

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 914 617**

21 Número de solicitud: 202031238

51 Int. Cl.:

A61K 31/351 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.06.2022

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**GOMEZ TOURIÑO, Iria Maria;
BREA FLORIANI, Jose Manuel y
LOZA GARCIA, Maria Isabel**

74 Agente/Representante:

TORRENTE VILASANCHEZ, Susana

54 Título: **Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias**

57 Resumen:

Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende eprinomectina.

La composición es útil para el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias, como por ejemplo artritis reumatoide.

ES 2 914 617 A1

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias

Sector de la Técnica

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende eprinomectina. La composición es útil para el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias, como por ejemplo artritis reumatoide.

Antecedentes

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica autoinmune, caracterizada por inflamación en múltiples articulaciones, que en última instancia conduce a deformidad, dolor e hinchazón articulares. La AR es una de las artropatías inflamatorias más frecuentes, con una prevalencia del 0,3% -1%, que se manifiesta durante los años más productivos de la edad adulta (20-40). Dentro de los 10 años posteriores al inicio, al menos el 50% de los pacientes no pueden mantener un trabajo de tiempo completo y no existen terapias para prevenir la enfermedad. Por lo tanto, la AR representa una carga global y los pacientes con AR necesitan tratamientos mejores y más seguros (World Health Organization, 2016; <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>).

Las vías mediadas por citocinas parecen ser fundamentales para el proceso patogénico, e involucran células del sistema inmunitario innato y adaptativo que se infiltran en las articulaciones, así como sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS). Todos estos tipos de células secretan citocinas inflamatorias (como TNF- α , IL-6, IL-1, IL-17, GM-CSF, entre otras), las cuales se postulan como claves para iniciar y mantener el proceso patogénico, eventualmente conduciendo a la destrucción articular (Kojima *et al. Mod Rheumatol* 2020, 30(6):941-947; Smolen JS *et al. Lancet* 2016, 388(10055): 2023-2038).

Los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales (csDMARD), como el metotrexato, se emplean como terapia de primera línea: son eficaces para aliviar los síntomas pero no suprimen la progresión de la enfermedad, ya que no se dirigen a la causa real de la enfermedad, las respuestas inmunes alteradas (Chaudhari K *et al. Nat Rev Drug Discov* 2016, 15(5): 305-306).

Los DMARD biológicos (bDMARD) muestran un mayor éxito en la remisión de la enfermedad al dirigirse a mediadores inmunitarios clave (por ejemplo, TNF- α o IL-6R) y la mayoría de ellos interfieren con las vías inmunitarias inflamatorias (Meier FM *et al. Immunotherapy* 2013, 5(9): 955-974).

- 5 Los inhibidores de TNF son los más utilizados (en combinación con metotrexato) y han demostrado ser muy eficaces en pacientes que no responden a csDMARD; sin embargo, el 20%-40% de los pacientes aún no responden o no logran una mejora significativa. Se postula que una de las causas de estas respuestas inadecuadas en un alto porcentaje de pacientes tratados con csDMARD y bDMARD se debe a que la AR no es una entidad única, sino un síndrome
- 10 causado por diversas vías alteradas que operan de manera diferente en pacientes individuales (McInnes IB *et al. Nat Rev Rheumatol* 2016, 12(1): 63-68); muchas de estas vías pueden no estar siendo objeto de las terapias disponibles actualmente.

- En esta línea, una de las necesidades no cubiertas en la investigación de la AR, destacada tanto en el informe de la European League Against Rheumatism (EULAR; European League Against
- 15 Rheumatism Report 2017. http://www.eularcongressnews-digital.com/eularcongressnews/eular_2017_report?pg=1#pg1) como en la iniciativa European Roadmap for Research in Rheumatic and Musculoskeletal Diseases (European Roadmap for Research in Rheumatic and Musculoskeletal Diseases initiative. 2017. https://www.eular.org/public_affairs_rheumamap.cfm), es el desarrollo de nuevas terapias para
- 20 pacientes que no responden a csDMARDs y/o bDMARDs, así como la validación de nuevas dianas terapéuticas. La no adherencia también se ha descrito como un desafío importante: los sentimientos negativos y el desagrado por el tratamiento con metotrexato se han identificado como la principal causa de no adherencia en el 33% de los pacientes. Con respecto a los bDMARD, sólo se pueden administrar por vía parenteral: la fobia a las agujas es común y el
- 25 24% de los pacientes que se autoinyectan experimentan dolor en la inyección, lo que genera no adherencia (Mocsai A *et al. BMC Med* 2014, 12: 43. Wright S *et al. Aust Fam Physician* 2009, 38(3): 172-176. McInnes IB *et al. Clin Exp Rheumatol* 2013, 31(3): 350-357. Schwartz DM *et al. Nat Rev Rheumatol* 2016, 12(1): 25-36). La Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que mejorar la adherencia tendría un efecto más beneficioso que la sola mejora de los
- 30 enfoques (http://www.who.int/chp/knowledge/publications/adherence_introduction.pdf) terapéuticos.

Por tanto, el descubrimiento de un fármaco capaz de administrarse por vía oral mejoraría significativamente tanto la adherencia como la calidad de vida del paciente.

En este sentido, una alternativa a los cs y bDMARD son los DMARD sintéticos dirigidos (tsDMARD): estos incluyen moléculas pequeñas y de bajo peso molecular que, al contrario que los bDMARD, pueden apuntar a componentes intracelulares, aumentando el rango de vías objeto de tratamiento. Los tsDMARD se pueden administrar por vía oral, mejorando el cumplimiento y, por lo tanto, la eficacia del tratamiento, y son más baratos de producir que los bDMARD (Mocsai A *et al. BMC Med* 2014, 12: 43). Por lo tanto, constituyen una alternativa sólida tanto para pacientes que no cumplen como para pacientes que no responden a csDMARD / bDMARD. Los tsDMARD emergentes se dirigen a las vías de transducción de señales intracelulares activadas por citocinas inflamatorias, principalmente la vía JAK / STAT, que se encuentra aguas abajo de los receptores de citocinas de tipo I / II: por ejemplo, el inhibidor de JAK1 / 2/3 aprobado por la FDA tofacitinib ha mostrado resultados impresionantes como monoterapia, incluso en pacientes que no habían recibido tratamiento previo y que no respondían a csDMARD / bDMARD (Schwartz DM *et al. Nat Rev Rheumatol* 2016, 12(1): 25-36).

Sin embargo, estos tratamientos no se dirigen a la causa real de la enfermedad: los bDMARD (por ejemplo, Anti-TNF o Anti-IL-6R) impiden la unión de la citocina a su receptor, pero el entorno extracelular sigue siendo inflamatorio; por otro lado, los jakinibs impiden la señalización de citocinas en la célula diana pero, aún así, las células inmunes y los FLS siguen secretando citocinas proinflamatorias.

Así, todavía es necesario disponer de nuevos DMARD capaces de reducir el entorno inflamatorio.

25 Descripción breve de la invención

Los resultados que se presentan en este documento demuestran que una composición farmacéutica que comprende eprinomectina es capaz de interactuar con células mononucleares de sangre periférica. Más concretamente, se demuestra que la eprinomectina es capaz de reducir los niveles de la citocina proinflamatoria IL-1 β (ejemplo 3) y además también reduce los niveles de la citocina proinflamatoria TNF- α (ejemplo 4), tanto en células procedentes de

donantes sanos como de pacientes que padecen artritis reumatoide y que fueron recientemente diagnosticados. Además, se demuestra que la composición farmacéutica que comprende eprinomectina no muestra toxicidad (ejemplo 2).

Así, en un primer aspecto la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende eprinomectina, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o un análogo de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

En una realización particular, la enfermedad inflamatoria es artritis reumatoide.

En otra realización particular, la eprinomectina, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o un análogo de la misma, en la composición de la invención, se encuentra en combinación con un ingrediente activo adicional. En una realización más particular, dicho ingrediente activo adicional es un fármaco antiinflamatorio o antagonista de citocinas.

En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención se administra en una forma farmacéutica apropiada para la administración oral, intravenosa, subcutánea o intramuscular.

En otra realización particular, la composición farmacéutica de la invención se encuentra en forma líquida o liofilizada.

En un segundo aspecto, la invención se dirige a un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria, caracterizado por administrar a un individuo en necesidad una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica descrita en el primer aspecto de la invención. En una realización particular, la enfermedad inflamatoria es artritis reumatoide.

En otra realización particular, un ingrediente activo adicional es administrado al individuo. En una realización más particular, dicho ingrediente activo adicional es un fármaco antiinflamatorio o antagonista de citocinas.

25 Descripción de las figuras

La **Figura 1** representa la viabilidad celular de PBMCs de 6 DS inflamados *in vitro* y tratados posteriormente con 7 concentraciones diferentes de eprinomectina o vehículo. Se muestra el índice de viabilidad, calculado como el cociente entre el valor de luminiscencia del compuesto

y el del vehículo, a cada concentración. Se muestra la mediana (círculos) y el rango intercuartílico, para cada concentración testada.

La **Figura 2** representa las ratios de los valores obtenidos para la cantidad de IL-1 β secretada por el modelo *in vitro* de inflamación en sobrenadantes de células tratadas con eprinomectina o vehículo *versus* células no tratadas. Valores por debajo de 1 indican reducción en la secreción de la citocina. Círculos y líneas continuas: eprinomectina. Cuadrados y líneas discontinuas: vehículo. Test t de Student pareado. **: p<0.01.

Figura 3: La Figura 3A representa, para el donante DS_008, la cantidad de IL-1 β (en pg/mL) secretada por el modelo *in vitro* de inflamación tratado con eprinomectina (líneas continuas) o vehículo (líneas discontinuas). La Figura 3B representa lo mismo para el donante DS_009. La Figura 3C representa lo mismo para el donante DS_013. La Figura 3D representa lo mismo para el donante DS_014. La Figura 3E representa lo mismo para el donante DS_016.

Figura 4: La Figura 4A representa el ratio eprinomectina/vehículo (%) del porcentaje de PBMCs que expresan IL-1 β ("PBMCs IL-1- β^+ "): valores positivos indican aumento de la frecuencia de IL-1- β^+ PBMCs tras tratamiento del modelo *in vitro* de inflamación con eprinomectina; valores negativos denotan reducción. Se muestran los resultados para 3 pacientes naive (N) y 4 donantes sanos (DS). La Figura 4B representa lo equivalente a la Figura 4A para monocitos CD14^{neg} IL-1- β^+ . *: p<0.05. Test t pareado de Student.

La **Figura 5** representa que la adición de PHA-L a nuestro modelo mejora la ventana de detección y cuantificación de TNF- α . Test t de Student. ***: p<0.001. LPS +ATP: modelo *in vitro* de inflamación. LPS + ATP + PHA: modelo *in vitro* de inflamación modificado.

Figura 6: La Figura 6A representa la cantidad de TNF- α producida tras el tratamiento con vehículo o eprinomectina por el modelo *in vitro* de inflamación modificado. Círculos: vehículo. Cuadrados: eprinomectina. Símbolos abiertos: pacientes. Símbolos cerrados: DS. Test de rangos de Wilcoxon. *: p<0.05. La Figura 6B representa los ratios vehículo/eprinomectina (en %) de los datos mostrados en la Figura 6A. Valores positivos indican aumento de la secreción de TNF- α tras tratamiento con eprinomectina del modelo *in vitro* de inflamación modificado; valores negativos denotan reducción. Test de rangos de Wilcoxon. *: p<0.05.

Figura 7: La Figura 7A representa el ratio eprinomectina/vehículo (%) del porcentaje de PBMCs que expresan TNF- α ("PBMCs TNF- α^+ "): valores positivos indican aumento de la

frecuencia de PBMCs $\text{TNF-}\alpha^+$ tras tratamiento con eprinomectina del modelo *in vitro* de inflamación modificado; valores negativos denotan reducción. Se muestran los resultados para 3 pacientes naive (N) y 4 donantes sanos (DS). La Figura 7B representa lo equivalente a la Figura 7A para monocitos $\text{CD14}^{\text{neg}} \text{TNF-}\alpha^+$. La Figura 7C representa lo equivalente a la Figura 7A para linfocitos $\text{TNF-}\alpha^+$. *: $p < 0.05$. Test t pareado de Student.

Figura 8: La Figura 8A representa el ratio eprinomectina/vehículo (%) de la intensidad media de fluorescencia de TNF en PBMCs $\text{TNF-}\alpha^+$: valores positivos indican mayor cantidad de TNF en PBMCs $\text{TNF-}\alpha^+$ tras tratamiento con eprinomectina del modelo *in vitro* de inflamación modificado; valores negativos denotan reducción. Se muestran los resultados para 3 pacientes naive (N) y 4 donantes sanos (DS). La Figura 8B representa lo equivalente a la Figura 8A para linfocitos $\text{TNF-}\alpha^+$. *: $p < 0.05$. Test t pareado de Student.

Descripción detallada de la invención

La eprinomectina es un compuesto semisintético de la familia de las avermectinas, empleado para el tratamiento de parásitos internos y externos en ganado vacuno, incluyendo vacas lactantes. En la presente invención, la eprinomectina incluye una mezcla de dos homólogos, la eprinomectina B1a y la eprinomectina B1b, las cuales difieren en un grupo metileno en el C25, y también incluye cada uno de los homólogos separadamente. El porcentaje de los homólogos en la mezcla varía de 99/1 a 1/99, por ejemplo están en una proporción 90/10 o 10/90. El modo de acción de la eprinomectina es desconocido, a pesar de un gran número de estudios llevados a cabo en una variedad de compuestos de la misma clase (Agencia Europea del Medicamento, (https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/eprinomectin-summary-report-1-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf)).

Se entiende por “células mononucleares de sangre periférica o PBMCs” las células con un solo núcleo aisladas de sangre humana mediante gradiente de densidad, y que son componentes del sistema inmunitario (linfocitos, monocitos y células dendríticas). Estas células son componentes clave del sistema inmunitario, resultando fácilmente accesibles y manipulables, por lo que han sido seleccionadas para esta invención.

Se entiende por “citocina proinflamatoria $\text{IL-1}\beta$ ” la proteína interleucina 1 beta, producida por células del sistema inmune y por otros tipos celulares, y que provoca la propagación de la

inflamación. Los niveles de citocina proinflamatoria IL-1 β son elevados en procesos inflamatorios, como por ejemplo en artritis reumatoide, constituyendo uno de los agentes causales de la etiopatogenia de dicha enfermedad.

Se entiende por “reducir los niveles de citocina proinflamatoria IL-1 β ” a la reducción de la cantidad de la citocina proinflamatoria IL-1 β producida por células del sistema inmune y/o fibroblastos en el medio extracelular en un sujeto que padece un proceso o patología inflamatoria.

Se entiende por “citocina proinflamatoria TNF- α ” la proteína factor de necrosis tumoral alfa, producida por células del sistema inmune y por otros tipos celulares, y que provoca la propagación de la inflamación, Los niveles de citocina proinflamatoria TNF- α son elevados en procesos inflamatorios, como por ejemplo en artritis reumatoide, constituyendo uno de los agentes causales de la etiopatogenia de dicha enfermedad.

Se entiende por “reducir los niveles de citocina proinflamatoria TNF- α ” a la reducción de la cantidad de la citocina proinflamatoria TNF- α producida por células del sistema inmune y/o fibroblastos en el medio extracelular en un sujeto que padece un proceso o patología inflamatoria.

Se entiende por “modelo *in vitro* de inflamación” a PBMCs estimulados con lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS) durante 3h y adenosín-trifosfato (ATP) durante 40’, y lavados con medio de cultivo para eliminar dichos compuestos, antes de su tratamiento con vehículo o eprinomectina.

Se entiende por “modelo *in vitro* de inflamación modificado” al modelo *in vitro* de inflamación previamente descrito, al cual se añade fitohemaglutinina L (PHA-L) tras la eliminación mediante lavado de LPS y ATP, y antes de su tratamiento con vehículo o eprinomectina.

Se entiende por “donantes sanos” (“DS”) a individuos de edad comprendida entre 35 y 60 años, sin historia familiar de enfermedad inflamatoria crónica mediada por inmunidad o enfermedades autoinmunes.

Se entiende por “enfermedad inflamatoria” a una enfermedad mediada por proteínas y vías celulares inflamatorias, y que se ve modificada por tratamientos antiinflamatorios.

Se entiende por “artritis reumatoide” a una enfermedad autoinmunitaria que causa dolor, hinchazón y rigidez de las articulaciones, y que puede dañarlas gravemente. Además, a veces causa pérdida de la función y discapacidad.

Se entiende por “pacientes” (“N”) a individuos que padecen artritis reumatoide. En este caso nos referimos a pacientes recién diagnosticados de artritis reumatoide que aún no han recibido ningún tratamiento (“naive”).

En cualquier caso, las composiciones de la invención pueden administrarse in vivo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se entiende por “farmacéuticamente aceptable” un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto, junto con el principio activo sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo podrá ser seleccionado para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo, para minimizar algún efecto secundario adverso y/o para dirigir el principio activo a una diana o tejido, como sería bien conocido para un experto en la materia.

La dosis y los calendarios efectivos para la administración de la composición de la invención puede ser determinada empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la experiencia de la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado en la patología. La dosis no debe de ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos. Generalmente, la dosificación variará con la edad, el sexo, la extensión de la enfermedad en el paciente, la vía de administración, o si otros principios activos se incluyen en el régimen de administración y dosificación, lo cual podrá determinarse por un experto en la materia.

25

Los siguientes ejemplos sirven meramente para ilustrar la invención.

Ejemplo 1: Modelo *in vitro* de inflamación en células primarias del sistema inmune.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) fueron aisladas de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad empleando el producto comercial Lymphoprep (Stemcell Technologies, ref#07811), siguiendo

instrucciones del fabricante. Los PBMCs fueron contados y resuspendidos en suero AB humano suplementado con 20% de dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración de $10\text{--}20 \times 10^6$ células/mL. Las células fueron mantenidas durante 24h a -80°C , para a continuación almacenarlas en nitrógeno líquido hasta su uso.

- 5 Para cada uno de los experimentos descritos a continuación, las células fueron descongeladas e inflamadas *in vitro* del siguiente modo: el vial de células se retiró del nitrógeno líquido, y se sumergió en un baño a 37°C hasta su casi total descongelación. En ese momento se añadieron 2mL de medio de cultivo al vial (medio comercial RPMI 1640 suplementado con penicilina, estreptomicina y 10% de suero humano), se transfirió el contenido a un tubo de centrifugación,
- 10 y se añadió medio de cultivo hasta 10mL. Tras su centrifugación a $300 \times g$ 10min se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado. Las células fueron contadas y resuspendidas a una concentración de 4×10^6 células/mL. Para cada tratamiento se cultivaron 2×10^6 células en medio conteniendo lipopolisacáridos de *Escherichia Coli* (Sigma-Aldrich, ref #L4391-1MG, concentración final de $5 \mu\text{g/mL}$), durante 3h a 37°C 5% CO_2 . Tras este tiempo se añade ATP
- 15 (Sigma-Aldrich, ref #A6419, concentración final de 5mM), y se incubó nuevamente a 37°C 5% CO_2 durante 40 minutos.

- Para la PCR cuantitativa, las células fueron tratadas con LPS y ATP, lavadas y lisadas con el tampón RLT (QIAGEN, componente del kit ref # 74104). El lisado fue conservado a -80°C hasta su utilización. EL ARN fue aislado empleando el RNeasy Mini kit (QIAGEN, ref #
- 20 74104), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue eluido dos veces con $30 \mu\text{L}$ de agua tratada con DEPC (Invitrogen, ref # AM9915G), y cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). El ARN fue empleado en su totalidad para la síntesis de ADN complementario, empleando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, ref #4368814). Para la PCR cuantitativa (qPCR) se empleó la 2x Fast SYBR Green
 - 25 Master Mix (ThermoFisher, ref #4385610), siguiendo instrucciones del fabricante, en un QuantStudio® 12K Flex Real-Time PCR System, 96-well block, desktop (Life Technologies, Singapore). Para el análisis de los resultados se empleó el método estándar de $\Delta\Delta\text{Ct}$ (Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. *Methods* 2001. **25**(4): 402-408). Para el análisis mediante citometría de flujo, se añadió brefeldina A (BioLegend, ref #420601) a $5 \mu\text{g/mL}$ simultáneamente al LPS:
 - 30 la Brefeldina A es un antibiótico macrólido empleado para mejorar las señales de tinción intracelular de citocinas gracias a su capacidad de bloqueo de los procesos de transporte durante

la activación celular, reteniendo por tanto las citocinas en el interior celular y permitiendo su detección mediante citometría de flujo.

Tras la incubación con brefeldina A, LPS y ATP, las células fueron recogidas y lavadas con medio de cultivo a 400xg 10'. Durante la centrifugación se añade 1mL de PBS frío, para
 5 facilitar que las células adheridas al fondo se despeguen. A continuación se desecha el sobrenadante y se resuspenden con el PBS las células. Se centrifuga nuevamente a 400xg 10', descartando posteriormente el sobrenadante. Las células se fijan y permeabilizan por incubación con el compuesto comercial Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences, ref #554722) en frío durante 20' a 4°C. A continuación se añade 1 ml de tampón comercial Perm/Wash 1X frío
 10 (BD Biosciences, ref #554723) y se centrifuga a 400xg 10'. Se descarta el sobrenadante y se repite el lavado. A continuación, se retira el sobrenadante intentando que quede muy poco volumen.

Las células se tiñen con al anticuerpo primario correspondiente (Anti-NLRP3 o isotipo, Abcam, ref #ab4207 y #ab37373. Concentraciones finales de 10µg/mL), durante toda la noche a 4°C en
 15 oscuridad. A continuación, se llevan a cabo dos lavados como los descritos anteriormente, y las células se tiñen con un anticuerpo secundario conjugado con PE y específico para Anti-NLRP3 e isotipo (Abcam, ref # ab7004, concentración final de 3µg/mL), y/o anticuerpo Anti-IL6/FITC (Biorbyt, ref #orb102822, 1µl/50µl finales), y/o Anti-TNF-α/AF647 (Biolegend, ref #502916 2,5µL/50µL finales). Tras dos lavados las células se resuspenden en 400µL de tampón
 20 Perm/Wash y se analizan en un citómetro FACSCalibur (BD). Los resultados se analizan empleado el software FlowJo (BD).

La cuantificación de citocinas se lleva a cabo habitualmente mediante ensayos de ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Sin embargo, se ha de realizar un ensayo para cada citocina de interés, disminuyendo la eficiencia del proceso. En este caso
 25 hemos optado por emplear una técnica de cuantificación de citocinas en multiplex, que permite la cuantificación de 10 citocinas diferentes empleando tan sólo 50 µL de muestra. Esta técnica se basa en el uso de *beads* magnéticas marcadas con diferentes fluoróforos y con anticuerpos específicos para diferentes citocinas. Cuantificamos 10 citocinas (GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF-α. ThermoFisher Scientific, ref #LHC0001M) en medios
 30 de cultivo. La lectura de la luminiscencia tuvo lugar en un Luminex XMAP reader (Bio-Rad). Para el análisis de los resultados se siguieron instrucciones del fabricante: se emplearon los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) y las concentraciones conocidas de los

estándares de cada citocina para elaborar curvas estándar empleando un modelo logístico de 5 parámetros. A continuación se extrapolaron los valores de concentración de cada muestra introduciendo los correspondientes valores de MFI para cada citocina y curva. En el caso de que los valores de MFI estuvieran por encima de la curva, se muestra el valor crudo de MFI en vez del valor extrapolado de concentración.

Así desarrollamos un modelo *in vitro* de inflamación, consistente en la estimulación secuencial de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos con lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS) y adenosina trifosfato (ATP).

Uno de los componentes clave en el proceso inflamatorio celular es el inflamasoma NLRP3: la proteína NLRP3 es un miembro de la familia de receptores del dominio de unión de nucleótidos (NOD) cuya expresión se puede encontrar en el citoplasma de una amplia variedad de células, tanto del sistema inmune como no inmune, pero teniendo una particular importancia en células del sistema inmune innato (Ahn, H. *et al.* *J Biomed Res* 2018. **32**(5): 401-410). Tras su activación, la proteína NLRP3 se asocia a una proteína adaptadora (*apoptosis-associated speck-like protein*, ASC) y a una efectora (pro-caspasa-1), constituyendo el inflamasoma NLRP3 (Shen, H. H. *et al.* *Autoimmun Rev* 2018. **17**(7): 694-702). Este complejo proteico promueve la inflamación a través del procesamiento de IL-1 β e IL-18 de sus formas inactivas a sus formas activas, las cuales a su vez, al ser secretadas, promueven la activación de otras vías pro-inflamatorias. La activación del sensor NLRP3 requiere 2 señales: una primera señal estimuladora a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que provoca el aumento en la expresión de NLRP3, y una segunda señal activadora que induce la oligomerización del inflamasoma (Shen, H. H. *et al.* *Autoimmun Rev* 2018. **17**(7): 694-702). Por ello, decidimos basar nuestro modelo en la estimulación secuencial de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos con lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS, un ligando de PRR que actúa como primera señal) y adenosina trifosfato (ATP, que actúa como segunda señal). Este tipo de estimulación secuencial ha sido usado previamente con éxito para inducir inflamación en otros estudios (p.ej. Choulaki, C. *et al.* *Arthritis Res Ther.* 2015. **17**(1): 257, y Mouton-Liger, F. *et al.* *Glia* 2018. **66**(8): 1736-1751).

Para verificar que, efectivamente, el modelo *in vitro* de inflamación es válido, se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) que demostró que tras el cultivo de PBMCs con LPS hay un aumento en la expresión de *NLRP3*, y también un aumento en la expresión de *IL-1 β* . Estos resultados fueron confirmados a nivel de proteína mediante citometría de flujo. Asimismo, tras el

tratamiento con LPS y ATP se aprecia un claro aumento en el porcentaje de células IL-1 β ⁺, debido principalmente a la producción de IL-1 β por parte de monocitos CD14⁺.

Además, el LPS es considerado uno de los estímulos más potentes para la activación del sistema inmune innato, induciendo la producción de una miríada de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6, IL-8, la familia de IL-12, otras citocinas de la familia de IL-1 β , IL-15 y TGF- β (Rossol, M. *et al*, *Crit Rev Immunol* 2011. **31**(5): 379-446) Para confirmar que esto es cierto en nuestro modelo, llevamos a cabo una qPCR, confirmando que el tratamiento con LPS provoca el aumento de la expresión de TNF- α e IL-6. También comprobamos mediante citometría de flujo la presencia de las proteínas, confirmando que tanto IL-6 como TNF- α se expresan en PBMCs tratados con LPS y ATP.

Por último, estudiamos si las citocinas proinflamatorias son secretadas al medio extracelular, ya que es así como de manera fisiológica se propagaría el proceso inflamatorio. Para ello tratamos PBMCs de 6 donantes sanos (DS) con LPS y ATP, y analizamos en el medio de cultivo la presencia de 10 citocinas en multiplex . El tratamiento con LPS y ATP induce un aumento significativo en la secreción de IL-1 β , IL-6 y GM-CSF, todas ellas proinflamatorias. Observamos también un aumento en la secreción de otras citocinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ , aunque no alcanzan significación estadística. Se aprecia también un aumento significativo de IL-2 e IL-10: aunque esta última citocina es anti-inflamatoria, ha sido previamente descrito que el tratamiento con LPS induce su secreción, posiblemente para balancear la respuesta inflamatoria (Rossol, M. *et al*, *Crit Rev Immunol* 2011. **31**(5): 379-446).

Por lo tanto, nuestro modelo *in vitro* de inflamación, basado en la estimulación secuencial de PBMCs con LPS y ATP, conlleva la activación de múltiples vías inflamatorias, y es adecuado para identificar nuevos compuestos capaces de reducir la secreción de citocinas proinflamatorias.

Ejemplo 2: toxicidad

En este ejemplo estudiamos la toxicidad de la eprinomectina en nuestro modelo *in vitro* de inflamación, para establecer el rango de concentraciones a las cuales el compuesto no produce muerte celular, y descartar que los resultados sean debidos a la interferencia de células muertas.

En primer lugar, disolvimos la eprinomectina comercial (MolPort, ref # MP-0000-0000-3812-289) en dimetilsulfóxido estéril (DMSO, Sigma-Aldrich, ref #D2650), a una concentración final de 10^{-2} M (stock). Partiendo de esta disolución stock, preparamos una disolución de eprinomectina 10^{-3} M en medio de cultivo sin suero, siendo ésta la disolución de trabajo que empleamos en todos los experimentos posteriores. Tanto el stock como la disolución de trabajo se conservaron a -20°C .

A continuación tratamos nuestro modelo *in vitro* de inflamación con eprinomectina a dos concentraciones (10^{-5} M y 10^{-7} M): decidimos no superar la concentración de 10^{-5} M puesto que concentraciones superiores supondrían una adición mayor de DMSO, el cual a elevadas concentraciones podría provocar daño celular. Las diluciones de eprinomectina fueron preparadas diluyendo la disolución de trabajo (10^{-3} M) en medio sin suero, a una concentración 2x, y añadidas a las células, resuspendidas en medio con suero.

La viabilidad celular se valora mediante la cuantificación de ATP, puesto que la concentración de esta molécula disminuye significativamente en células necróticas o apoptóticas. La cuantificación de la viabilidad celular se llevó a cabo empleando el *ATPlite Luminescence Assay System* (PerkinElmer, ref #6016943), siguiendo instrucciones del fabricante, tras 21h y 46h de la adición del compuesto.

Como se puede observar en la Tabla 1, la eprinomectina no es tóxica a ninguna de las dos concentraciones testadas, tanto a 21h como a 46h.

Para confirmar estos resultados y confirmar que son extrapolables, repetimos el ensayo de viabilidad en células provenientes de 6 donantes sanos empleando un mayor rango de concentraciones de eprinomectina, y cuantificando la viabilidad tras 46h de cultivo. Efectivamente, la eprinomectina no es tóxica en la mayoría de las concentraciones testadas, con la única excepción de la concentración más alta, 3×10^{-5} M, en cuyo caso la viabilidad se reduce a aproximadamente la mitad, respecto del vehículo (Figura 1 y Tabla 2).

Por lo tanto, la eprinomectina no es tóxica a concentraciones inferiores a 3×10^{-5} M.

Tabla 1: Valores de luminiscencia obtenidos en el ensayo de toxicidad.

Tratamiento	Duración	Valor
Eprinomectina 10^{-5} M	21h	2066132
Eprinomectina 10^{-7} M	21h	1791294
Vehículo 10^{-5} M	21h	1409230

Vehículo 10 ⁻⁷ M	21h	1474871
Eprinomectina 10 ⁻⁵ M	46h	1841808
Eprinomectina 10 ⁻⁷ M	46h	1957815
Vehículo 10 ⁻⁵ M	46h	1240578
Vehículo 10 ⁻⁷ M	46h	1259265

Tabla 2: Índices de viabilidad obtenidos en el ensayo de toxicidad mostrado en la Figura 1, para cada donante sano (DS) y tratamiento. Los índices fueron calculados dividiendo el valor obtenido para la eprinomectina respecto del valor obtenido para el vehículo. Valores inferiores a 1 indican disminución viabilidad, respecto del vehículo, tras el tratamiento con eprinomectina, na: no analizado.

Concentración	Log ₁₀ concentración	Índice de viabilidad					
		DS_003	DS_013	DS_009	DS_016	DS_008	DS_014
10 ⁻⁹	-9.0	0.84	0.66	1.39	1.83	na	na
10 ⁻⁸	-8.0	1.02	1.26	0.11	1.28	1.47	1.65
10 ⁻⁷	-7.0	1.23	1.32	0.96	1.24	5.22	1.11
3x10 ⁻⁷	-6.5	na	na	na	na	1.18	1.14
10 ⁻⁶	-6.0	0.84	0.92	0.91	1.29	1.03	1.6
10 ⁻⁵	-5.0	0.81	2.44	0.75	0.97	1.19	0.64

Ejemplo 3: Estudio del efecto del tratamiento con eprinomectina en la capacidad de producción y secreción de IL-1 β .

10 Para estudiar si el tratamiento de nuestro modelo *in vitro* de inflamación con eprinomectina reduce la secreción de IL-1 β , los medios de cultivo provenientes del Ejemplo 1 fueron descongelados, centrifugados, y las citocinas cuantificadas en multiplex, tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1.

15 Para la detección y cuantificación de IL-1 β intracelular, los PBMCs de 4 DS y 3 pacientes fueron incubados con LPS y ATP como en el Ejemplo 1, y tratados con eprinomectina 10⁻⁵M durante 48h. Tras 43h de cultivo se añadió brefeldina A (5 μ g/mL) para mantener las citocinas en el interior celular. Tras 48h las células se centrifugaron, los medios de cultivo se congelaron a -80C, y las células se tiñeron para su análisis mediante citometría de flujo.

20 Brevemente, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, y teñidas con *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405 nm excitation*, un reactivo que sólo tiñe células

apoptóticas, necróticas o moribundas, según instrucciones del fabricante (Invitrogen, ref #L34965). Tras dos lavados con tampón FACS (PBS suplementado con 5% suero fetal bovino), las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal Anti-CD14 conjugado con FITC (eBiosciences, ref #11-0149-42. 1µg/muestra) en 100µL de tampón FACS, durante 30' en hielo y oscuridad. A continuación las células se lavaron dos veces con tampón FACS, y se fijaron y permeabilizaron con 150µL de Cytofix/Cytoperm. Tras dos lavados con tampón Perm/Wash, las células se tiñeron con un anticuerpo monoclonal Anti-IL-1β conjugado con PE (BD, ref #340516. 3µg/muestra) en 100µL de tampón Perm/Wash, durante 30' en oscuridad, tras lo cual fueron lavadas 2 veces, y conservadas a 4°C hasta su adquisición en un citómetro CSampler (Accuri) la mañana siguiente. Como controles para la compensación se tiñeron *beads* de compensación (*Anti-mouse Ig, κ, comp beads*, BD, ref #552843) con Anti-CD14/FITC o Anti-IL-1β/PE. Para tener un control de tinción para *Aqua*, de una muestra de 1×10^6 PBMCs se tomaron 1×10^6 de células y se lisaron mediante incubación durante 10' a 56°C, tras lo cual se reincorporaron al tubo y se tiñeron únicamente con *Aqua*. También se dejó una muestra de células sin teñir.

El análisis de los resultados se realizó empleando el software FlowJo: la compensación se llevó a cabo con los tubos teñidos para cada fluorocromo individual. Se seleccionaron las células vivas (negativas para *Aqua*), y se subdividieron, basándonos en los parámetros de forward scatter (FSC), side scatter (SSC) y expresión de CD14, en PBMCs totales ("PBMCs"), linfocitos, monocitos CD14⁺ y monocitos CD14^{neg}. Para obtener una respuesta normalizada para todos los DS y pacientes, tanto en el caso de los porcentajes de células IL-1β⁺ como de su intensidad media de fluorescencia para IL-1β, se calculó la ratio "valor con eprinomectina/valor con vehículo". A continuación mediante la fórmula "(ratio*100)-100" se obtuvo el porcentaje de reducción: valores negativos indican una reducción de la variable de interés al tratar con eprinomectina respecto del tratamiento sólo con vehículo; valores positivos son indicativos de un aumento. Para comparar estadísticamente los resultados en células tratadas con eprinomectina *versus* tratadas sólo con vehículo se empleó el software Prism: se analizó si los datos seguían o no una distribución normal: de ser así, se empleó el test t pareado de Student; en caso contrario se empleó el test de rangos de Wilcoxon.

Tras confirmar el efecto de la eprinomectina en la viabilidad celular, pasamos a verificar si este compuesto tiene la capacidad de reducir la secreción de la citocina proinflamatoria IL-1β. Para ello tratamos PBMCs de 5 DS con LPS y ATP, para a continuación incubarlos con diferentes

concentraciones de eprinomectina durante 48h. Tras ese tiempo se cuantificaron las citocinas secretadas en el medio de cultivo mediante Luminex, como en el Ejemplo 1.

La eprinomectina reduce la secreción de IL-1 β (ratios eprinomectina/medio por debajo de 1.0), siendo esta reducción más aparente a la concentración de 10⁻⁵M (Figura 2). Esta reducción no es atribuible al vehículo, puesto que los valores con eprinomectina son significativamente más bajos que únicamente con el vehículo (Figura 2, comparar línea continua y discontinua. p=0.0035. Test t pareado de Student). Por lo tanto, la eprinomectina provoca la reducción en la secreción de IL-1 β en nuestro modelo *in vitro* de inflamación, y dicha reducción no es atribuible al vehículo. Esta reducción a 10⁻⁵M se observa en todos los donantes analizados (Figura 3 y Tabla 3), y el porcentaje medio de reducción a dicha concentración es de 26.93% $\pm$ 6.84%.

Tabla 3: Valores empleados en la Figura 2. Ratios de los valores obtenidos para IL-1 β en sobrenadantes de células tratadas con eprinomectina o con vehículo *versus* células sin tratar. Valores por debajo de 1 indican reducción en la secreción de la citocina por parte de la eprinomectina.

Concen tración	Log ₁₀ conc entra ción	Eprinomectina					Vehículo				
		DS_00 9	DS_01 3	DS_00 8	DS_01 4	DS_01 6	DS_ 009	DS_01 3	DS_00 8	DS_01 4	DS_0 16
10 ⁻⁶	-6.0	0.87	0.96	1.24	0.97	0.73	1.02	0.97	1.65	0.87	0.86
10 ⁻⁵	-5.0	0.77	0.68	0.78	0.63	0.55	0.92	0.97	1.21	0.92	0.79

Una vez observado que el tratamiento de nuestro modelo *in vitro* de inflamación con eprinomectina reduce la secreción de la citocina proinflamatoria IL-1 β , pasamos a comprobar si este efecto es también observado en los niveles de citocina intracelular, además de en la secretada al medio de cultivo. En este caso no sólo empleamos PBMCs de donantes sanos, sino también células de pacientes recién diagnosticados de artritis reumatoide y que aún no han recibido ningún tratamiento (“naive”), por lo que su respuesta inmune aún no ha sido alterada por fármacos.

Para ello, tras la centrifugación y el almacenamiento de los medios de cultivo, las células fueron teñidas para diferentes marcadores y analizadas mediante citometría de flujo (ver Metodología).

En resumen, las células se tiñeron con Anti-CD14/FITC, un marcador que permite la distinción

entre células vivas y células apoptóticas/necróticas/moribundas (*Aqua*, para confirmar que los anticuerpos anti-citocina no están uniéndose a células no viables), y Anti-IL-1 β /PE.

El porcentaje de células IL-1 β ⁺ aumenta tras el tratamiento con eprinomectina respecto del vehículo, siendo este aumento significativo en PBMCs (Figura 4A) y monocitos CD14^{neg} (Figura 4B). Por lo tanto, la eprinomectina reduce la secreción de IL-1 β al medio de cultivo al impedir o bien la secreción o bien el procesamiento de IL-1 β , lo cual viene reflejado por un aumento en el porcentaje de células que contienen IL-1 β . Este efecto es más aparente en los monocitos CD14^{neg}.

Por lo tanto, la eprinomectina reduce la secreción de IL-1 β , tanto en donantes sanos como en pacientes con artritis reumatoide.

Tabla 4: Porcentajes de reducción en el porcentaje de células IL-1 β ⁺ y en su intensidad media de fluorescencia, representados en la Figura 4.

Donante	DS_002	DS_012	DS_013	DS_016	N_001	N_005	N_006
Reducción de PBMCs IL-1 β ⁺ (%)	20.16	-6.25	14.13	27.03	2.46	34.48	-1.79
Reducción de monocitos CD14 ⁺ IL-1 β ⁺ (%)	7.19	-33.26	0.10	-5.71	-16.44	6.67	0.00
Reducción de monocitos CD14 ^{neg} IL-1 β ⁺ (%)	147.28	44.44	75.16	94.03	190.40	73.94	-3.25
Reducción de linfocitos IL-1 β ⁺ (%)	23.53	-3.57	11.59	-18.75	3.85	36.84	22.45

Ejemplo 4: Estudio del efecto del tratamiento con eprinomectina en la capacidad de producción y secreción de TNF- α .

Para aumentar la cantidad de TNF- α secretado al medio y mejorar nuestra ventana de detección de esta citocina, desarrollamos un modelo *in vitro* de inflamación modificado, en el que las células fueron tratadas con LPS y ATP como en el Ejemplo 1, y tras dos lavados fueron incubadas con PHA-L (eBioscience, ref #00-4977-93) y con eprinomectina o vehículo durante 48h. Tras 43h se añadió brefeldina A, y a las 48h las células fueron centrifugadas y teñidas tal y como se indica a continuación; los medios de cultivo se congelaron a -80°C.

Para la cuantificación de TNF- α en este modelo modificado, los medios de cultivo fueron descongelados, centrifugados, y TNF- α cuantificada empleando el *AlphaLISA Human TNF- α Biotin-Free Detection Kit* (Perkin-Elmer, ref # AL325), siguiendo instrucciones del fabricante. La placa fue leída en un lector Envision. Durante el análisis, para obtener una respuesta
 5 normalizada para todas las muestras, se calculó la ratio “valor con eprinomectina/valor con vehículo”. A continuación mediante la fórmula “(ratio*100)-100” se obtuvo el porcentaje de reducción: valores negativos indican una reducción en la secreción de TNF- α al tratar con eprinomectina respecto del tratamiento sólo con vehículo; valores positivos son indicativos un aumento. Para comparar estadísticamente los resultados en células tratadas con eprinomectina
 10 *versus* tratadas sólo con vehículo se empleó el software Prism: se analizó si los datos (pg/mL TNF- α) seguían o no una distribución normal: de ser así, se empleó el test t pareado de Student; en caso contrario se empleó el test de rangos de Wilcoxon.

En lo que respecta a la detección de TNF- α intracelular mediante citometría de flujo, se siguió el mismo protocolo que ha sido descrito en el Ejemplo 3, con la única modificación de reactivos
 15 empleados en la tinción: se empleó *Red fluorescent reactive dye* (Invitrogen, ref # L34971) en vez de *Aqua*, y un anticuerpo monoclonal Anti-TNF- α conjugado a AlexaFluor647 (BioLegend, ref # 502916. 5 μ L/muestra) en vez de un Anti-IL1 β . Las muestras se adquirieron en un citómetro FACSCalibur. Como controles para la compensación se tiñeron *beads* de compensación (*Anti-mouse Ig, κ , comp beads*, BD) con Anti-CD14/FITC o Anti-TNF- α /AF647.
 20 Para tener un control de tinción para *Red fluorescent reactive dye*, de una muestra de 1x10⁶ PBMCs se tomaron 1x10⁶ de células y se lisaron mediante incubación durante 10' a 56C, tras lo cual se reincorporaron al tubo y se tiñeron únicamente con *Red fluorescent reactive dye*. También se dejó una muestra de células sin teñir. El análisis de los resultados se realizó igual que en el Ejemplo 3.

Tras confirmar el efecto de la eprinomectina en la viabilidad celular, pasamos a verificar si este compuesto tiene la capacidad de reducir la secreción de la citocina proinflamatoria TNF- α . Para
 25 aumentar la cantidad de TNF- α secretado por nuestro modelo *in vitro* de inflamación, y así mejorar nuestra ventana de detección, añadimos fitohemaglutinina-L (PHA-L) al medio de cultivo (ver metodología): esta mezcla de lectinas se emplea para la activación *in vitro* de
 30 leucocitos, y su uso aumenta la secreción de citocinas (Ceuppens, J. L. *et al* , *J Immunol* 1988. **141**(11): 3868-3874). Tal y como se aprecia en la Figura 5, la adición de PHA-L provoca un

aumento significativo en la producción de TNF- α ($p=0.0001$. Test t de Student), aumentando nuestra ventana de cuantificación.

Una vez modificado el modelo, tratamos las células con eprinomectina $10^{-5}M$ y cuantificamos TNF- α mediante un ensayo de ELISA de alta sensibilidad (AlphaLISA). En este caso
5 empleamos PBMCs de donantes sanos, y también de pacientes recién diagnosticados de artritis reumatoide y que aún no han recibido ningún tratamiento (“naive”, N en las figuras y tablas), por lo que su respuesta inmune aún no ha sido alterada por fármacos.

Efectivamente, la eprinomectina induce una reducción significativa en la secreción de TNF- α tanto en DS como en pacientes (Figura 6A,B. $p=0.0156$. Test de rangos de Wilcoxon). La
10 reducción media (relativa al vehículo) es $33.4\% \pm 21.6\%$, y sólo en un donante (N_005) la eprinomectina no muestra este efecto reductor.

Una vez confirmado que el tratamiento con eprinomectina de nuestro modelo *in vitro* de inflamación modificado reduce la secreción de la citocina proinflamatoria TNF- α , pasamos a comprobar si este efecto podía ser detectado también a nivel intracelular.

15 Para ello, tras la centrifugación y el almacenamiento de los medios de cultivo, las células fueron teñidas para diferentes marcadores y analizadas mediante citometría de flujo. En resumen, las células se tiñeron con Anti-CD14, un marcador que permite la distinción entre células vivas y células apoptóticas/necróticas/moribundas (para confirmar que los anticuerpos anti-citocina no están uniéndose a células no viables), y Anti-TNF- α .

20 El porcentaje de células TNF- α^+ aumenta tras el tratamiento con eprinomectina, siendo este aumento significativo en PBMCs, y monocitos CD14^{neg}, casi alcanzando también significancia estadística en linfocitos (Figura 7). Estos resultados son idénticos a los obtenidos mediante cuantificación de TNF- α en el medio extracelular (comparar Figuras 6B y 7A).

La cantidad de citocina presente en las células TNF- α^+ es significativamente menor en PBMCs
25 y linfocitos tras el tratamiento con eprinomectina, cuantificado como la intensidad media de fluorescencia (IMF) (Figura 8). Por lo tanto, la eprinomectina reduce tanto la frecuencia de células TNF- α^+ como la cantidad de TNF- α presente en dichas células, siendo este último efecto específico de linfocitos.

Por lo tanto, la eprinomectina reduce la secreción de TNF- α , tanto en donantes sanos como en
30 pacientes con artritis reumatoide.

Tabla 5: Porcentajes de reducción en el porcentaje de células TNF- α^+ y en su intensidad media de fluorescencia, representados en la Figuras 7 y 8.

Donante	DS_002	DS_009	DS_012	DS_014	N_001	N_003	N_005
Reducción de PBMCs TNF- α^+ (%)	-2.13	-68.34	-29.82	-59.44	-34.71	-30.76	15.53
Reducción de monocitos CD14 ⁺ TNF- α^+ (%)	-27.19	-69.18	-7.73	-23.66	34.92	-40.22	36.51
Reducción de monocitos CD14 ^{neg} TNF- α^+ (%)	-6.61	-60.80	-26.26	-54.59	-60.83	-21.35	21.32
Reducción de linfocitos TNF- α^+ (%)	-0.16	-68.43	-28.61	-94.59	-29.52	-27.40	17.45
Reducción de IMF en PBMCs TNF- α^+	-14.29	-12.60	-11.43	-9.80	-18.64	-12.75	5.78
Reducción de IMF en monocitos CD14 ⁺ TNF- α^+	112.29	-20.00	19.95	-3.37	77.31	-7.67	-3.33
Reducción de IMF monocitos CD14 ^{neg} TNF- α^+	6.99	-16.50	-4.26	-9.51	25.23	-8.53	13.20
Reducción de IMF en linfocitos TNF- α^+	-13.56	-11.41	-13.61	-8.63	-15.43	-12.71	4.82

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende eprinomectina, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o un análogo de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
- 5 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde la enfermedad inflamatoria es artritis reumatoide.
3. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde eprinomectina, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma o un análogo de la misma se encuentra en combinación con un ingrediente activo adicional.
- 10 4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición se administra en una forma farmacéutica apropiada para la administración oral, intravenosa, subcutánea o intramuscular.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha composición está en forma líquida o liofilizada.

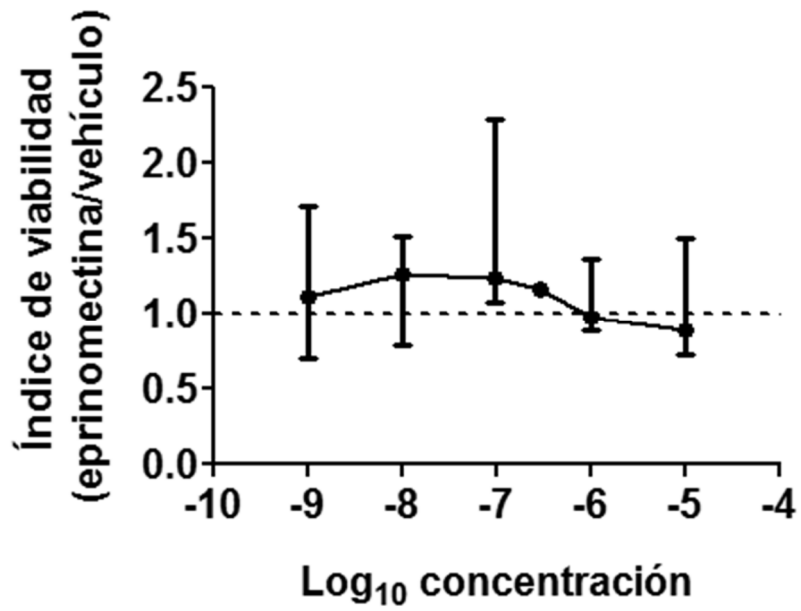


Figura 1

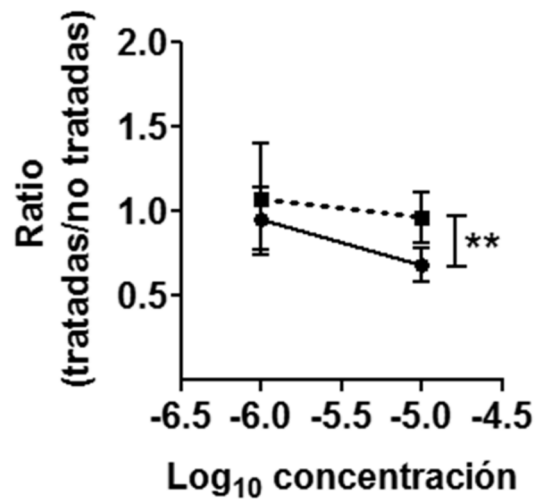


Figura 2

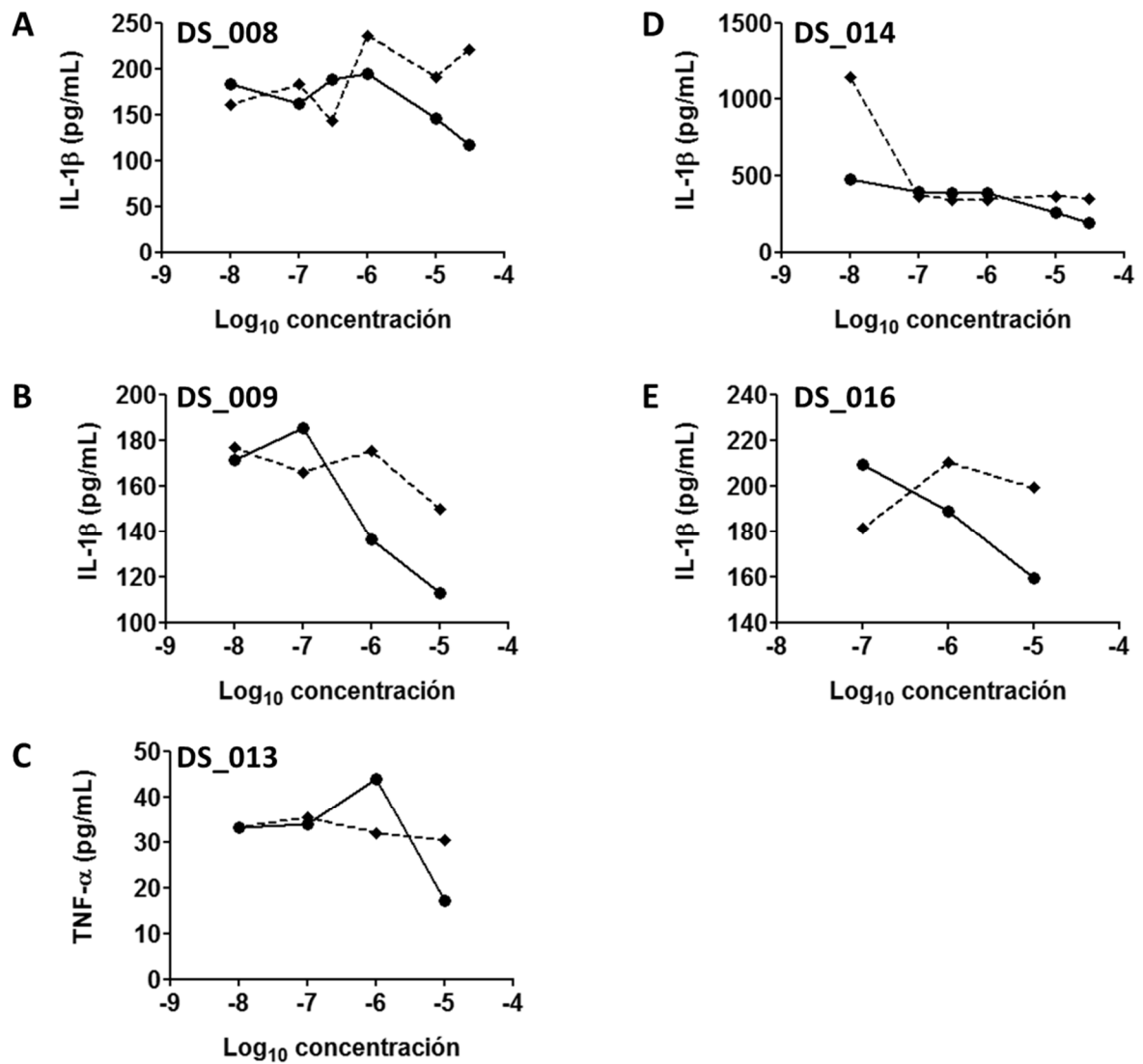


Figura 3

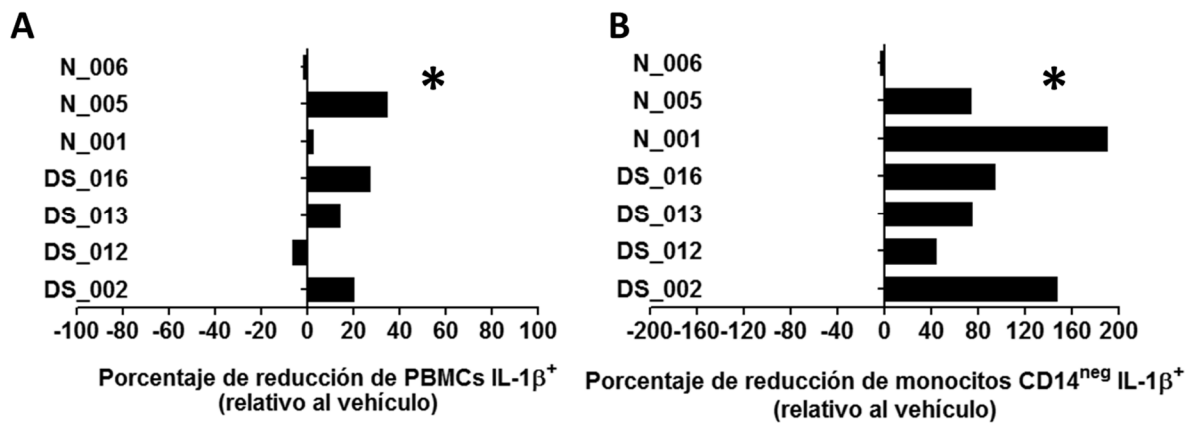


Figura 4

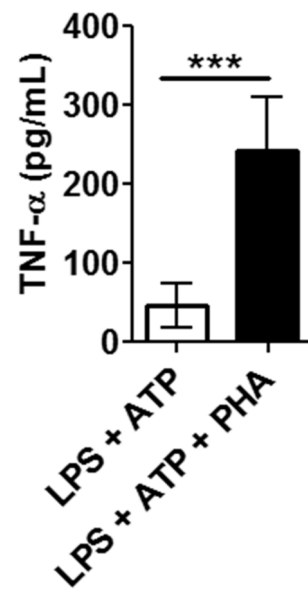


Figura 5

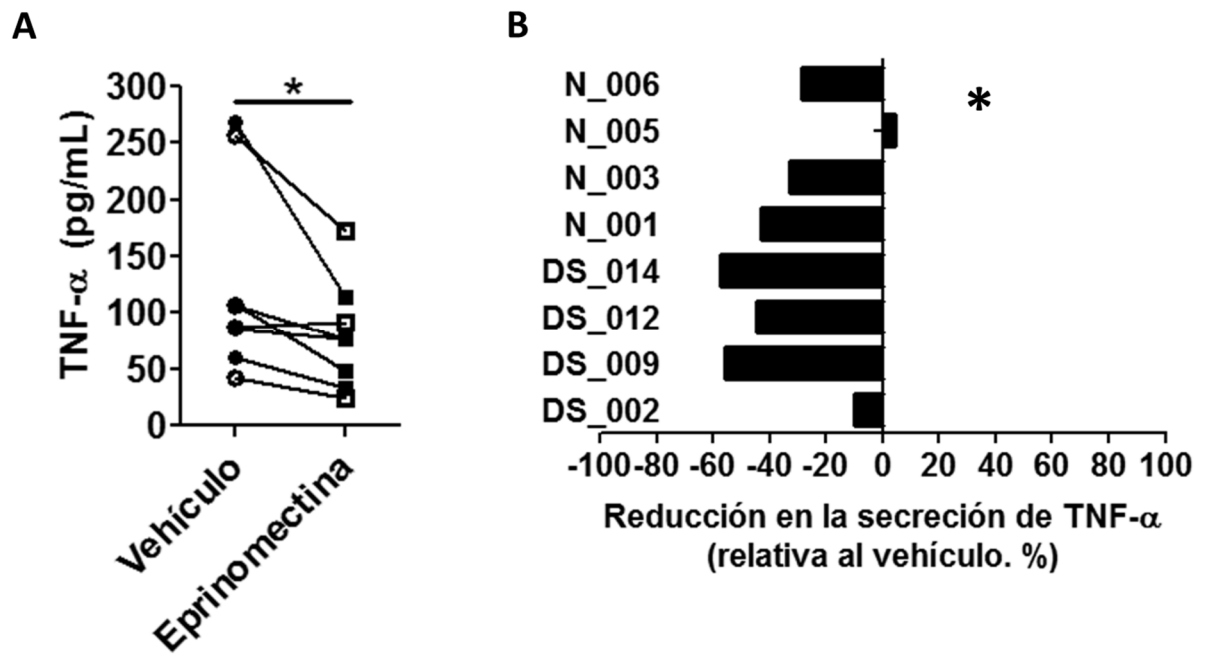


Figura 6

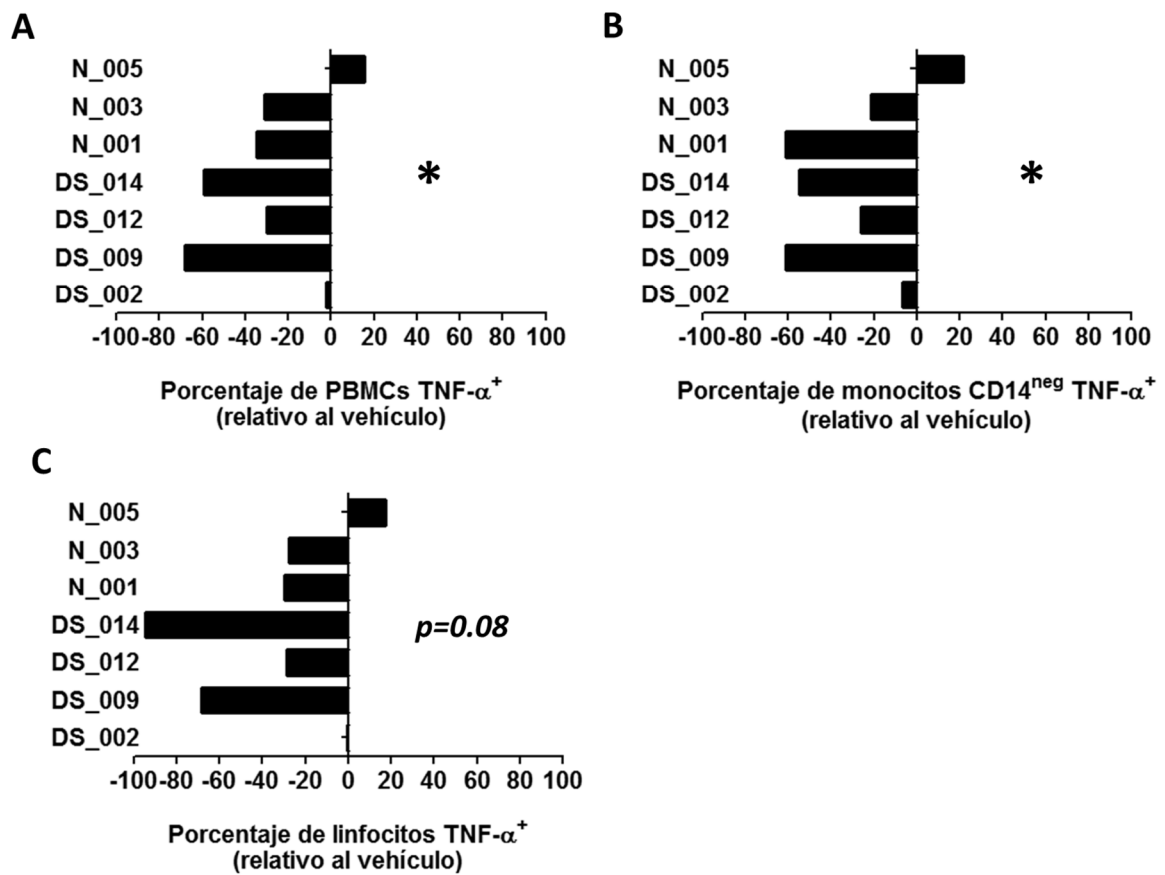


Figura 7

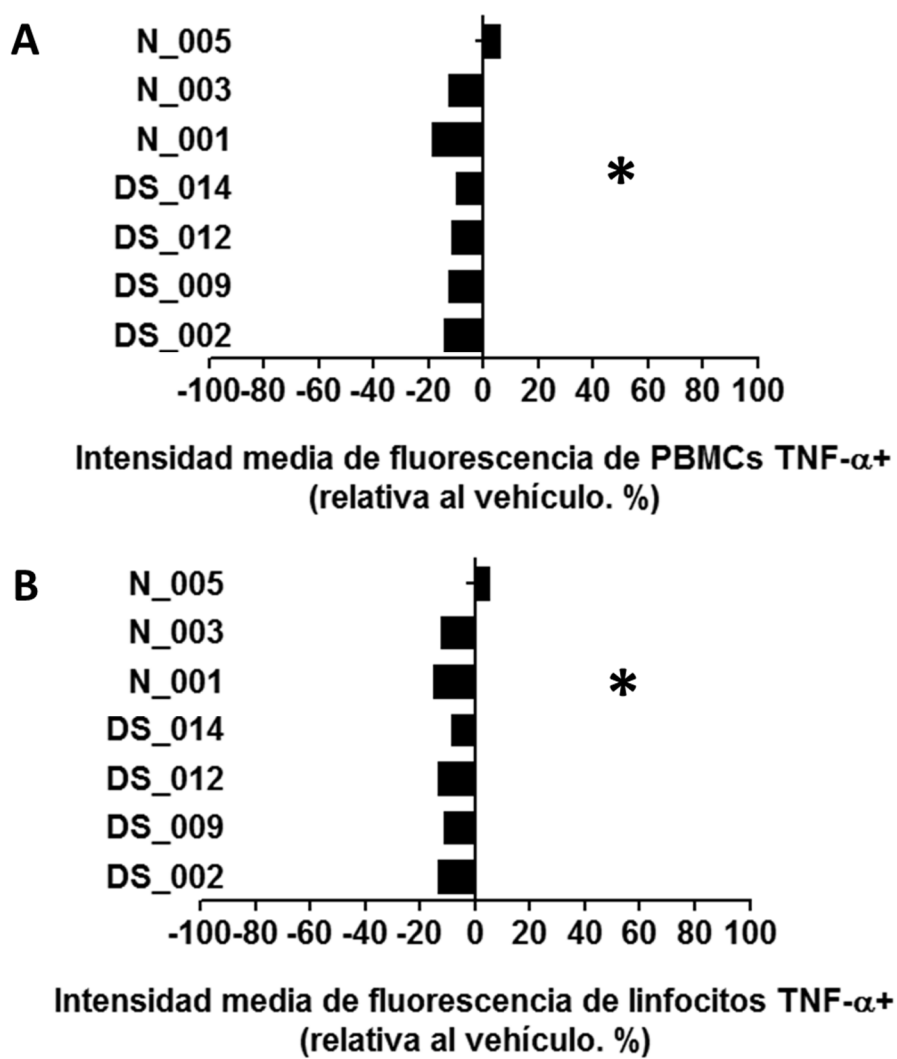


Figura 8



- ②① N.º solicitud: 202031238
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.12.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/351** (2006.01)
A61P29/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2019136211 A1 (ATTILLAPS HOLDINGS [US]; SPALLITTA FRANK ANTHONY [US]) 11/07/2019, párrafos [1 - 33]; párrafos [71 - 190]; reivindicaciones 1-83;	1-5
X	WO 9222302 A1 (FRACTAL LAB INC [US]) 23/12/1992, todo el documento	1-5
Y	ZHANG X. et al. Ivermectin inhibits LPS-induced production of inflammatory cytokines and improves LPS-induced survival in mice. Inflamm. res.,13/11/2008, Vol. 57, Páginas 524-529, todo el documento	1-5
Y	SÁNCHEZ-RAMÓN S. et al. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. Reumatol Clin, 2011, Vol. S3, Páginas S20-S24, todo el documento	1-5
A	WO 2019221959 A1 (PEYMAN GHOLAM A [US]) 21/11/2019, párrafos [1 - 36]; párrafos [181 - 290]; párrafos [333 - 487]; reivindicaciones 1-24	1-5

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
22.07.2021

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/2

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, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS