



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 364**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05735990 .3**
96 Fecha de presentación : **15.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1755642**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Anexina V para prevenir la ruptura de la placa.**

30 Prioridad: **15.04.2004 US 521385 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es: **ATHERA BIOTECHNOLOGIES AB.**
Fogdevreten 2B
17177 Stockholm, SE

72 Inventor/es: **Frostegard, Anna y**
Frostegard, Johan

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 356 364 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención tiene relación con los campos de aterosclerosis y aterotrombosis. La invención trata específicamente de mecanismos novedosos para la prevención o inhibición de la ruptura de las placas.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

Hay una interrelación entre aterosclerosis y aterotrombosis.

La aterosclerosis tiene muchas características de una enfermedad inflamatoria, incluyendo abundancia de células inflamatorias y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en lesiones ^{1,2}.

El aumento de riesgo de mortalidad debido a las enfermedades cardiovasculares, específicamente en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE), es un problema clínico serio.

Las enfermedades cardiovasculares en pacientes SLE están asociadas a la vez con factores tradicionales de riesgo como dislipidemia, y factores no tradicionales de riesgo incluyendo la oxidación aumentada de la lipoproteína de baja densidad (oxLDL), actividad elevada en el factor necrosis tumor (TNF)-sistema (cercanamente asociado con dislipidemia), inflamación sistémica según se determina por CRP, homocisteína y anticuerpos anti-fosfolípidos (aPL) ³⁻⁷. Los anti-fosfolípidos pueden causar el síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido (APS), común en pacientes SLE y caracterizado por la pérdida de embarazo recurrente y trombosis recurrente ^{8,9}. Diferentes formas de anti-fosfolípidos han sido también implicadas en enfermedades cardiovasculares en la población general ^{10,11}.

Las anexinas comparten la propiedad de unir calcio y fosfolípidos cargados negativamente, ambos de los cuales son requeridos para la coagulación de la sangre. Recientemente, Anexina V ha sido implicada en el síndrome de anticuerpo anti-fosfolípido ya que algunos anticuerpos anti-fosfolípidos rompen la capa antitrombótica de la Anexina-V en la placenta, predisponiendo a la placenta a la microtrombosis y al aborto recurrente ¹²⁻¹⁴.

La unión de Anexina V a plaquetas activadas y células dañadas probablemente explique la retención selectiva de la proteína en trombos. Esto se ha mostrado en modelos experimentales de trombosis ¹⁵ venosa y arterial en animales y la Anexina clasificada ha sido propuesta para la formación de imagen médica del trombo vascular en humanos, con reducido ruido y aumento en seguridad ¹⁶.

Se ha informado ¹⁸ que la Anexina V administrada de forma exógena tiene afinidad por las células apoptóticas o estresadas y que esta propiedad puede ser utilizada para crear una prueba molecular multifuncional útil en la representación óptica y en el tratamiento de placas inestables, en las cuales la Anexina está acoplada a moléculas diana y efectoras. Las moléculas efectoras son utilizadas para destruir selectivamente o inhibir las células estresadas o apoptóticas. Sin embargo, no hay indicación de que la Anexina V sola (es decir, sin moléculas diana o efectoras) tendría algún efecto en las placas inestables.

La Anexina V ha sido sugerida para disminuir la actividad apoptótica de las células en las placas ateroscleróticas de modelos ¹⁹ de ratón apoE ^{-/-}. Sin embargo, el informe falla en mostrar algún efecto de ruptura de las placas, y no dice nada sobre los modelos humanos.

Se ha mostrado también que la Anexina V inhibe la trombosis arterial en los conejos ²⁰ y que este efecto es mediado mediante su interacción con fosfatidilserina (PS) en plaquetas. No hay discusión en esta referencia de aterotrombosis o rotura de placa, ni ningún dato relacionado con humanos.

Un problema importante asociado con el uso terapéutico de Anexina V en los trastornos de coagulación es su corta vida media en la circulación, estimada en animales experimentales de 5 a 15 minutos ^{15, 17}; la Anexina V tiene una corta vida media en la circulación de los humanos.

En EP1379266 "Proteínas Anexina modificadas y métodos para prevenir trombosis" se reivindica una proteína Anexina polietilén glicol-modificada para ser utilizada para evitar la trombosis sin aumentar la hemorragia. La vida media de Anexina V crece usando un conjugado PEG en un método para evitar la unión del complejo protrombinasa necesaria para la formación del trombo.

En la presente invención hemos mostrado que la Anexina V puede estabilizar la placa aterosclerótica. Cuando la Anexina V o un fragmento N-terminal de Anexina V es administrada según la invención, preferiblemente por inyección, se unirá a la placa endotelial en un primer paso. La corta vida media de Anexina V en la circulación no es así un problema como en el caso de EP1379266. Una composición para la inyección que comprende Anexina V o un fragmento N-terminal de Anexina V con o

sin aditivos evitarán en consecuencia la aterotrombosis mediante la estabilización de la placa carótida a través de una unión instantánea.

La inmunoglobulina G o IgG es una proteína encontrada en adultos en concentraciones normales que están entre 900 mg/dl hasta 2400 mg/dl. Esto es aproximadamente 20% del total de proteína encontrada en el suero o plasma. IgG tiene una vida media de 23 días. Contribuye a la inmunidad a las bacterias, virus, parásitos, algunos hongos y proporciona actividad de anticuerpo en el tejido. IgG es capaz de activar un complemento que provoca la respuesta inflamatoria y es un sujeto en sí misma. IgG proporciona protección contra varios virus y similares para los animales a través de inoculaciones o exposición de corral natural. Una vez que ocurre la exposición, se desarrolla una memoria la cual permite al cuerpo fabricar rápidamente los anticuerpos necesarios para luchar contra las infecciones específicas. En humanos IgG es transferida al bebé a través de la placenta. Si no está presente IgG o está en bajos niveles, los mamíferos tienen pocas defensas contra cualquier agente infeccioso al que podrían ser expuestos.

Las preparaciones de inmunoglobulina intravenosa (p.e, IGIV; Baxter y otros es una preparación altamente purificada de IgG comercialmente disponible y es utilizada en los tratamientos de pacientes que no tienen, o tienen bajos niveles de producción de anticuerpo. Las preparaciones de inmunoglobulina incluyen las disponibles de las siguientes fabricaciones: Baxter (US) eg Gammagard®, Isiven (Antimo Naples, Italy), Omrix (Tel-Hashomer, Israel), Miles (Biological Products Division, West Heaven, CT), Sclavo (Lucca, Italy), Sandoz (Novartis, Basel, Switzerland eg Sandoglobulin®), Biotest Diagnostic Corporation (Deville, NJ). Examples of immunoglobulin preparations are Gammagard S/D®, Gammar IV®, Gammar-P IV®, Gammimune N®, Iveegam®, Panglobulin®, Polygam S/D®, Sandoglobulin®, Venoglobulin®. Las preparaciones de inmunoglobulina típicamente contienen algún IgM así como IgG. Trazas de IgM están presentes en Gammagard®. Pentaglobin (Biotest) es una preparación de IgM enriquecida que ha sido utilizada para el tratamiento de SARS.

Tales preparaciones de Ivlg de plasma colectivo derivado de muchos donantes son a menudo utilizadas también en condiciones autoinmunes, donde un modo reconocido de acción es la presencia de anticuerpos anti-idiotípicos, p.e; anticuerpos que reaccionan con y neutralizan otros anticuerpos que son patogénicos.

En US6613328 se ha descrito un método para tratar enfermedades de trombosis con anticuerpos específicos de factor von Willebrand. Los anticuerpos humanizados son específicamente producidos. No hay sin embargo información sobre que inmunoglobulinas directamente disponibles tales como IGIV o subfracciones de estas inmunoglobulinas puedan ser utilizadas para prevenir aterotrombosis o ruptura de placa. Además, no hay información en la literatura de que IgG pueda inhibir la unión de anticuerpos a Anexina V nativa, que es una posible razón de la disminución de unión de Anexina V al endotelio, presentada en esta invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona el uso de Anexina V, opcionalmente en forma de sal, para impedir la ruptura de placa en humanos.

La invención también proporciona el uso de una preparación inmunoglobulina (IVIG) intravenosa para evitar la ruptura de placa en un paciente humano SLE.

La invención también proporciona el uso de una subfracción de anticuerpo anti Ig purificado de una preparación colectiva de inmunoglobulina conteniendo anticuerpos anti-aPAF y/o anticuerpos anti-IgG con la capacidad de disminuir el efecto inhibitor de plasma de un paciente con lupus eritematoso sistémico al unir Anexina V a células endoteliales, para evitar la ruptura de placa en un paciente humano SLE.

Así, lo descrito aquí son usos para evitar la ruptura de placas por administración de un compuesto que restaura la unión de Anexina V a la placa, lo que puede ser por inhibición de Ig responsable de la inhibición de la unión. Este tratamiento es logrado bien dando una dosis de Anexina V preferiblemente por inyección IV; o por administración IV de inmunoglobulinas o una subfracción de inmunoglobulinas que actúa para promover la unión de Anexina V a la placa, posiblemente inhibiendo la unión de Anexina V a anticuerpos. La inmunoglobulina (IGIV; Baxter) u otras preparaciones comercialmente disponibles (ejemplos de los cuales se indican antes) así como subfracciones purificadas por afinidad, que son conocidas por la técnica de tratamiento y prevención de infecciones y condiciones severas autoinmunes, pueden ser utilizadas. Una subfracción de de inmunoglobulina purificada por afinidad es preferible.

El compuesto activo (Anexina V o subfracción de inmunoglobulina) es administrado a un sujeto con riesgo de aterotrombosis utilizando una composición farmacéutica teniendo una cantidad efectiva del componente activo. La composición farmacéutica puede ser administrada intravenosamente o por otras

rutas como un tratamiento de pacientes pertenecientes a un grupo de riesgo. Un grupo de riesgo preferible son pacientes de lupus eritematoso sistémico (SLE). El tratamiento puede ser repetido a intervalos óptimos de tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

5 El riesgo de ruptura de placa es fuertemente elevado cuando la unión de Anexina V al endotelio disminuye como consecuencia de los anticuerpos que inhiben la unión Anexina V-placa. La restauración de la unión de Anexina V por administración de Anexina V (o fragmentos) o por administración de inmunoglobulinas, preferiblemente una subfracción de inmunoglobulinas (p.e; una subfracción de una preparación colectiva de inmunoglobulina como se describió arriba), que inhibe otros anticuerpos (por ejemplo anticuerpos que ligan Anexina V) que disminuye la unión placa-Anexina proporciona nuevas terapias propuestas para la ruptura de placa, la principal causa de enfermedad cardiovascular.

10 Un primer aspecto de la invención proporciona el uso de la proteína Anexina V opcionalmente en forma de sal, en la fabricación de una composición farmacéutica para evitar la rotura de placa.

15 El término Anexina V es bien conocido por los especialistas en la técnica usado, por ejemplo, en documentos citados arriba, por ejemplo EP 1 379 266. Para los entendidos, el fragmento N-terminal de Anexina V es lo suficientemente grande para ser reconocible por los especialistas como un fragmento de Anexina V (en lugar de, por ejemplo, un fragmento de otra anexina).

20 La composición farmacéutica puede comprender una cantidad efectiva de proteína Anexina V opcionalmente en combinación con un portador y aditivos. portadores y aditivos adecuados que pueden usarse, serán bien conocidos por aquellos entendidos en la técnica, incluyendo los ejemplos usados en EP 1 379 266. La sal puede ser una sal con adición de ácido farmacéuticamente aceptable donde el ion contador es, por ejemplo, cloruro, acetato.

25 La cantidad efectiva de Anexina V en la composición farmacéutica puede determinarse de un análisis de estado diagnóstico de la unión Anexina V-endotelio. Así, la dosis puede determinarse por el cálculo del estado de la unión Anexina V-endotelio en el paciente. Así, la unión Anexina V-endotelio puede calcularse mediante el cálculo del efecto del suero del paciente en la unión de Anexina V al endotelio, por ejemplo utilizando un técnica tal como la usada en los ejemplos para calcular el efecto del plasma del paciente en la unión de Anexina V a las células endoteliales cultivadas (ver las secciones "Culture of endotelial cells binding; binding of Annexin V" y "Results"). El teñido inmunohistoquímico del material de la biopsia de placa del paciente (como se describe en la sección de ejemplos de "Immunohistochemical staining of human atherosclerotic plaque") podría ser también utilizado. Las técnicas de representación óptica que utilizan Anexina clasificadas (vea discusión de referencia 16 arriba (WO 95/343315)) pueden también ser utilizadas. Como bien comprenderá un especialista, si se viera que el paciente tiene una unión de Anexina V muy baja, entonces puede requerirse una alta dosis de Anexina V que si el paciente tiene una unión de Anexina V cercana a la encontrada en una persona normal.

35 La invención proporciona un tratamiento de un sujeto con riesgo de rotura de placa, comprendiendo la administración a dicho sujeto de una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de Anexina V, opcionalmente en forma de sal.

40 El sujeto con riesgo puede ser un paciente con lupus eritematoso sistémico (SLE). El paciente SLE podría además tener factores de riesgo como se discutió arriba, por ejemplo dislipidemia, oxidación elevada de lipoproteína de baja densidad (oxLDL), elevada actividad en el factor de necrosis del tumor (TNF)-sistema (muy asociado con dislipidemia), inflamación sistémica como la determinada por CRP, homocisteína y anticuerpos anti-fosfolípido (aPL). El paciente SLE puede además mostrar trombosis recurrente o aterotrombosis repetitiva frecuente, o haber sobrevivido a una o más manifestaciones de enfermedades cardiovasculares, por ejemplo infarto tromboembólico, vasculítico o no hemorrágico, infarto de miocardio, angina de pecho o claudicación intermitente. El sujeto de riesgo puede ser un paciente que tiene o ha tenido, o está en riesgo de, infección pneumocócica; o podría ser un paciente con placas vulnerables, como se identifica en base a los síntomas y evaluación clínica indicativos de enfermedades cardiovasculares inminentes tales como angina inestable, otras formas de angina severa, o ataques isquémicos pasajeros (TIA). Una evaluación de unión Anexina V-endotelio, como se discutió arriba, puede ser utilizada para evaluar el riesgo.

55 También descrito aquí está el uso de una subfracción purificada de inmunoglobulinas (e.d, subfracción purificada de una preparación colectiva de inmunoglobulina, como se discutió arriba) con la capacidad para inhibir anticuerpos que unen la Anexina V. Tal subfracción podría prepararse utilizando técnicas indicadas arriba, por ejemplo, utilizando purificación por afinidad. La subfracción purificada podría ser una subfracción de anticuerpo anti IgG, por ejemplo una subfracción seleccionada por unión por afinidad a IgG, en particular al dominio constante IgG.

También descrita aquí está el uso de una subfracción purificada de inmunoglobulinas (e.d, una subfracción purificada de una preparación colectiva de inmunoglobulina, como se discutió arriba) con la capacidad de promover la unión de Anexina V al endotelio (o células endoteliales, por ejemplo en cultivos). Tal subfracción podría prepararse utilizando técnicas indicadas arriba, por ejemplo utilizando purificación por afinidad. La subfracción podría ser una subfracción de anticuerpo anti IgG, por ejemplo una subfracción seleccionada por unión por afinidad a IgG, en particular al dominio constante IgG. Tal subfracción podría contener una vacuna anti-aPAF, anti-aLPC, anti-aPS o anti-a-neumocócica que puede reducir los niveles de aPAF, aLPC, aPS o anticuerpos de vacuna neumocócica, cuyo agotamiento se halló que aumenta la unión de Anexina V (ver ejemplos). La capacidad de la subfracción para promover la unión de Anexina V al endotelio puede calcularse utilizando un ensayo de unión Anexina V-endotelio como se describe antes y en los ejemplos. Por ejemplo, una apropiada subfracción puede ser una que disminuya el efecto inhibidor del plasma de los casos SLE (suero de alto título de anticuerpos antifosfolípidos (aPLS)) en la unión de Anexina V a las células endoteliales. Como se ve en los ejemplos, hemos encontrado una correlación estadística entre los niveles de aPC-BSA y aPC-KLH y la unión de Anexina V. Se considera que IgG y/o IgM aPC puede unir algún IgG (ver, por ejemplo Halpern et al (1991) J Clin Invest 88(2), 476-482) y son más probablemente producidos por las células B1, un subtipo de célula B que puede neutralizar también las células B2 para producir IgG.

También se describe aquí una subfracción purificada de la invención para uso para impedir la ruptura de placa.

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de una subfracción purificada de acuerdo al aspecto precedente de la invención o el uso de una preparación de inmunoglobulina disponible comercialmente (esto es, preparación colectiva de inmunoglobulina, como se discutió arriba) en la fabricación de un medicamento para prevenir la ruptura de placa.

También está aquí descrito un tratamiento de un sujeto con riesgo de ruptura de placa, comprendiendo la administración a dicho sujeto de una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de inmunoglobulina (es decir, de una preparación colectiva de inmunoglobulina como se discutió arriba) o una subfracción purificada de inmunoglobulina (ejemplos de los cuales se indicaron arriba).

Se han discutido antes las preferencias para el sujeto a tratar (o para el que el medicamento de tratamiento debe usarse) . El sujeto podría ser, por ejemplo, un paciente con lupus eritematoso sistémico (SLE) o un paciente que tiene, ha tenido o sufre riesgo de infección neumocócica; o un paciente con placas vulnerables y/o angina inestable.

La invención será descrita en más detalle mediante las siguientes, no limitativas, figuras y ejemplos.

Figuras:

Figura 1: Efecto de pre-incubación de suero de título alto de anticuerpos antifosfolípidos (aPLs) con inmunoglobulina colectiva humana Gammagard® en la unión de Anexina V a las células endoteliales umbilicales humanas (HUVECs): análisis de citometría de flujo después de 24 hrs de cultivo.

IVIG pre-incubado con suero en	Intensidad Media Fluorescencia (MFI) de unión de Anexina V
0 mg/ml	649
2.5 mg/ml	913
5 mg/ml	1269
10 mg/ml	1382

Figura 2: Efecto de pre-incubación de suero de título alto de anticuerpos antifosfolípidos (aPLs) con polisacárido capsular neumocócico en la unión de Anexina V a HUVECs: análisis de citometría de flujo después de 24 hrs de cultivo.

Suero de alto título aPLs preincubado con polisacárido capsular neumocócica en	Intensidad Media Fluorescencia (MFI) de unión de Anexia V
0 µg/ml	806

ES 2 356 364 T3

10 µg/ml	905
100 µg/ml	1860

Figura 3: efecto de pre-incubación de suero de título alto de anticuerpos antifosfolípidos (aPLs) con LysoPC y PAF en la unión de Anexina a HUVECs: análisis de citometría de flujo después de 24 hrs de cultivo.

Lyso PC	Media % APS	Mediana % APS
10 µg/ml	123.6	121.88
	156.9	138.23
	169.5	178.5
Av	150	146
SD	24	29
100 µg/ml	114.7	115.4
	195.12	174.65
	158.12	175.39
Av	156	155
SD	40	34
PAF	Media % APS	Mediana % APS
10 µg/ml	100	99
	155.6	134
	149.8	164
Av	135	132
SD	31	33
100 µg/ml	151	145
	122	116
	139	147
Av	137	136
SD	15	17

Figura 4: Efecto de pre-incubación de suero de título alto de anticuerpos antifosfolípidos con antígenos irrelevantes (toxoides tetánicos) en la unión de Anexina a HUVECs: análisis de citometría de flujo después de 24 hrs de cultivo.

Archivo		APS 24 hrs en HUVEC.001		
Casos Controlados		10000		
Casos Totales		13067		
% Controlados	Media	Media Geo	Mediana	Pico Ch

ES 2 356 364 T3

100.00	80.93	11.73	4.66	1
36.90	213.84	172.37	205.35	259
Archivo		TT100 24 hrs en HUVEC.006		
Casos Controlados		10000		
Casos Totales		13328		
% Controlados	Media	Media Geo	Mediana	Pico Ch
100.00	155.14	47.62	113.42	1
66.69	230.12	173.93	212.88	222

Figura 5: Efecto de pre-incubación de suero de título alto de anticuerpos antifosfolípidos (aPLs) con LysoPC en la unión de Anexina a BHVECs: análisis de citometría de flujo después de 24 hrs de cultivo.

Archivo		APS 24 hrs en HUVEC.001		
Casos Controlados		10000		
Casos Totales		13067		
% Controlados	Media	Media Geo	Mediana	Pico Ch
100.00	80.93	11.73	4.63	1
36.90	213.84	172.37	205.35	259
Archivo		LPC100 24 hrs e HUVEC.014		
Casos Controlados		10000		
Casos Totales		13163		
% Controlados	Media	Media Geo	Mediana	Pico Ch
100.00	275.37	62.95	153.99	1
67.03	408.50	268.96	352.27	453

EXPERIMENTAL

Grupo de estudio

- 10 El grupo de estudio consistía en 260 mujeres con SLE que habían sobrevivido a una o más manifestaciones de enfermedades cardiovasculares, definidas como infarto tromboembólico, no hemorrágico o vasculítico (n=15), (confirmado por tomografía computerizada o resonancia magnética); infarto de miocardio (n=7), (confirmado por electrocardiograma y un aumento de creatina quinasa); angina de pecho (n=9) (confirmada por test de esfuerzo) o claudicación intermitente (n=4) (aterosclerosis periférica confirmada por angiograma), mujeres de 26 años con SLE y sin manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular y mujeres sanas de 26 años correspondientes de población general.
- 15

Todos los pacientes cumplieron el criterio revisado 1982 de American Rheumatism Association para SLE16. El estudio fue aprobado por Ethics Committee of the Karolinska Hospital. Todos los participantes dieron consentimiento informado antes de entrar en el estudio.

Ultrasonido de Carótida

Las arterias carótidas derecha e izquierda fueron examinadas con un escáner dúplex (Acuson Sequoia, Mountain View, California, USA) y el grado de aterosclerosis fue determinado mediante grosor intimo-medio (IMT) fue determinado.

5 Cultivo de unión de células endoteliales de Anexina V

Células endoteliales venosas umbilicales colectivas humanas criopreservadas (HUVECs) en el paso 2 fueron adquiridas de Cascade Biologics, Inc. (Portland, OR, USA) los cultivos se mantuvieron en medio EGMTM fenol libre de rojo (Clonetics, San Diego, CA, USA), conteniendo 2% de suero bovino fetal y suplementos. Las células fueron incubadas en frascos de 75 cm² (TPP, AG, Trasadingen, Switzerland) bajo CO₂ humidificado al 5% en condiciones de 37°C. Todos los experimentos se desarrollaron en vías 3 a 4. Fueron cultivados HUEVECs a densidad 2x10⁴ células/ml en placas de 12 pocillos (NUNC, Inc, Naperville, IL, USA) para el análisis de citometría de flujo; a densidad de 1x10⁴ células/pocillo/100 µl en placas de 96 pocillos (TPP) para el ensayo MTT; a densidad 8 x10³ células/ml en placas de 24 pocillos (NUNC) para fragmentación de ADN ELISA. Después de dejarlas 12-24 horas para acoplamiento y de un lavado cuidadoso en medio libre de suero (SFM), las células fueron inactivadas en SFM durante al menos 12 hrs antes del tratamiento. Plasma de los grupos de estudio conservado en heparina fue añadido a la monocapa a concentración de 10% en SFM.

Las células fueron recogidas no enzimáticamente con Cell Dissociation Solution (CDS; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). HUVECs fueron cuidadosamente mezcladas con sobrenadante, para excluir la pérdida selectiva de flotación separada EP, y centrifugadas a 1200 rpm durante 7 min. Después de la resuspensión en 100 µl de buffer de unión de Anexina V (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA), las muestras fueron teñidas con 5mg/ml de Anexina V-FITC (Mol. Probes) e incubadas durante 15 min en hielo. Brevemente antes de la adquisición se añadió 1mg/ml de yoduro propidio (PI; R&DSYSTEMS Europe Ltd, Abingdon, UK). El análisis fue desarrollado en un fotómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipado con software CellQuestTM. Durante la adquisición, se estableció una limitación para excluir casos menores de 230 de FCS lineal y escala SSC. Para cada muestra se recogieron 10000 casos.

Teñido inmunohistoquímico de placas ateroscleróticas humanas

Se llevó a cabo un inmunoteñido en placas humanas, caracterizadas previamente. Las placas fueron recogidas de 12 pacientes que sufrían endarterectomía de carótida después de ataques isquémicos transitorios. Todos los especímenes contenían lesiones ateroscleróticas avanzadas. Como control, fue obtenida una arteria mesentérica macroscópicamente sana después de una ectomía del intestino grueso no relacionada. Las secciones de criostato se fijaron durante 20 minutos en 2% de paraformaldehído en PBS (Sigma Chemicals) a 4°C y almacenadas a -70°C. Después de bloquear peroxidasa endógena, las secciones fueron incubadas durante la noche con anticuerpo monoclonal anti-Anexina V (Alexis Biochemicals, Corp., Lauren, Switzerland) de ratón tipo IgG2a, anti-CD68 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) o anti-CD31 (Monosan, Uden, The Netherlands). Ratones irrelevantes IgG2a (Serotec Ltd, Oxford, UK) sirvieron como control negativo. Todos los anticuerpos fueron diluidos en 1%BSA-0.02%NaN₃ in PBS. Después del lavado, fue utilizado 1% suero de caballo normal en PBS. Se añadió Inmunoglobulina secundaria anti-ratón de caballo anticuerpo-biotinilada (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Se usó el kit de EliteTM de peroxidasa ABC (Vector Laboratories). El teñido fue revelado con diaminobenzidina (Vector Laboratories) y se hizo contrateñido con hematoxilina. Todas las secciones fueron analizadas en microscopio Leica DMRXA (Leica, Wetzlar, Germany).

Preparación de aPC

El total IgM o fracción IgG fue separada de la inmunoglobulina colectiva humana comercialmente disponible (Gammagard®) en 50mg/ml utilizando HiTrap IgM o columnas IgG (Amersham Biosciences). Los anticuerpos contra fosforilcolina (PC) fueron eluados después de la carga de IgM o fracción IgG en columnas de NHS-Sefarosa acopladas a PC conjugado a proteína de hemocianina de lapas (KLH)(1 o 5mg/ml) o a albúmina de suero bovino (BSA)(1 mg/ml) seguido de columna sólo de BSA. PC-BSA (Fosforileolina-Albúmina Suero Bovino) y PC-KLH fueron adquiridos de Biosearch Technologies, INC (Ca, USA). Fracciones eluidas fueron intercambiadas en buffer en columnas PD-10 y concentradas con dispositivos Millipore Centricone®. Se realizaron los procedimientos de acuerdo a las instrucciones dadas por los fabricantes. La concentración de IgM aPC preparada fue normalmente 50 µg/ml, y la concentración de IgG aPC fue normalmente 30 µg/ml.

55 Unión de Anexina V a células endoteliales

Se añadió plasma conservado en heparina con una alta capacidad para inhibir la unión de Anexina V a la monocapa HUVECs a concentración de 10% en SFM. Después de 24 hrs, las células fueron recogidas con Cell Dissociation Solution (CDS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y

cuidadosamente mezcladas con sobrenadante, para excluir la pérdida selectiva de células flotantes separadas, seguido de centrifugación a 1200 rpm durante 7 min. Después de la resuspensión en 100 μ l de buffer ligante de anexina V (Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) las muestras fueron teñidas con 2 μ l de 5 mg/ml anexina V-FITC (Molecular Probes) e incubadas durante 15 min en hielo. Poco antes de la adquisición se añadió 1 mg/ml de yoduro de propidio (PI; un tinte vital; R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK). El análisis fue desarrollado como se describe arriba.

RESULTADOS

Efecto de depleción de inmunoglobulina IgG en unión de Anexina V

La depleción de la subclase IgG de inmunoglobulinas resultó ser mayor en 2.7-2.6 veces en intensidad de fluorescencia de unión de Anexina V (media de suero completo FI: 267.95 \pm vs 709.91 \pm ; mediana FI: 222.67 \pm vs 567.42 \pm). La reconstitución de fracción IgG al suero agotado disminuyó la intensidad de fluorescencia mientras que los cultivos con eluato IgG resultaron en una intensidad de fluorescencia de unión de Anexina V comparable con la de los sueros completos.

La unión de Anexina V fue significativamente menor después de 24 hrs cuando se usó plasma de casos SLE en comparación a los controles (casos SLE vs controles de población: $p=0.002$, casos SLE vs controles SLE $p=0.02$). La depleción del total de IgG del suero con una alta capacidad para inhibir la unión de Anexina V, restauró esta unión completamente. Había una asociación positiva llamativa entre unión de Anexina V y el grado de aterosclerosis ($R=0.73$, $p<0.001$) entre casos SLE. El inmunoteñido reveló la presencia de Anexina V en 11/12 de las placas experimentadas.

Cromatografía de columna de afinidad a Proteína G

Los sueros colectivos con una alta capacidad para inhibir unión de Anexina V a EC fueron 0.45 μ m filtrados y diluidos con igual volumen de medio basal endotelial. Se usó la proteína HiTrap G HP, columna de 1 ml con capacidad de unión 25 mg IgG humano /ml gel de Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La fracción de IgG obtenida por elución de la columna con 0.1M glicina-HCl, pH 2.7. Para la neutralización se usó 1M Tris-HCl, pH 9.0. Fueron utilizados suero completo, eluato y eluato para incubación con HUVEC en el día de separación a dilución 1:10 en SFM.

Mediciones de unión de Anexina V a las células endoteliales.

La frecuencia de HUVECs positivos para teñido de Anexina V fue determinada como porcentaje de células de anexina V⁺/PI⁺ en un diagrama de puntos bivariable de células de Anexina V⁺ basadas en un histograma. La unión de Anexina V a HUVECs en presencia de suero conocido por disminuir la unión y preincubado con IVIG fue determinado. La preincubación con IVIG pudo restaurar la unión de Anexina, indicando que los anticuerpos presentes en IVIG podían neutralizar la unión (Figura 1).

Se asociaron significativamente ambas aPC-BSA y aPC-KLH en pacientes SLE con una historia de CVD con la unión de Anexina V a EC ($r=0.45$; $p=0.02$, y $=0.03$ respectivamente). Se evaluaron niveles de aPC-BSA y aPC-KLH utilizando técnicas estándar, por ejemplo utilizando los siguientes reactivos. Se adquirieron inmuno-placas de microtitulación F96 Polysorb de Nunc (Roskilde Denmark), PC-BSA (Fosforilcolina-Albúmina Suero Bovino) fue adquirida de Biosearch Technologies, INC (USA). La albúmina de suero bovino (BSA), IgG anti-humana fosfatasa alcalina conjugada de cabra (r-cadena específica), sustrato fosfatasa alcalina, fue obtenida de Sigma (St. Louis, MO. USA). Por ejemplo, anticuerpos IgG y IgM a PC-BSA fueron determinados por ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA). El suero colectivo de 17 pacientes con síndrome antifosfolípido fue usado como un test estándar interno y ensayado en cada placa. La meseta de unión de anticuerpo fue investigada con la concentración de antígeno de 10 μ g/ml. La placa F96 microlitro polisorp fue por lo tanto recubierta con PC-BSA (10 μ g/ml) 50 μ l/pocillo en PBS. Las placas recubiertas fueron incubadas durante la noche a 4°C. Después de cinco lavados con PBS, las placas fueron bloqueadas con 2% BSA-PBS durante 2h a temperatura ambiente y lavadas como se describe arriba. Las muestras de suero fueron diluidas (1:30) en 0.2% BSA-PBS y añadidas a 50 μ l/pocillo.

La preincubación con vacuna neumocócica (Statens Serum Institute, Denmark), PAF, fosfatidilserina o lisofosfatidilcolina de suero con alta capacidad para inducir una disminución de unión tuvo el efecto de provocar la disminución de unión de suero al antígeno; y también restauró la unión de Anexina V (figuras 2, 3, 5). Como contraste, PC no tuvo un efecto significativo. Esto sugiere que la unión de anticuerpos a la vacuna neumocócica, PAF, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina podría estar involucrada en reducir la unión de Anexina V a las células endoteliales.

En conclusión, la Anexina V está presente en las lesiones ateroscleróticas en muchos sitios, especialmente aquellos que son propensos a la ruptura de la placa. Cuando la unión de Anexina V no es óptima sino disminuida como una consecuencia de anticuerpos que interfieren con la unión Anexina-

placa, el riesgo de aterotrombosis y ruptura de placa es fuertemente elevado. La restauración de la unión de Anexina V es por lo tanto una posible terapia nueva para aterotrombosis y especialmente para rotura de placa, la principal causa de enfermedad cardiovascular. Dos métodos son dados en esta invención. Uno está basado en el uso de una dosis óptima de Anexina V o una sal de la proteína, la cual debería ser preferentemente administrada por inyecciones intravenosas, la otra está basada en el uso de inmunoglobulinas disponibles directamente, o una subfracción de las inmunoglobulinas purificada por afinidad, que puede también ser administrada por inyecciones.

La cantidad efectiva de Anexina V (o inmunoglobulinas) en la dosis puede determinarse mediante un análisis de estado diagnóstico en la unión real Anexina V-placa. La unión fue determinada mediante el método de análisis antes descrito. El tratamiento utilizando una composición farmacéutica que contiene el componente activo es preferiblemente administrado a sujetos con riesgo. Un sujeto de riesgo es un paciente con SLE con aterotrombosis repetitiva frecuente. Otro sujeto de riesgo es un paciente quien tiene, ha tenido o, es propenso a una infección neumocócica.

REFERENCIAS

- 15 1. Ross R. Atherosclerosis- an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-26.
2. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Gytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis.* 1999;145:33-43.
- 20 3. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, Kuller LH. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42:51-60.
4. Petri M, Roubenoff R, Dallal GE, Nadeau MR, Selhub J, Rosenberg IH. Plasma homocysteine as a risk factor for atherothrombotic events in systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 1996;348:1120-4.
5. Svenungsson E, Jensen-Urstad K, Heimbürger M, Silveira A, Hamsten A, de Faire U, Witztum JL, Frostegard J. Risk factors for cardiovascular disease in systemic lupus erythematosus. *Circulation.* 2001;104:1887-93.
- 25 6. Svenungsson E, Fei GZ, Jensen-Urstad K, de Faire U, Hamsten A, Frostegard J. TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus.* 2003;12:454-61.
7. Svenungsson E GI, Fei G, Lundberg IE, Klareskog L, Frostegard J. Blood lipids and TNF-a are closely related markers of Disease Activity and Disease Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis&Rheumatism* in press. 2003.
- 30 8. Hughes G. Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus antikoagulant. *British Medical Journal.* 1983; 287:1088-1089.
9. Asherson RA, Khamashta MA, Ordi-Ros J, Derksen RH, Machin SJ, Barquinero J, Outt HH, Harris EN, Vilardell-Torres M, Hughes GR. The "primary" antiphospholipid syndrome: major clinical and serological features. *Medicine (Baltimore).* 1989;68:366-74.
- 35 10. Wu R, Lemne C, De Faire U, Frostegard J. Antibodies to platelet-activating factor are associated with borderline hypertension, early atherosclerosis and the metabolic syndrome. *J Intern Med.* 1999;246:389-97.
- 40 11. Vaarala O, Mänttari M, Manninen V, Tenkanen L, Puurunen M, Aho K, T P. Anti-Cardiolipin Antibodies and Risk of Myocardial Infarction in a Prospective Cohort of Middle-Aged Men. *Circulation.* 1995;91:23-27.
12. Rand JH, Wu XX, Quinn AS, Chen PP, McCrae KR, Bovill EG, Taatjes DJ. Human monoclonal antiphospholipid antibodies disrupt the Annexin A5 anticoagulant crystal shield on phospholipid bilayers: evidence from atomic force microscopy and functional assay. *Am J Pathol.* 2003;163:1193-200.
- 45 13. Rand JH, Wu XX, Guller S, Scher J, Andree HA, Lockwood CJ. Antiphospholipid immunoglobulin G antibodies reduce Annexin-V levels on syncytiotrophoblast apical membranes and in culture media of placental villi. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:918-23.
14. Rand JH. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the Annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun.* 2000;15:107-11.
- 50 15. Stratton et al., *Circulation* 92: 3113-3121 (1995); Thiagarajan and Benedict, *Circulation* 96: 23392347 (1997)

16. Reno and Kasina, International Patent Application PCT/US95/07599 (WO 95/34315).

17. Romisch et al., Thrombosis Res. 61: 93-104 (1991).

18. Blankenberg FG, Narula J, Strauss HW, Ghazarossian V. US Patent Application US 2003/152513 A1.

5 19. Mari C, Blankenberg F, Narula Z, Narula J, Ghazarossian V, Tait J, Strauss HW. Annexin V, a New Therapeutic

Tool in Atherosclerosis. Proceedings of the SNM 49th Annual Meeting. 2002;43:7P.

20. Thiagarajan P, Benedict CR. Inhibition of Arterial Thrombosis by Recombinant Annexin V in a Rabbit Carotid Artery Injury Model. Circulation. 1997;96:2339-2347.

REINVIDICACIONES

1. Uso de proteína Anexina V, opcionalmente en forma de una sal, en la fabricación de una composición farmacéutica para evitar la ruptura de placa en humanos.
- 5 2. Una composición farmacéutica que contiene la proteína Anexina V, opcionalmente en forma de una sal, para uso en la prevención de ruptura de placa en humanos.
3. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 o la composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 2, donde la composición farmacéutica contiene una cantidad eficaz de la proteína Anexina V, opcionalmente en combinación con un portador y aditivos.
- 10 4. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 o reivindicación 3 o la composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 2 o reivindicación 3, donde la cantidad eficaz de la Anexina V en la composición farmacéutica es determinada de un análisis de estado diagnóstico de la unión Anexina V-endotelio.
- 15 5. Un uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4 o la composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 para evitar la ruptura de placas en un paciente con lupus eritematoso sistémico (SLE).
6. Uso de una preparación de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) en la fabricación de un medicamento para evitar la ruptura de placa en un paciente humano SLE.
7. Una preparación de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) para uso en la prevención de rotura de placa en un paciente humano SLE.
- 20 8. Uso de una subfracción purificada de una preparación de inmunoglobulina colectiva con la capacidad de disminuir el efecto inhibitor de plasma de un paciente con lupus eritematoso sistemático (SLE) en la unión de Anexina V a células endoteliales, en la fabricación de un medicamento para prevenir la ruptura de placa en un paciente humano SLE, donde la subfracción purificada es:
 - 25 a) Una subfracción purificada anticuerpo anti Ig que contiene anticuerpos anti-aPAF, y/o
 - b) Una subfracción purificada anticuerpo anti Ig que contiene anticuerpos anti-IgG.
- 30 9. Una subfracción purificada de una preparación de inmunoglobulina colectiva con la capacidad de disminuir el efecto inhibitor de plasma del paciente con lupus eritematoso sistemático (SLE) en la unión de Anexina V a células endoteliales, para uso en la prevención de ruptura de placa en un paciente humano SLE, donde la subfracción purificada es:
 - c) Una subfracción purificada anticuerpo anti Ig conteniendo anticuerpos anti-aPAF, y/o
 - d) Una subfracción purificada anticuerpo anti Ig conteniendo anticuerpos anti-IgG.
- 35 10. Un uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 6, u 8, la composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, la preparación IVIG de acuerdo con la reivindicación 7 o la subfracción purificada de una preparación de inmunoglobulina colectiva de acuerdo a la reivindicación 9 para prevenir la ruptura de placas en un paciente con placas vulnerables.

FIGURA 1

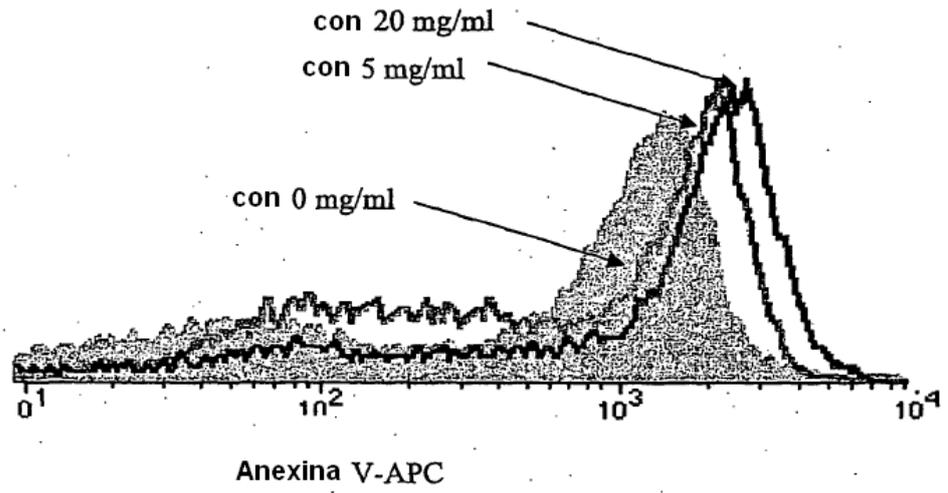
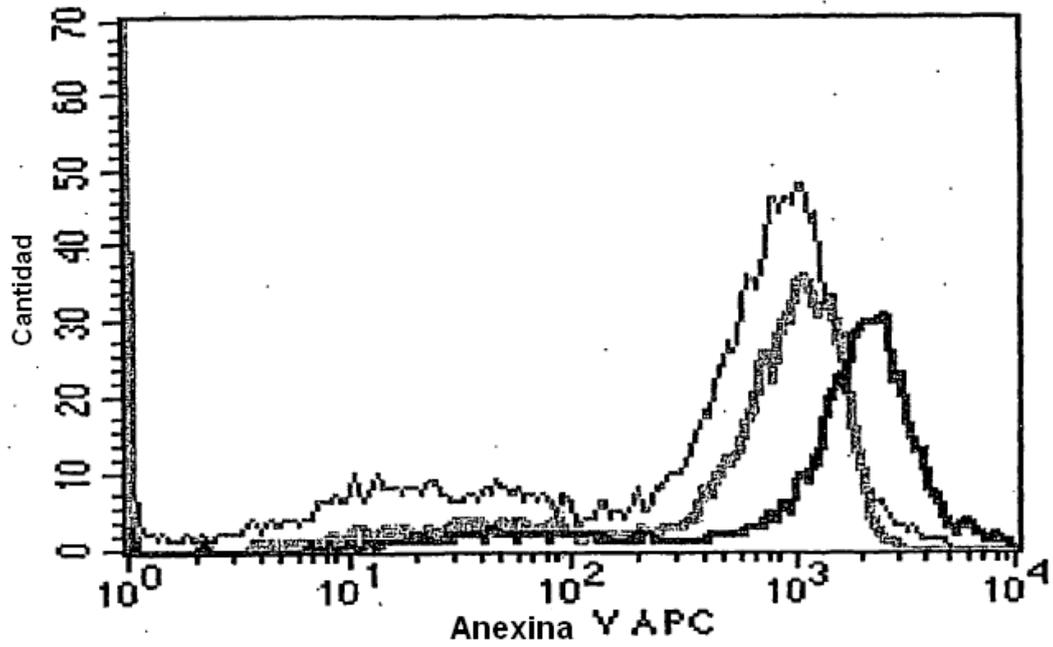
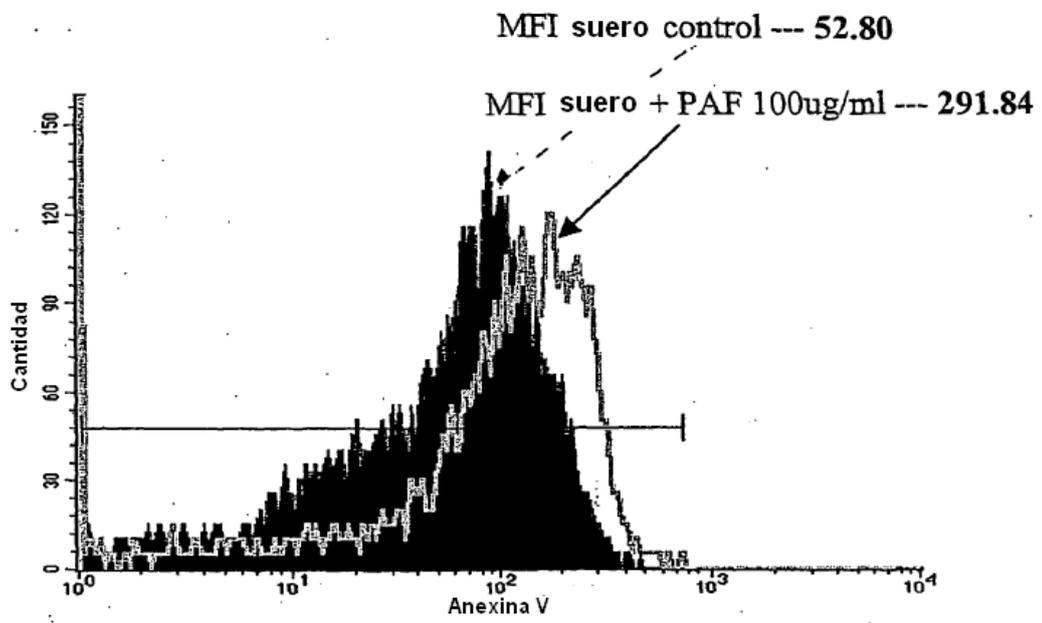


FIGURA 2



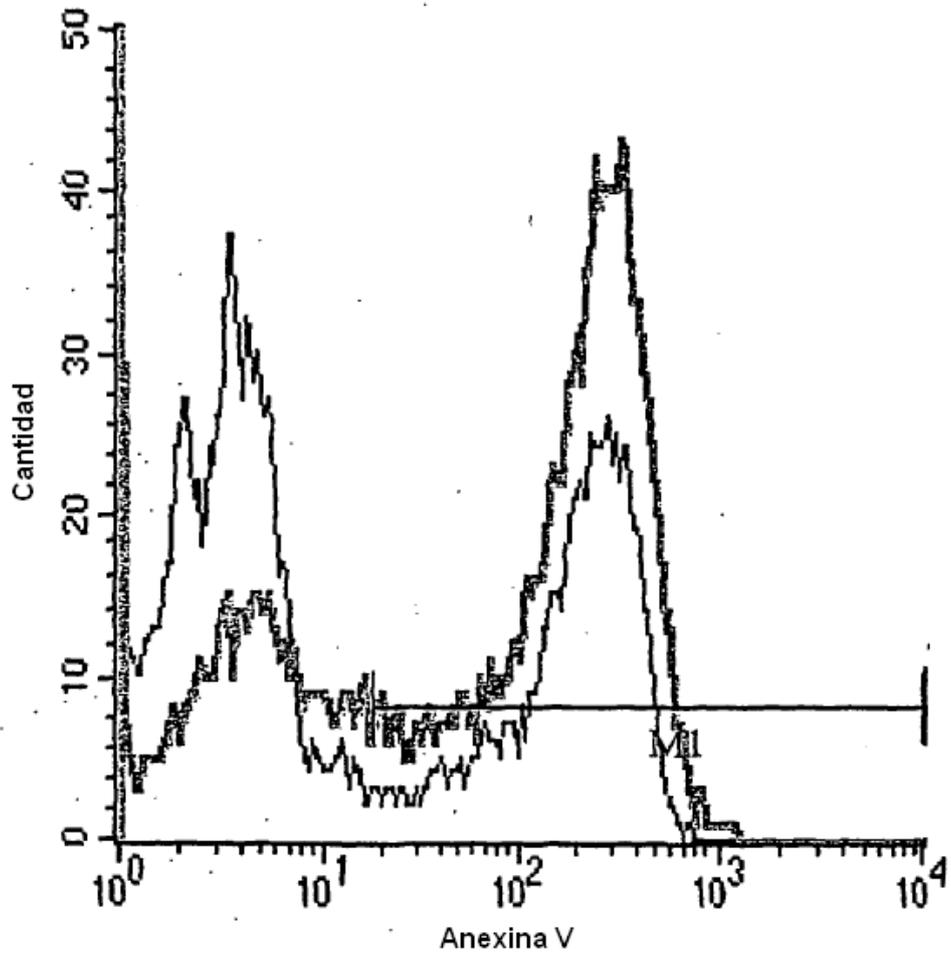
Leyenda	Nombre	Parámetro	Control
—	040605 APS1.007	FL4-H	No control
- - -	040605 PC 10ug/ml.015	FL4-H	No control
· · ·	040605 PC 10ug/ml.016	FL4-H	No control

FIGURA 3



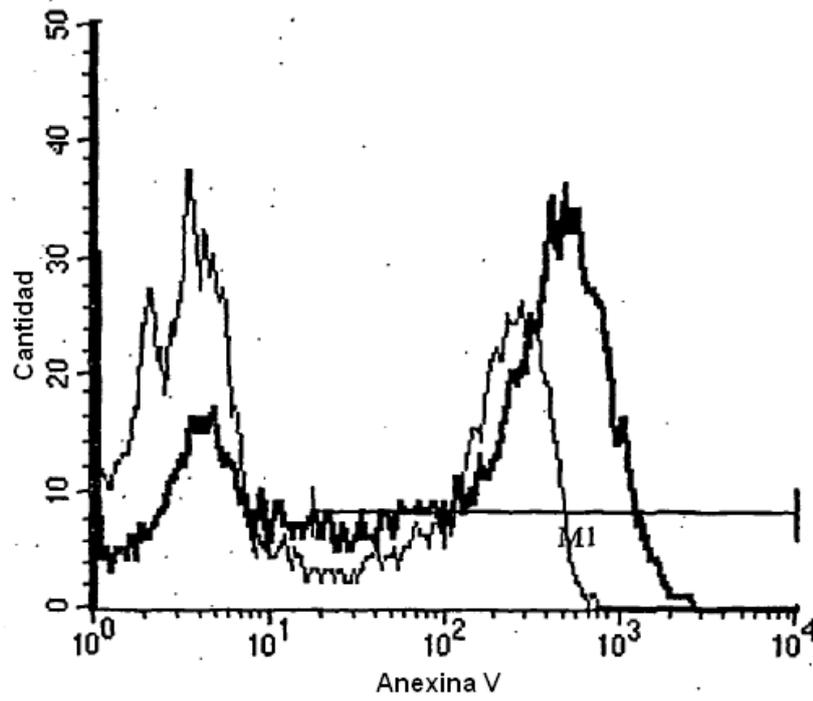
Leyenda	Nombre	Parámetro	Control
	APS pool no p 24 hrs 060303.003	PL1-H	G4
	PAF 100 24 hrs 060303.002	PL1-H	O4

FIGURA 4



Leyenda	Nombre	Parámetro	Control
	APS 24 hrs on HUVEC.001	FL1-H	G1
	TT100 24 hrs on HUVEC.001	FL1-H	G1

FIGURA 5



Leyenda	Nombre	Parámetro	Control
	APS 24 hrs on HUVEC.001	FL1-H	G1
—	LPC100 24 hrs on HUVEC.014	FL1-H	G1