutánea, intravenosa, intraarticular o intramuscular.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. La expresión “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de una sustancia suficiente para lograr el propósito pretendido. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un inhibidor de EDG2 es una cantidad suficiente para reducir la activación de la señalización de dicho receptor, que puede ser extrapolada a partir de los datos obtenidos en ensayos *in vitro* como se describe en Gülden y Seibert, 2003. *Toxicology*, 189: 211-222. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un inhibidor para tratar una enfermedad o trastorno es una cantidad del inhibidor suficiente para reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad o trastorno. La cantidad eficaz de una sustancia dada variará con factores tales como la naturaleza de la sustancia, la vía de administración, el tamaño y la especie del animal que va a recibir la sustancia y el propósito por el que se da la sustancia. La cantidad eficaz en cada caso individual la puede determinar empíricamente el experto en la materia de acuerdo con los procedimientos establecidos en la técnica.

En una realización preferida, el medicamento además comprende un excipiente farmacológicamente aceptable. El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción del inhibidor, lo estabiliza o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término “farmacológicamente aceptable” se refiere a que el compuesto al que hace referencia esta permitido y evaluado de modo que es seguro, no es tóxico y no causa efectos adversos a los organismos a los que se administra.

Otra realización preferida se refiere al uso de la composición farmacéutica donde el medicamento comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además, el vehículo debe ser farmacológicamente aceptable. Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensoactivos. El vehículo puede ser una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los inhibidores de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación del inhibidor, así como también de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo es el diluyente.

En una realización preferida, el medicamento además comprende otra sustancia activa. En una realización preferida, el medicamento se administra como terapia combinada. Una terapia combinada se refiere a que el medicamento se administra junto con otro medicamento. Preferiblemente, este otro medicamento es una sustancia inmunomoduladora, es decir, una sustancia capaz de alterar la respuesta del sistema inmune activándola, suprimiéndola o modificando algunos de sus mecanismos. Más preferiblemente, la sustancia inmunomoduladora es el anticuerpo anti-CD20 (Rituximab) o la proteína de fusión CTLA4-inmunoglobulina (Orencia, abatacept, belatacept).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig 1. *La deficiencia de EDG2 aumenta la apoptosis de los sinoviocitos en presencia de TNF α .* Muestra la actividad de caspasa 3/7, que es significativamente mayor en los sinoviocitos deficientes en EDG2 y especialmente en presencia de TNF α ($p=0,00058$, test de Wilcoxon). La caspasa 3/7 activada hidroliza el sustrato luminogénico DEVD-aminoluciferina y genera una señal luminiscente directamente proporcional a la actividad de caspasa 3/7, por lo que esta actividad está expresada en RLU (unidades relativas de luminiscencia).

Fig 2. Muestra el cambio en la expresión génica en 7 líneas de sinoviocitos con siRNA de EDG2 relativo a la expresión en las mismas líneas con siRNA inespecífico (control). La deficiencia de EDG2 incrementa la transcripción inducida por TNF α de IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2 y MMP-1, y reduce la transcripción de MMP-3.

Fig 3. Muestra la cantidad de IL-6, IL-8 y MCP-1 en sobrenadantes de cultivo de cuatro líneas de sinoviocitos reumatoides transfectadas con siRNA EDG2 o con siRNA inespecífico control. La deficiencia de EDG2 incrementa la producción mediada por TNF α de estos mediadores inflamatorios.

Fig 4. Muestra una disminución significativa del *Score* clínico de la artritis reumatoide en los ratones tratados con Ki16425 respecto a los ratones control, tratados con vehículo ($p=0,03$, día 3; $p=0,0068$, día 6; $p=0,0018$, día 7; $p=0,00072$, día 8 y $p=0,00072$, día 9).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del uso de inhibidores de EDG2 para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR).

Ejemplo 1

Deficiencia de EDG2 en sinoviocitos de pacientes con AR in vitro

Se transfectaron 7 líneas celulares de sinoviocitos tipo fibroblasto (FLS) con siRNA de EDG2 o con un siRNA control inespecífico. Se estimularon con 10 ng/ml de TNF α y se analizó la apoptosis tras 48 horas de tratamiento. Mediante PCR cuantitativa o en tiempo real se valoró la eficiencia de la supresión de EDG2, que fue superior al 90% en todas las líneas celulares transfectadas.

Se analizó la apoptosis de dichas células mediante la determinación de la actividad de caspasa 3/7 y la cuantificación de oligonucleosomas. Se observó un incremento significativo de la apoptosis inducida por TNF α en sinoviocitos deficientes en EDG2 comparados con los controles (Figura 1, $p=0,00058$, test de Wilcoxon). Resultados similares se obtuvieron en el análisis de liberación de nucleosomas.

Para analizar el efecto de la supresión de EDG2 sobre la respuesta inflamatoria inducida por TNF α en sinoviocitos reumatoides, se determinaron los niveles de ARN mensajero (ARNm) de IL-6, IL8/CXCL8, MCP-1/CCL2, COX-2, MMP-1 y MMP-3 (estromielisina 1) tras la estimulación con TNF α , mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Como se observa en la Figura 2, la supresión de EDG2 indujo un incremento de la transcripción inducida por TNF α de IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2 y MMP-1. Sin embargo, se observó una reducción de la transcripción de MMP-3.

Se confirmó el resultado obtenido por PCR cuantitativa analizando por ELISA la producción de IL-6, IL-8 y MCP-1 en sobrenadantes de cultivo de cuatro líneas de sinoviocitos reumatoides transfectados con siRNA EDG2 o con siRNA inespecífico. Como se observa en la Figura 3, la supresión de EDG2 incrementó la producción mediada por TNF α de estos mediadores inflamatorios.

El conjunto de estos resultados indican que la sensibilización a la apoptosis mediada por TNF α tras la supresión de EDG2 en sinoviocitos reumatoides no se acompaña de una reducción de la respuesta inflamatoria mediada por TNF α .

Líneas celulares de FLS

Este trabajo se llevó a cabo en 7 líneas primarias de FLS procedentes de pacientes con AR. En el laboratorio se aislaron sinoviocitos a partir de tejido sinovial de pacientes con AR sometidos a cirugía de reemplazamiento articular o a biopsia sinovial. Todos los pacientes cumplían los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) de 1987 para el diagnóstico de AR (Arnett FC y cols. 1988 *Arthritis Rheum.* 31 (3):315-24). Los sinoviocitos se utilizaron entre los pases 4 y 8 en todos los experimentos, se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), 1% penicilina-estreptomicina y 1% L-glutamina a 37°C y 5% CO₂ para su posterior uso.

Transfección con ARN de interferencia (siRNA) en sinoviocitos reumatoides

Esta técnica fue utilizada para suprimir la expresión del Receptor de LPA asociado a proteínas G: EDG2 o LPA1, en sinoviocitos de pacientes con AR. Se sembraron 8,5 x 10⁴ células/pocillo en pocillos de placas P6 en DMEM-10% FBS y se incubaron toda la noche a 37°C. Después se retiró el medio y se añadió DMEM 10% FBS sin antibiótico durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, las células se transfectaron con 20 nM de siRNA de EDG2 o con siRNA control inespecífico (Dharmacon, Fisher Bioblock Scientific, Cedex, France) en 1,25 µg/ml del reactivo de transfección Dharmafect (Dharmacon), diluido en medio OPTI-MEM I (Gibco). Transcurridas 24 horas, se retiró el medio de transfección y se añadió DMEM-10% FBS. Se comprobó la eficiencia del silenciamiento para EDG2 mediante PCR en tiempo real y en todos los casos fue superior al 90%. Los experimentos se realizaron 48-96 horas posteriores a la transfección.

Tratamiento con TNF-α de sinoviocitos reumatoides con siRNA de EDG2 o con un siRNA inespecífico

Los sinoviocitos reumatoides se privaron de suero durante 16 horas en DMEM-1% FBS. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se estimularon con TNF-α a una concentración de 10 ng/ml. El tiempo de tratamiento fue puesto a punto en función del ensayo a realizar. Así pues, los ensayos de expresión y producción de las citoquinas IL-6 e IL-8, la quimioquina MCP-1 y las metaloproteasas MMP-3 y MMP1, y la enzima COX-2 (del inglés “*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*”), se realizaron a las 12 horas después de iniciado el tratamiento, y los ensayos de apoptosis se llevaron a cabo a las 48 horas de estimulación con TNF-α (Figura 2).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Mediante esta técnica se analizaron los niveles de expresión de ARNm de diferentes genes en sinoviocitos reumatoides humanos.

En primer lugar, se comprobó el nivel de silenciamiento para LPA1 en sinoviocitos tratados con el siRNA de EDG2 frente a la expresión basal en sinoviocitos control. Para ello, se extrajo el ARN total de los sinoviocitos, cultivados en pocillos de placas P6 (8,5 x 10⁴ células/pocillo), mediante el kit Rneasy Kit y el RNase-Free DNase Set (Qiagen GmbH), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) utilizando el kit Brilliant II SYBR Green Single Step QRT-PCR Master Mix (Stratagene). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 2-5 ng de ARN; 0,5 µM de cada cebador; 1,5 mM de MgCl₂; 30 nM del colorante de referencia ROX; 0,04x de StrataScript RT/RNase block enzyme mixture y 1x de SYBR QRT-PCR master mix. Las muestras se analizaron por duplicado y los cebadores que se utilizaron se muestran en la Tabla 2.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Cebadores empleados para PCR en tiempo real y tamaño de los fragmentos amplificados

Gen	Cebador sentido	Cebador antisentido	Fragmento (pb)
EDG2	(SEQ ID NO: 2) TGTCTCGGCATAGTTCTGGA	(SEQ ID NO: 3) CATTTCTTTGTCGCGGTAGG	200
IL-6	(SEQ ID NO: 4) GTGGCTGCAGGACATGACAA	(SEQ ID NO: 5) TGAGGTGCCCATGCTACATTT	100
IL-8	(SEQ ID NO: 6) AAGAGCCAGGAAGAAACCACC	(SEQ ID NO: 7) GGAAAACGCTGTAGGTCAGAA	147
MCP-1	(SEQ ID NO: 8) ACTCTCGCCTCCAGCATGAA	(SEQ ID NO: 9) TTGATTGCATCTGGCTGAGC	100
Cox-2	(SEQ ID NO: 10) TCCTATTATACTAGAGCCCTTCCT	(SEQ ID NO: 11) TTCCACAATCTCATTGAATCAGG	55
MMP-3	(SEQ ID NO: 12) CTGGGAAAATCAGCCATTGT	(SEQ ID NO: 13) AGTCAGGGGGAGGTCCTAAA	181
MMP-1	(SEQ ID NO: 14) AGTGACTGGGAAACCAGATGCTGA	(SEQ ID NO: 15) GCTCTTGGCAAATCTGGCGTGTA	115
β -actina	(SEQ ID NO: 16) AGAAGGATTCCTATGTGGGCG	(SEQ ID NO: 17) CATGTCGTCCCAGTTGGTGAC	100

Las condiciones de amplificación para *EDG2* fueron las siguientes: Síntesis del ADN copia (ADNc) a 50°C durante 30 minutos; desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 30 segundos. Finalmente, se realizó una curva de disociación de 55°C a 95°C incrementando 1°C cada segundo. Se utilizó β -actina como normalizador.

También se analizaron los niveles de ARNm de IL-6, IL-8, MCP-1, COX-2, MMP-3 y MMP1 en cultivos de sinoviocitos de pacientes con AR tratados con el siRNA de EDG2 o con un siRNA inespecífico, sometidos al estímulo con TNF- α , mediante PCR en tiempo real en un solo paso.

Las condiciones de amplificación para IL-6, IL-8 y MCP-1 fueron: síntesis del ADNc a 50°C durante 30 minutos; desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos e hibridación a 63°C durante 1 minuto. Finalmente, se realizó una curva de disociación de 55° a 95°C incrementando 1°C cada segundo.

Las condiciones de amplificación para COX-2 fueron las siguientes: síntesis del ADNc a 50°C durante 30 minutos; desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, se realizó una curva de disociación de 55° a 95°C incrementando 1°C cada segundo.

Las condiciones de amplificación para MMP-3 fueron las siguientes: síntesis del ADNc a 50°C durante 30 minutos; desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 63°C durante 1 minuto y elongación a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, se realizó una curva de disociación de 55° a 95°C incrementando 1°C cada segundo.

Las condiciones de amplificación para MMP-1 fueron las siguientes: síntesis del ADNc a 50°C durante 30 minutos; desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación y elongación a 57°C durante 1 minuto. Finalmente se realizó una curva de disociación de 55° a 95°C incrementando 1°C cada segundo.

Se utilizó β -actina como normalizador. La pureza de los productos amplificados se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa y determinación de la curva de disociación de cada muestra. El análisis de los resultados se realizó mediante el método comparativo Ct. $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en el que:

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{gen} - Ct_{actina}] \text{ sinoviocitos transfectados con siRNA inespecífico} - [Ct_{gen} - Ct_{actina}] \text{ sinoviocitos transfectados con siRNA EDG2}$$

Para los sinoviocitos transfectados con siRNA inespecífico $\Delta\Delta Ct = 0$ y $2^0 = 1$.

Para los sinoviocitos transfectados con siRNA EDG2 el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ indica el incremento o la disminución en los niveles de expresión génica respecto a los transfectados con siRNA inespecífico.

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Mediante esta técnica se analizaron los niveles de expresión de las citoquinas IL-6, IL-8 y de la quimioquina MCP-1 presentes en el sobrenadante de cultivo de sinoviocitos de pacientes con AR tratados con siRNA de EDG2 o con un siRNA inespecífico. Se sembraron sinoviocitos reumatoides (10^4 células/pocillo) en placas de 96 pocillos en DMEM-10% FBS y se privaron de suero durante 16 horas en DMEM-1% FBS. Los sinoviocitos tratados con siRNA de EDG2 o con un siRNA inespecífico se estimularon con 10 ng/ml de TNF- α durante 12 horas, momento en el que se recogió el sobrenadante para su análisis posterior.

La determinación de citoquinas se llevó a cabo mediante los kits de ELISA para IL-6, IL-8 y MCP-1 (OptEIA ELISA Sets, BD Pharmingen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayos de apoptosis

El porcentaje de apoptosis de los sinoviocitos reumatoides se analizó mediante dos técnicas diferentes, ELISA de apoptosis y determinación de la actividad de caspasa 3/7 (Fig 1).

Después de suprimir la expresión de *EDG2* en sinoviocitos reumatoides mediante siRNA, se sembraron 3×10^3 células/pocillo en placas P96 en DMEM-10% FBS y se privaron de suero durante 16 horas en DMEM-1% FBS. Posteriormente, se retiró el medio y se estimularon con 1 μ g/ml de TNF- α durante 48 horas en DMEM-1% FBS.

El porcentaje de apoptosis se determinó mediante el Kit Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics, Spain), que detecta los mono y oligonucleosomas liberados al citoplasma durante la apoptosis.

Para cuantificar la actividad de caspasa 3/7, se sembraron 10×10^3 células/pocillo en placas P96 en DMEM-10% FBS y se privaron de suero durante 16 horas en DMEM-1% FBS. Posteriormente, se retiró el medio y se estimularon con 1 μ g/ml de TNF- α durante 48 horas en DMEM-1% FBS. La actividad de caspasa 3/7 en sinoviocitos tratados con el siRNA de EDG2 o con un siRNA inespecífico fue determinada mediante el kit Caspase-Glo^R 3/7 Assay (Promega), que determina la presencia de caspasa 3/7 activada mediante el procesamiento de un sustrato luminogénico (DEVD-aminoluciferina). Para ello, se incubaron las células durante 1 h con el reactivo reconstituido del kit y la caspasa 3/7 activada de las células generó la señal luminiscente tras la hidrólisis del sustrato luminogénico DEVD-aminoluciferina. Dicha señal fue, por lo tanto, proporcional a la actividad de caspasa 3/7 y se midió en un lector de microplacas Fluostar OPTIMA (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

Ejemplo 2

Tratamiento de la AR *in vivo* con una antagonista de EDG2

Se indujo artritis en un total de 41 ratones C57BL/6 de 8-10 semanas de edad mediante la inyección de 2 dosis de 100 μ l de un suero procedente de ratones artríticos K/BxN a día 0 y día 2.

22 ratones fueron tratados con 4 dosis de 20 mg/kg del inhibidor Ki16425 en los días 0, 1, 2 y 3 y 19 ratones fueron tratados con vehículo siguiendo la misma pauta terapéutica. Se analizó la evolución clínica de la artritis hasta el día 9.

La evolución clínica de la artritis (Fig 4) mostró una disminución significativa del Score clínico de la artritis en los ratones tratados con Ki16425 respecto a los controles tratados con vehículo ($p = 0,03$, día 3; $p = 0,0068$, día 6; $p = 0,0018$, día 7; $p = 0,00072$, día 8 y $p = 0,00072$, día 9), lo que indica una mejora en los resultados clínicos en los animales tratados con el antagonista de EDG2.

Inducción de artritis pasiva en ratones y evaluación clínica de la artritis

Se indujo artritis en ratones C57BL/6 machos y hembras de 8-10 semanas de edad utilizando el modelo de artritis pasiva K/BxN. Los ratones K/BxN se obtuvieron al cruzar ratones transgénicos KRN en fondo B6 con ratones NOD. Estos ratones transgénicos desarrollan artritis severa, que se inicia precozmente, a las 2-3 semanas de edad. La inyección de suero obtenido de ratones K/BxN de 4-8 semanas de edad en los ratones C57BL/6, provoca el desarrollo de una artritis con características similares a la AR humana.

Los ratones C57BL/6 se trataron con el inhibidor competitivo de los receptores EDG, Ki16425 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA), disuelto en DMSO/PBS (1:3) o se inyectaron sólo con el vehículo: DMSO-PBS (1:3). El compuesto Ki16425 (ácido 3-[[[4-[4-[[[1-(2-chlorophenyl)ethoxy]carbonilo]amino]-3-methyl-5 isoxazolyl]phenyl]metil]thio]-propanoico) es un potente inhibidor de los receptores EDG2/LPA1 ($K_i=0,35 \mu\text{M}$) y EDG7/LPA3 ($K_i=0,93 \mu\text{M}$) y, en menor medida, inhibe el receptor EDG4/LPA2 ($K_i=6,5 \mu\text{M}$).

Se inyectaron un total de 22 ratones con Ki16425 y 19 ratones con vehículo, en 5 experimentos diferentes. El esquema terapéutico fue el siguiente: se indujo artritis mediante inyección intraperitoneal de 100 μl de suero K/BxN en los días 0 y 2. Los ratones se trataron durante 4 días con Ki16425 a una dosis de 20 mg/kg ratón/día. La primera dosis fue administrada el día 0, 30 minutos antes de la inyección de suero K/BxN. La segunda dosis se administró el día 1; la tercera, el día 2, 30 minutos antes de la inyección de suero K/BxN y la última se administró el día 3. Los ratones control se inyectaron con DMSO/PBS (1:3) siguiendo el mismo esquema terapéutico.

La evolución clínica de la artritis en las patas traseras y delanteras fue evaluada por dos observadores independientes los días 3, 6, 7, 8 y 9, siguiendo una escala semicuantitativa de 0 a 4: grado 0, sin inflamación; grado 1, ligero edema y eritema en la articulación; grado 2, moderado edema y eritema; grado 3, severo edema y eritema; grado 4, máxima inflamación con rigidez de la articulación. Siguiendo esta escala, se obtiene el "Score clínico" o graduación clínica de la severidad de la artritis. El máximo valor posible de este "Score" para cada ratón es de 16 y corresponde a la suma de los valores máximos obtenidos en cada una de las 4 patas. Los ratones fueron sacrificados a día 9 para la extracción de las articulaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de una proteína cuya secuencia tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 1 para preparar un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide, donde dicho inhibidor es el antagonista del receptor EDG2, ki16425.
- 10 2. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación anterior para el tratamiento de la artritis reumatoide de pacientes que presentan mayor cantidad de al menos una molécula proinflamatoria, respecto de un control, a pesar de haber sido tratados con al menos un agente antiinflamatorio.
3. Uso según la reivindicación anterior donde la molécula proinflamatoria es TNF.
4. Uso según la reivindicación anterior donde la molécula proinflamatoria es TNF α .
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración oral o parenteral.
- 20 6. Uso según la reivindicación anterior donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración intravenosa.
7. Uso según la reivindicación anterior donde el medicamento se presenta en una forma adaptada a la administración intraarticular.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medicamento además comprende un excipiente farmacológicamente aceptable.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medicamento además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el medicamento además comprende otra sustancia activa.

35

40

45

50

55

60

65

FIG 1

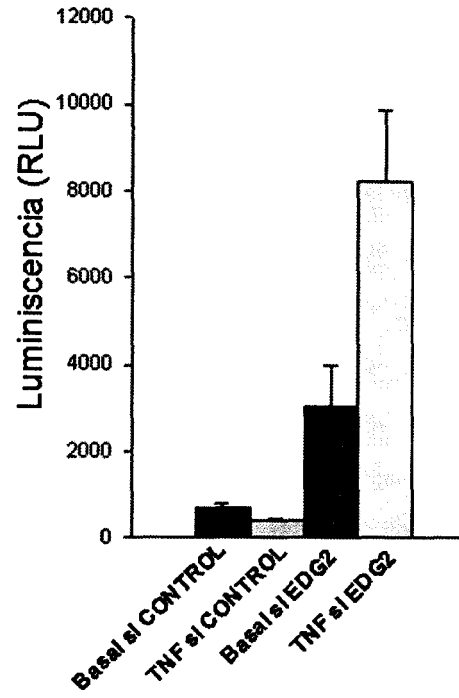


FIG 2

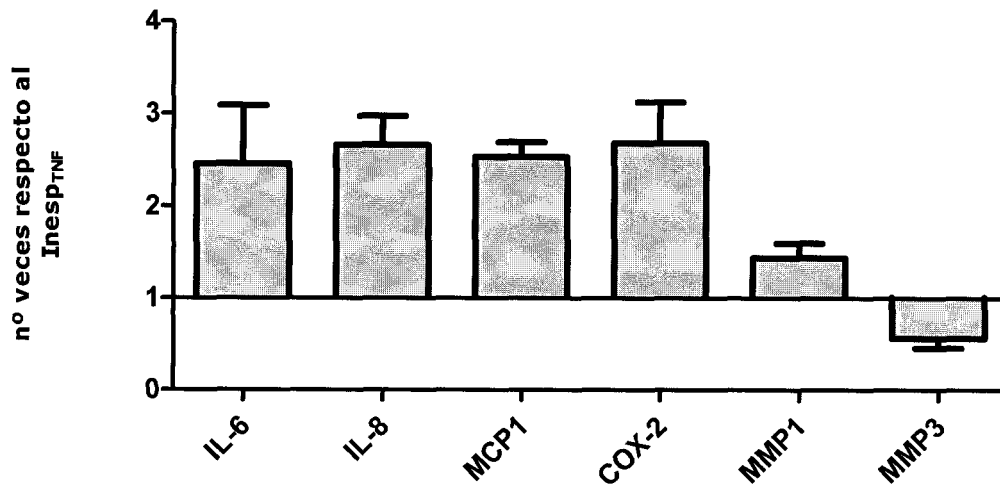


FIG 3

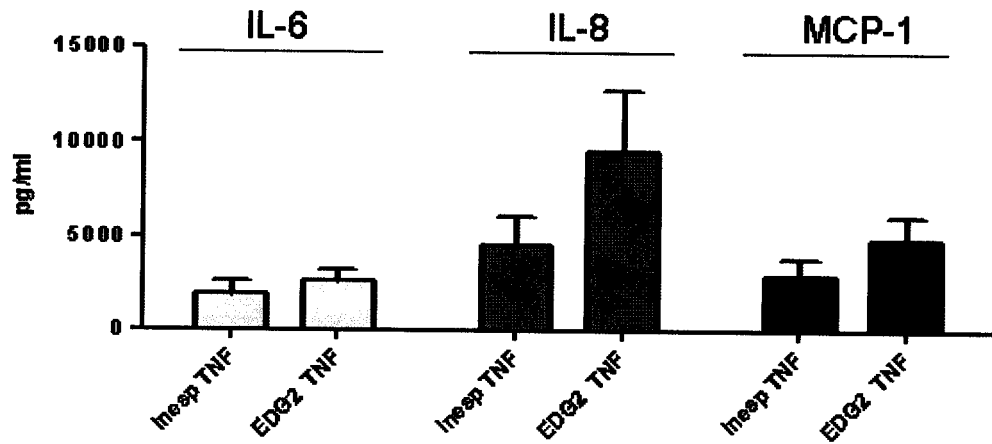
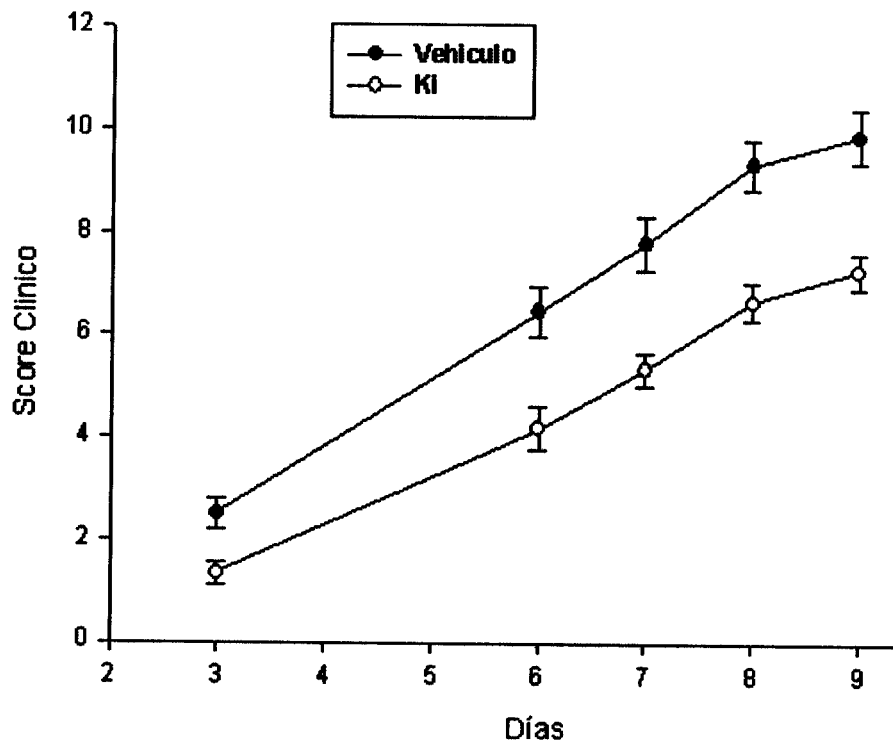


FIG 4





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031094

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.07.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/422** (2006.01)
A61P19/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 2153847 A1 (RIKEN & TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) 17.02.2010, página 1, resumen; página 2, líneas 40-43; página 3, líneas 20-30; página 5, líneas 22-30; página 23, líneas 34-43; página 61, líneas 10-25,41-43; reivindicaciones 1-8.	1-10
X	NOCHI H. et al. Stimulatory role of lysophosphatidic acid in cyclooxygenase-2 induction by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in fibroblast-like synovial cells. The Journal of Immunology. 2008. Volumen 181, páginas 5111-5119, página 5111, resumen; página 5112, columna 1; página 5116, columna 1; página 5118, columnas 1-2.	1-10
X	SONG HY. et al. Lysophosphatidic acid mediates migration of human mesenchymal stem cells stimulated by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Biochimica et Biophysica Acta. Enero 2010. Volumen 1801, páginas 23-30, página 23, resumen; página 24, columna 1; página 27, columna 1; página 29, columnas 1-2.	1-10
A	ZHAO C. et al. Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synoviocytes: implications for rheumatoid arthritis? Molecular Pharmacology. 2008. Volumen 73(2), páginas 587-600, todo el documento.	1-10
A	OTHA H. et al. Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. Molecular Pharmacology. 2003. Volumen 64(24), páginas 994-1005, página 994, resumen.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.09.2011

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.09.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 2153847 A1	17.02.2010
D02	NOCHI H. et al. The Journal of Immunology. 2008. Volumen 181, páginas 5111-5119.	2008
D03	SONG HY. et al. Biochimica et Biophysica Acta. Enero 2010. Volumen 1801, páginas 23-30.	Enero 2010
D04	ZHAO C. et al. Molecular Pharmacology. 2008. Volumen 73(2), páginas 587-600.	2008
D05	OTHA H. et al. Molecular Pharmacology. 2003. Volumen 64(24), páginas 994-1005.	2003

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga el uso del compuesto ki16425, inhibidor del receptor EDG2, para preparar un medicamento para tratamiento de la artritis reumatoide, particularmente en pacientes que presentan niveles elevados de partículas proinflamatorias, como TNF o TNF-alpha, después de sido tratados con antiinflamatorios (reivindicaciones 1-4). Dicho medicamento puede ser administrado por vía oral, parenteral, intravenosa o intraarticular (reivindicaciones 5-7), pudiendo contener un excipiente y/o vehículo farmacológicamente aceptables, así como otro principio activo (reivindicaciones 8-10).

El documento D01 divulga el uso de agentes inhibidores del receptor EDG2, entre los que menciona el compuesto ki16425, para el tratamiento de enfermedades que cursan con la destrucción del cartílago y el hueso, entre las que se encuentra la artritis reumatoide (ver página 1, resumen; página 2, líneas 40-43; página 3, líneas 20-30; página 5, líneas 22-30; página 23, líneas 34-43; página 61, líneas 10-25, 41-43; reivindicaciones 1-8).

El documento D02 se refiere a la función que desempeña el ácido lisofosfatídico (LPA) en la inducción de la expresión de la ciclooxygenasa-2 y de citoquinas inflamatorias, en sinoviocitos tipo fibroblasto, procedentes de fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Esta función es inhibida tratando las células en cultivo con el compuesto ki16425, antagonista del receptor EDG2, lo que sugiere que ki16425 puede ser considerado como producto terapéutico para tratamiento de la artritis reumatoide, siendo los receptores de LPA sus posibles dianas (ver página 5111, resumen; página 5112, columna 1; página 5116, columna 1; página 5118, columnas 1-2).

El documento D03 divulga el papel del fluido sinovial en la migración de las células madre mesenquimatosas de médula ósea humana (hBMSCs) y el mecanismo molecular que lo induce. Esta migración es mayor en fluido sinovial procedente de pacientes con artritis reumatoide y es completamente inhibida mediante el tratamiento de las células con el compuesto ki16425 (ver página 23, resumen; página 24, columna 1; página 27, columna 1; página 29, columnas 1-2).

El documento D04 estudia el perfil de expresión de receptores de LPA en sinoviocitos tipo fibroblasto, obtenidos de tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. La unión de LPA al receptor induce en estos pacientes la secreción de citoquinas inflamatorias lo que sugiere que la regulación de la expresión de estos receptores en sinoviocitos humanos va unido a la patogénesis de la enfermedad, lo que convierte a estos receptores en potenciales dianas terapéuticas (ver todo el documento).

El documento D05 divulga el mecanismo de acción del compuesto ki16425, como antagonista de los receptores EDG2 del ácido lisofosfatídico, inhibiendo selectivamente algunos efectos que produce la expresión de receptores de LPA en células humanas (ver página 994, resumen).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la presente solicitud es el uso del compuesto ki16425, inhibidor de EDG2, para preparar un medicamento para tratamiento de la artritis reumatoide.

1.1. REIVINDICACIONES 1-10

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa el uso de agentes inhibidores del receptor EDG2, incluyendo el compuesto ki16425 como antagonista de dicho receptor, para el tratamiento de enfermedades que cursan con la destrucción del cartílago y el hueso, entre las que se menciona la artritis reumatoide.

El documento D02 se refiere a que el tratamiento de cultivos celulares de sinoviocitos tipo fibroblasto, procedentes de fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, con diferentes concentraciones de ki16425 produce la inhibición de la expresión de la ciclooxigenasa-2 y de citoquinas inflamatorias, anticipando el posible uso de este producto para tratamiento de la artritis reumatoide.

Por otra parte, el documento D03 también anticipa el uso del compuesto ki16425, antagonista del receptor de EDG2, en estudios realizados con células procedentes de fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. El tratamiento de estas células con dicho compuesto inhibe la migración de las células madre mesenquimatosas de médula ósea humana (hBMSCs), aumentada por la expresión del receptor de LPA.

Se considera que los documentos D01 y D02 anticipan el uso del compuesto ki16425 como agente inhibidor del receptor EDG2, para elaborar un medicamento para tratamiento de la artritis reumatoide. El documento D03 no incluye esta posibilidad pero dado que ki16425 inhibe un efecto relacionado con esta enfermedad, como es la migración de las células madre mesenquimatosas de médula ósea humana (hBMSCs), sería obvio para un experto en la materia el uso de ki16425 para tratamiento de la artritis reumatoide.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D03, las reivindicaciones 1-10 no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D04 y D05, se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.