

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 280**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2005 E 05804396 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1802342**

54 Título: **Adsorbente inmunológico para el tratamiento de inflamaciones**

30 Prioridad:

20.10.2004 DE 102004051216

20.01.2005 DE 102005003190

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.12.2013

73 Titular/es:

**HEINRICH, HANS-WERNER, PROF. DR. (100.0%)
WIESENSTRASSE 40
17489 GREIFSWALD, DE**

72 Inventor/es:

HEINRICH, HANS-WERNER, PROF. DR.

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 433 280 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

Adsorbente inmunológico para el tratamiento de inflamaciones

- 5 [0001] La invención se refiere a adsorbentes inmunológicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente para la eliminación de factores del complemento y eventualmente de interleucinas y TNF de fluidos corporales, procedimiento para su preparación y su uso.
- 10 [0002] Ya se conoce un inmunoadsorbente para el tratamiento de la sepsis a partir del documento WO 00/58005. Este se caracteriza por los materiales portadores a partir de polímeros orgánicos o sintéticos, a los que se unen tanto anticuerpos monoclonales o policlonales, que están dirigidos contra los factores del complemento C3a y/o C5a, como también anticuerpos dirigidos contra lipopolisacáridos (LPS). En una realización preferida, los anticuerpos dirigidos contra otros mediadores de sepsis también están unidos a los portadores.
- 15 Este sirve para eliminar los factores del complemento y lipopolisacáridos (LPS) así como eventualmente eliminar otros mediadores de sepsis, como TNF e interleucinas de fluidos corporales. De modo que se puede utilizar, por ejemplo, en la plasmaféresis de pacientes con sepsis.
- [0003] El inconveniente de este sistema de adsorción consiste en que su aplicación está limitada a la "sepsis", inflamación en todo el cuerpo producida por bacterias gramnegativas. La preparación de anticuerpos poliespecíficos contra los diferentes lipopolisacáridos (LPS) es, además, cara y costosa. El tratamiento con este adsorbente en pacientes que padecen sepsis provocada por bacterias gramnegativas (p. ej., Escherichia coli) da buenos resultados. Para el tratamiento de la sepsis provocada por otras causas, al menos este adsorbente de LPS no es necesario, pero es caro de todos modos. El campo de aplicación del adsorbente mencionado anteriormente, conforme a su naturaleza, es el tratamiento de la sepsis. No es adecuado para otras enfermedades que van acompañadas de inflamaciones.
- 20 [0004] La invención tiene el objetivo de desarrollar un sistema de inmunoadsorción de estructura modular, particularmente para la desintoxicación extracorporeal que permita reducir los niveles de plasma y tejido específico de cada paciente, que no presente las carencias citadas arriba.
- 25 [0005] Esta tarea se soluciona según la reivindicación principal; las reivindicaciones secundarias son variantes preferenciales.
- [0006] Una forma de realización especialmente ventajosa de la invención representa un inmunoadsorbente con anticuerpos contra C5a e IL6. La eliminación de C5a es importante, ya que se trata del factor de inflamación más eficaz de la cascada del complemento e IL6, porque esta interleucina posee una función principal en la pro-regulación de la inflamación.
- 30 [0007] Los anticuerpos empleados son preferentemente anticuerpos policlonales, especialmente anticuerpos aviares del tipo IgY. Los anticuerpos contra mediadores de sepsis están contenidos según el estado de la desregulación.
- 35 [0008] Según la invención, en este caso se trata de anticuerpos dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10.
- [0009] Los anticuerpos preferidos contra el factor del complemento C3a presentan una actividad específica contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas:
- 40
- 45 NH₂-KCCEDGMRQNPMR-COOH
- NH₂-RFSCQRRTRFISL-COOH
- 50 NH₂-ITELRRQHARAS-COOH
- [0010] Según la reivindicación 1, el adsorbente inmunológico consta de materiales portadores poliméricos orgánicos y/o sintéticos, que están ligados a anticuerpos monoclonales y/o policlonales, dirigidos contra los factores del complemento
- 55 - C3a y C5a, así como en su caso con anticuerpos, dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10, o
- C3a así como en su caso con anticuerpos, dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10, o
- C5a así como con anticuerpos, dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10.
- [0011] Los anticuerpos preferidos contra el factor del complemento C5a poseen una actividad específica contra al menos una de las secuencias peptídicas siguientes:
- 60
- NH₂-QADYKDDDDKLPAAE-COOH
- NH₂-DDKLPAAEGLDIENS-COOH
- 65 [0012] Los anticuerpos preferidos contra IL1 α / β poseen una actividad específica contra al menos una de las siguientes

secuencias peptídicas

NH₂-NCYSENEEDSSSID-COOH

5 NH₂-GAYKSSKDDAKIT-COOH

NH₂-WETHGTKNYFTS-COOH

10 NH₂-RISDHHYSKGFRQA-COOH

NH₂-VQGEESNDKIPVA-COOH

NH₂-ESVDPKNYPKKKMEKRF-COOH

15 [0013] Los anticuerpos preferidos contra IL6 poseen una actividad específica contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas

NH₂-APHRQPLTSSERIDKQI-COOH

20 NH₂-QNRFESSEEQARA-COOH

NH₂-AITTPDPTTNAS-COOH

25 [0014] Los anticuerpos preferidos contra IL10 poseen una actividad específica contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas

NH₂-SPGQGTQSENSCT-COOH

30 NH₂-QMKDQLDNLLLKES-COOH

NH₂-MPQAENQDPDIKA-COOH

NH₂-LPCENKSKAVEQ-COOH

35 [0015] Los anticuerpos preferidos contra TNF α poseen una actividad específica contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas

NH₂-VRSSSRTPSDKPVA-COOH

40 NH₂-KSPCQRETPEGAEAKPW-COOH

45 [0016] El inmuoadsorbente según la invención presenta como materiales portadores unas membranas o partículas usuales de polímeros orgánicos o sintéticos, así p. ej., de poliestirenos, carbohidratos, como p. ej., derivados de celulosa o de agarosa, o de acrilatos, donde los anticuerpos específicos están ligados a estas de forma covalente o se fijan a las mismas mediante espaciadores o conectores.

[0017] La preparación de los inmuoadsorbentes según la invención se realiza a través de métodos conocidos, de modo que los anticuerpos dirigidos contra

50 - C3a y C5a, así como en su caso contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10, o

- C3a, así como en su caso contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10, o

- C5a, así como contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10

se acoplan de forma covalente o adsorbente a los materiales portadores de polímeros orgánicos o sintéticos.

55 [0018] Los anticuerpos específicos se preparan mediante la inmunización conocida de por sí preferiblemente de pequeños mamíferos, como ratones, ratas o conejos o aves, como p. ej. gallinas, con los antígenos correspondientes.

60 [0019] También es objeto de la invención el uso de los inmuoadsorbentes en dispositivos para eliminar factores del complemento y, en su caso, otros mediadores de fluidos corporales, como plasma sanguíneo, en función de la situación específica del paciente.

[0020] Preferentemente, los inmuoadsorbentes se emplean en el tratamiento de la sepsis para la plasmaféresis en pacientes con sepsis o shock séptico.

65 [0021] Aunque para la mayoría de las sustancias están disponibles anticuerpos que se pueden acoplar a los distintos

portadores según los procedimientos conocidos, se usan preferentemente anticuerpos aviares, porque estos, al contrario de los anticuerpos de mamíferos, no activan el sistema de complemento. Puesto que las propiedades están vinculadas con la parte F_c de los anticuerpos de mamíferos, en principio se puede usar también el fragmento F_{ab} disociado con papaína.

[0022] Según el nivel de conocimientos actual, los anticuerpos aviares inmovilizados no tienen efectos específicos en el sistema de defensa de las personas. Las aves, preferentemente gallinas, se inmunizan con los procedimientos habituales con o sin el uso de coadyuvantes. Las inmunoglobulinas específicas se precipitan en la yema del huevo y se pueden aislar del mismo con los métodos habituales. Con los procedimientos conocidos, se ligan de forma covalente a membranas o micropartículas, a través de la parte F_c.

[0023] Con el sistema de inmunoadsorción según la invención para la desintoxicación extracorporea se dispone por primera vez de un sistema selectivo que se puede emplear de forma específica para cada paciente y que permite eliminar las regulaciones incorrectas del sistema inmunitario.

[0024] La invención se describirá detalladamente con la ayuda de los siguientes ejemplos.

Ejemplos de realización:

Ejemplo 1:

a) Activación de un portador:

[0025] Los IgY purificados según el ejemplo 3 se ligan de forma covalente a un portador adecuado. Para ello, se puede activar, p. ej., safarosa tal como se describe a continuación (H.-F.Boeden, W.Büttner, C.Rupprich, D.Büttner, S.Heinrich, M.Becker, M.Holtzauer (1992) Macromol. Chem. 193,865-887):

[0026] El portador de agarosa se convierte gradualmente, es decir, mediante una cantidad de acetona que se incrementa paso a paso en 20%. Al final, el portador se deja reposar durante la noche en un volumen de lecho cinco veces mayor con acetona anhidra en un recipiente cerrado y se vuelve a lavar con 5 a 10 vol. de acetona anhidra y se separa por succión brevemente en una frita G2. A 10 ml de portador sedimentado se añaden 400 mg N-(clorocarboniloxi)-5-norborneno-2,3-dicarboximida (Cl-COONB) en 10 ml de acetona anhidro p.a. Bajo agitación, en un plazo de 15 minutos se añade gota a gota una solución de 280 µl de trietilamina y 20 mg de 4-dimetilamino-piridina (DMAP) en 5 ml de acetona seca (proporción molar ClCOONB: trietilamina: DMAP 1:1,2:0,1). A continuación, se agita durante otros 15 minutos y el portador se lava con aprox. 200 ml de acetona anhidro.

b) Acoplamiento de las inmunoglobulinas a un portador fijo

[0027] La matriz de polisacárido (gel) activada según el ejemplo 1a) se traslada de forma gradual a un medio acuoso y, a continuación, se añade agitando inmediatamente a la solución de acoplamiento que contiene los ligandos. Como tampón de acoplamiento se usa tampón de citrato con un pH de 4,2. El acoplamiento se realiza agitando ligeramente durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, los enlaces libres se bloquean mediante la adición de etanolamina. En la tabla 1, están representadas las condiciones concretas para los distintos anticuerpos.

Tabla 1

Gel n.º	Ak de gallina (IgY)	mg	mg/ml	Solución Ak (ml)	ml tampón de acoplamiento (citrato, 0,1 M, pH 4,2)	Etanolamina 1 M (ml)	Gel húmedo (g)
1	Cha. C3a	8,3	9,6,7	0,6	4,4	0,5	5,77
2	Cha. C5a	10,3	10,2	1	4	0,5	5,63
3	Cha. IL6	9,5	9,8	1	4	0,5	5,52
8	Control	0	0	0	5	0,5	5,60

Ejemplo 2

[0028] Los anticuerpos inmovilizados según el ejemplo 1 se usan para eliminar interleucina 6 o factores del complemento de los medios líquidos como soluciones reguladoras, suero o plasma sanguíneo.

Para ello, los portadores se lavan, se trasladan a un tampón fisiológico (PBS) y se introducen sin burbujas de aire en columnas de vidrio o de plástico. La disposición se completa mediante la conexión a un dispositivo de cromatografía. El material de muestras adsorbentes (tampones dotados con los antígenos, muestras de suero o plasma sanguíneo dotadas de antígenos o con un contenido natural de antígenos) se puede hacer pasar ahora por la fuerza de gravedad o con una bomba adecuada por los anticuerpos inmovilizados, específicos para los antígenos mencionados. Los antígenos existentes son reconocidos por las IgY, se ligan firmemente y, por lo tanto, se eliminan del medio que circula por la columna. La prueba de eficacia se realiza mediante el análisis (ELISA) del material del ciclo de columnas, cuyo

contenido en antígenos está reducido. Después de lavar la columna con un tampón fisiológico, se realiza la desorción del antígeno ligado con eluyentes adecuados (0,1 m tampón de citrato pH 3), el fraccionamiento y el análisis del eluato. La prueba cuantitativa de los antígenos se aprovecha para determinar la capacidad del inmuoadsorbente.

Antígeno	Experimento	Densidad de acoplamiento [mg/ml gel]	Volumen de gel [ml]	Volumen / medio [ml]	Cantidad adsorbida
C3a	lote	10	0,5	2 / plasma	12 µg
	cíclico	10	0,1	5 / plasma	2,6 µg tras 3 ciclos
C5a	lote	10	0,5	2 / plasma	4 µg
	cíclico	10	0,5	25 / plasma	2 µg tras 10 ciclos
					1,7 µg tras 3 ciclos
IL6	lote	5	0,1	1/ plasma	133 ng
	Cromatografía de afinidad (1 Ciclo)	2	0,1	1/ PBS+1% BSA	330 ng
	cíclico	10	1	50/ PBS+1% BSA	100 ng
					94 ng tras 3 ciclos
		5	1	50/ PBS+1% BSA	93 ng
					74 ng tras 3 ciclos

5

Ejemplo 3

[0029] Los anticuerpos inmovilizados según el ejemplo 1 se usan para eliminar interleucina 6 y un complemento activado 5 del plasma sanguíneo del paciente.

10 Para ello, los portadores se lavan, se trasladan a un tampón fisiológico (PBS) y se introducen sin burbujas de aire en una carcasa de plástico. Los módulos adsorbentes contienen 60 ml de gel. Dos adsorbentes diferentes contienen anticuerpos, que se dirigen respectivamente contra C5a (10 mg IgY/ml gel de sefarosa (corresponde a una capacidad de absorción de 400 µg/columna) o IL6 (5 mg IgY/ml de gel de sefarosa (corresponde a una capacidad de absorción de 240 µg/columna)). Los módulos se conectan en línea.

15

[0030] Las siguientes cinéticas de degradación podrían emitirse en los 5 días consecutivos (5 litros de tratamiento de plasma por día) (figuras 1 y 2):

REIVINDICACIONES

- 5 1. Adsorbente inmunológico para la aplicación en un procedimiento para el tratamiento de inflamaciones que consiste en
Materiales portadores de polímeros orgánicos o sintéticos con anticuerpos policlonales o monoclonales ligados, dirigidos
contra los
factores del complemento
- 10 - C3a y C5a, así como en su caso con anticuerpos, dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10, o
- C3a, así como en su caso con anticuerpos, dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10, o
- C5a, así como con anticuerpos, dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10.
- 15 2. Adsorbente inmunológico según la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho
de que** los anticuerpos son anticuerpos policlonales.
3. Adsorbente inmunológico según la reivindicación 2 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho
de que** los anticuerpos son anticuerpos aviares del tipo IgY.
- 20 4. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 3 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el
hecho de que** se contienen otros anticuerpos contra mediadores inflamatorios correspondientemente al estado de
regulación de la reacción de inflamación, donde estos anticuerpos están dirigidos contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10.
5. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 y 4 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el
hecho de que** se contienen anticuerpos específicos C3a y anticuerpos específicos C5a.
- 25 6. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 y 4 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el
hecho de que** se contienen anticuerpos dirigidos contra C3a y/o C5a, y anticuerpos específicos TNF.
7. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 y 4 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el
hecho de que** se contienen anticuerpos dirigidos contra C3a y/o C5a y anticuerpos específicos IL1.
- 30 8. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 y 4 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el
hecho de que** se contienen anticuerpos dirigidos contra C3a y/o C5a, y anticuerpos específicos IL6.
9. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 y 4 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el
hecho de que** se contienen anticuerpos dirigidos contra C3a y/o C5a, y anticuerpos específicos IL8.
- 35 10. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 y 4 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por
el hecho de que** se contienen anticuerpos dirigidos contra C3a y/o C5a, y anticuerpos específicos IL10.
- 40 11. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 10 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por
el hecho de que** los anticuerpos ligados están dirigidos contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas de
los factores del complemento C3a y C5a
- C3a:
- 45 NH₂-KCCEDGMRQNPMR-COOH
- NH₂-RFSCQRRTRFISL-COOH
- 50 NH₂-ITELRRQHARAS-COOH
- C5a:
- 55 NH₂-QADYKDDDDKLPAAE-COOH
- NH₂-DDKLPAAEGLDIENS-COOH
- 60 12. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 4 y 7 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado
por el hecho de que** los anticuerpos ligados están dirigidos contra al menos una de las siguientes secuencias
peptídicas de la interleucina 1 α y 1 β
- IL1 α :
- 65 NH₂-NCYSENEEDSSSID-COOH
- NH₂-GAYKSSKDDAKIT-COOH
- NH₂-WETHGTKNYFTS-COOH

IL1 β :

NH₂-RISDHHYSKGFRQA-COOH

NH₂-VQGEESNDKIPVA-COOH

NH₂-ESVDPKNYPKKKMEKRF-COOH

13. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 4 y 8 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** los anticuerpos ligados están dirigidos contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas de la interleucina 6

IL6:

NH₂-APHRQPLTSSERIDKQI-COOH

NH₂-QNRFESSEEQARA-COOH

NH₂-AITTPDPTTNAS-COOH

14. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 4 y 10 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** los anticuerpos ligados están dirigidos contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas de la interleucina 10

IL10:

NH₂-SPGQGTQSENSCT-COOH

NH₂-QMKDQLDNLLLKES-CCOH

NH₂-MPQAENQDPDIKA-COOH

NH₂-LPCENKSKAVEQ-COOH

15. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 4 y 6 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** los anticuerpos ligados están dirigidos contra al menos una de las siguientes secuencias peptídicas

TNF α :

NH₂-VRSSSRTPSDKPVA-COOH

NH₂-KSPCQRETPEGAEAKPW-COOH

16. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 15 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** este material portador orgánico o sintético consta de membranas o partículas de poliestirenos, carbohidratos, como derivados de agarosa o de celulosa, o acrilatos.

17. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 16 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** los anticuerpos específicos están ligados de forma covalente a membranas o partículas.

18. Adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 16 para el uso según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** los anticuerpos están fijados mediante espaciadores o conectores a los materiales portadores.

19. Procedimiento para la preparación de inmunoadsorbentes según las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado por el hecho de que** se acoplan de forma covalente o adsorbente anticuerpos dirigidos contra

- C3a y C5a, así como en su caso contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10, o
- C5a, así como contra TNF, IL1, IL6, IL8 y/o IL10

a materiales portadores de polímeros orgánicos o sintéticos.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado por el hecho de que** los anticuerpos se obtienen mediante la inmunización, preferiblemente de pequeños mamíferos, como ratones, ratas o conejos, o aves, como gallinas, con los antígenos correspondientes.

21. Uso de adsorbente inmunológico según las reivindicaciones 1 a 18 como componente eficaz de un dispositivo para eliminar factores del complemento y, en su caso, otros mediadores en combinaciones de fluidos corporales específicas del paciente.

22. Uso según la reivindicación 21, **caracterizado por el hecho de que** los adsorbentes inmunológicos como componente de un dispositivo para el tratamiento de pacientes con sepsis o shock séptico y otras enfermedades que vayan acompañadas de inflamaciones.

5

Figura 1

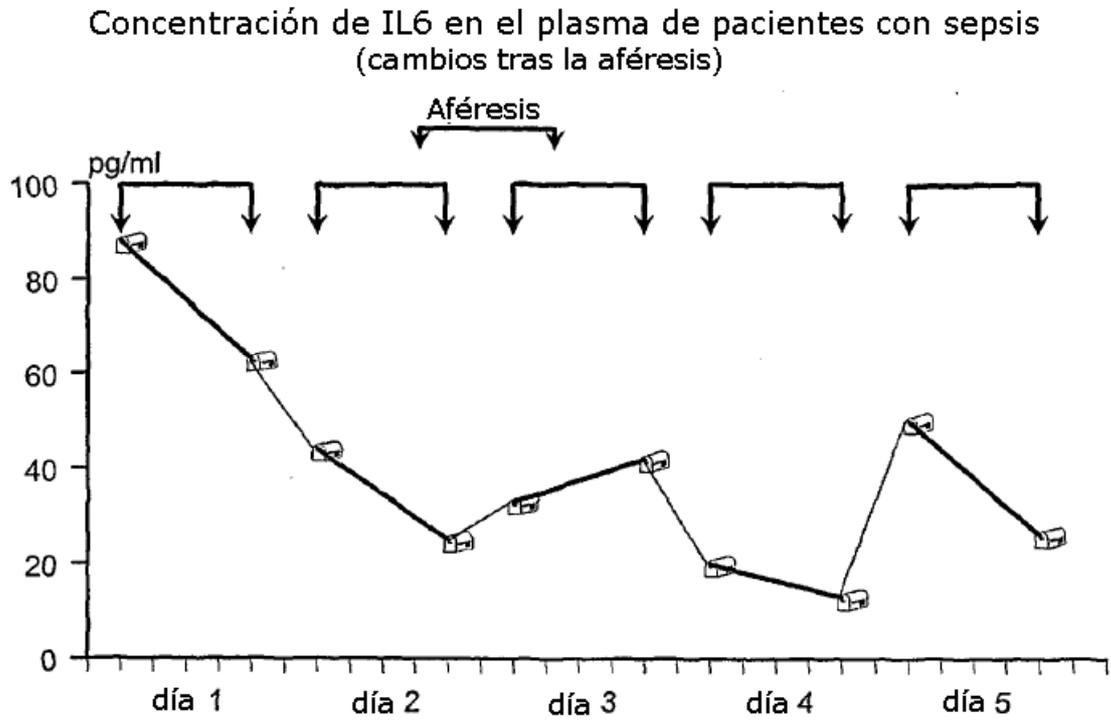


Figura 2

Concentración de C5a en el plasma de pacientes con sepsis
(Cambios tras la aféresis)

