

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 395**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/06** (2006.01)

**A61N 7/00** (2006.01)

**A61N 7/02** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2009 E 09751639 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2294178**

54 Título: **Procedimientos para facilitar la regeneración**

30 Prioridad:

**23.05.2008 US 55846 P**

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

**29.09.2014**

73 Titular/es:

**SIWA CORPORATION (100.0%)  
400 East Randolph 3913  
Chicago, Illinois 60601, US**

72 Inventor/es:

**GRUBER, LEWIS S.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 499 395 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

Procedimientos para facilitar la regeneración

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

**[0001]** La presente invención se refiere en general a procedimientos para fomentar la regeneración de tejidos y órganos, y en particular para impedir que las células inhiban los procesos regenerativos para obtener los beneficios reconocidos en la salud y la función asociada con los resultados de la regeneración.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

**[0002]** La investigación de la regeneración de tejidos y órganos se ha centrado en la necesidad de estimular la regeneración activando las células madre por factores solubles o tratar células parcialmente o no funcionales para mejorar su función, por ejemplo rompiendo entrecruzamientos relacionados con daños. Tal investigación ha pasado por alto la necesidad de eliminar los efectos inhibitorios.

15

**[0003]** El envejecimiento resulta de una combinación de factores, pero la regeneración puede superar los efectos del envejecimiento, si y en la medida en que las células madre regenerativas sean funcionales. Las células madre, que reemplazan a las células, vuelven a desarrollar las estructuras y renuevan los tejidos del cuerpo tras el desgaste normal, dan lugar a células de reemplazo, e incluso estructuras, como folículos pilosos. De hecho, si se destruyesen todas las células madre del cuerpo, la muerte vendría a continuación en cuestión de días.

20

**[0004]** Sin embargo, en una variedad de enfermedades, disfunciones (como la calvicie de patrón masculino) y lesiones tisulares, no se observa que los tipos de células sean reemplazados cuando están dañados o no son funcionales. La terapia de trasplante de células madre se propone para tales dolencias, aunque no siempre es exitosa.

25

**[0005]** Se ha dejado a la técnica con la pregunta de por qué, entonces, el cuerpo sucumbe a las lesiones y el envejecimiento cuando tiene un mecanismo para la regeneración.

30

## RESUMEN DE LA INVENCION

**[0006]** La presente invención proporciona procedimientos para eliminar las células que interfieren con los procesos regenerativos bloqueando ubicaciones en un tejido donde la progenie de las células madre puede mejorar la función. La presente invención también reduce la proporción de células parcialmente o no funcionales con independencia de la ubicación en un tejido.

35

**[0007]** La funcionalidad de acuerdo con la presente invención se define como el estado del funcionamiento de una célula del mismo tipo en un individuo sano seleccionado.

40

**[0008]** En un aspecto, la invención está relacionada con un procedimiento in vitro para fomentar los procesos regenerativos en un cultivo de tejidos o cultivo de células, que comprende la administración al cultivo de tejidos o cultivo de células de un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana en dicho cultivo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal humanizado, o en el que el anticuerpo se conjuga a una toxina.

45

**[0009]** En otro aspecto la invención está relacionada con el uso de un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana, para la fabricación de un medicamento para fomentar la regeneración de un tejido o un órgano en un sujeto destruyendo células diana parcialmente funcionales o no funcionales que tengan dicho producto final de glicación.

50

**[0010]** En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana, para el uso en el fomento terapéutico de procesos regenerativos o para el uso en la superación terapéutica de los efectos del envejecimiento, en el que el anticuerpo o composición destruye selectivamente células senescentes.

55

**[0011]** Los aparatos, composiciones y procedimientos descritos en esta solicitud fomentan los procesos regenerativos destruyendo de manera diferente células basándose inversamente en el grado de funcionalidad de las

células (es decir, cuanto menos funcionalidad es más probable que se destruyan), y aplicando entonces esa técnica. Esta técnica para destruir células preserva preferentemente las células proliferativas. Por ejemplo, cualquiera de la lipofuscina, los productos finales de glicación o la rigidez celular se puede seleccionar como un marcador de preservación de proliferación de funcionalidad parcial o nula. Las tecnologías para destruir células dirigidas contra tales marcadores pueden incluir, respectivamente, láseres/luz intensa, anticuerpos, y ultrasonido. Las células se pueden destruir mediante técnicas físicas, electromagnéticas, químicas o biológicas, por ejemplo. Las técnicas físicas incluyen sin limitación procedimientos de ultrasonido y otros oscilatorios para alterar membranas celulares o estructuras que lleven a la muerte de las células. Las técnicas electromagnéticas incluyen sin limitación y como se dirijan a ellas los sensibilizadores (como nanopartículas absorbentes, por ejemplo) FEM (véase, por ejemplo, Litovitz, Patente estadounidense núm. 7.367.988 para procedimientos de FEM), luz de alta intensidad, microondas de ondas de radio, láseres, magnetismo y radiación ionizante. Las técnicas químicas incluyen sin limitación nanopartículas tóxicas, toxinas químicas y compuestos de eliminación de estructuras como  $\beta$ -aminopropionitrilo. Las técnicas biológicas incluyen sin limitación anticuerpos contra células parcialmente funcionales o no funcionales y variaciones y modificaciones de los mismos, como conjugados de toxina y células asesinas naturales modificadas para expresar anticuerpos específicos para la diana. Las técnicas se pueden combinar como se determine que sean efectivas (por ejemplo véase McHale y col., Patente estadounidense núm. 6.821.274 para la sensibilización a los ultrasonidos mediante el tratamiento de FEM). Los aparatos, procedimientos y composiciones descritos en este documento se pueden usar secuencialmente o de forma simultánea en combinación como la monitorización determine que es efectivo para fomentar la regeneración.

**[0012]** Preferentemente, los aparatos, composiciones y procedimientos destruyen selectivamente células parcialmente y/o no funcionales frente a células funcionales del mismo tipo de célula hasta el punto de que, al eliminar las células destruidas mediante desintegración o captación, las células funcionales las reemplacen. El aparato, las composiciones y los procedimientos para destruir células de acuerdo con la presente invención deben preservar preferentemente las células funcionales proliferativas y debe ser a un grado que evite excesivas respuestas inflamatorias.

**[0013]** La evaluación de la mejora o el mantenimiento de un resultado deseado se puede usar para dirigir la frecuencia de reaplicación del aparato, las composiciones y los procedimientos de acuerdo con la presente invención. La aplicación y reaplicación se pueden determinar con el objetivo de una mejora gradual para evitar superar los mecanismos naturales, como la eliminación de células/residuos capturando células.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

**[0014]** La Figura ilustra un aparato que no forma parte de la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0015]** Los mayores organismos multicelulares se comportan como comunidades de células especializadas que trabajan conjuntamente no para preservar cada célula individual, sino para preservar el organismo en conjunto. En los humanos durante el desarrollo, las células que se "interponen" al desarrollo se eliminan mediante la muerte celular programada, apoptosis, para beneficiar a los tejidos, los órganos o el organismo en conjunto. Incluso cuando un organismo alcanza la madurez, ciertas células dañadas, como las células sanguíneas dañadas son destruidas por el cuerpo para dar paso a los reemplazos. Las células de reemplazo se derivan de las células madre. Como consecuencia, en un organismo maduro, la renovación de células es la clave para el mantenimiento de un todo joven/funcional.

**[0016]** Esta renovación puede ocurrir a expensas de la destrucción de células funcionales en la medida en que la destrucción no degrade la función del organismo con el paso del tiempo. De ese modo, tal destrucción debe dirigirse preferentemente a células no proliferativas que sean parcialmente o no funcionales, pero no necesita evitar por completo destruir células funcionales y proliferativas. El objetivo es preservar la comunidad de células (por ejemplo el organismo) no células individuales. Las células proliferativas incluyen tanto las células que se están dividiendo como las células, como las células madre, que se dividen normalmente cuando se les estimula para que lo hagan.

**[0017]** Mientras que las células madre participan en el reemplazo de tejido cotidiano, la lesión también puede ser una ocasión para la liberación de un factor o factores para estimular la proliferación y diferenciación de células madre. Las células madre dan lugar a células que curan la lesión, por ejemplo, cicatrizando un corte en un epitelio.

**[0018]** Sin embargo, la división y diferenciación de células madre podrían ser anormales, incluso tumorigenas, en

presencia de un complemento normal de células. Como consecuencia, hay mecanismos para impedir una proliferación excesiva. Por ejemplo, la presencia de una célula en una ubicación en un epitelio impide el reemplazo en esa posición. Un ejemplo de este tipo de fenómeno es la inhibición del contacto donde las células dejan de proliferar cuando entran en contacto con otras células. El fenómeno se puede generalizar a una regla de que, para facilitar la proliferación y diferenciación de células madre para la regeneración de células en una ubicación, no pueda haber una célula o estructura en la ubicación en el tejido.

**[0019]** En algunos casos, el cuerpo humano incluye células para deshacer una estructura, como los osteoclastos en el hueso, así como células para construir una estructura, como los osteoblastos en el hueso. Es el equilibrio entre las actividades de los dos tipos de células lo que determina la extensión de la estructura resultante. En caso de que algún mecanismo intrínseco no elimine células/estructura para la renovación periódica, la presente invención hace posible la eliminación para fomentar la regeneración.

**[0020]** La célula en la ubicación que inhibe la acción de las células madre puede ser totalmente funcional, parcialmente funcional, o no funcional. Las células muertas se pueden eliminar capturando macrófagos, permitiendo de ese modo el reemplazo, pero una célula que funcione mal puede permanecer a pesar de los efectos perjudiciales en el sujeto (es decir, el organismo del cual forman parte). Una célula parcialmente o no funcional, es decir una célula que funcione mal, no puede ser apoptótica, y, de ese modo, no puede estimular el aclaramiento mediante macrófagos por sí misma. Tales células que funcionan mal son destruidas de acuerdo con la presente invención para la eliminación mediante los procesos naturales del cuerpo.

**[0021]** La destrucción terapéutica de células en la terapia contra el cáncer está dirigida contra las células proliferativas, justo lo contrario a la presente invención. De acuerdo con la presente invención, la acción contra el cáncer se proporciona estimulando la proliferación de células madre de manera que los mecanismos correctores de errores que funcionan durante la división celular puedan corregir las mutaciones que de otra manera se pudieran acumular en una célula que no se divide.

**[0022]** Sin limitación, las células parcialmente o no funcionales de acuerdo con la presente invención pueden no ser totalmente funcionales debido al daño, como un daño de los radicales libres, o un entrecruzamiento como resultado de la reacción con azúcares, es decir la glicación. Las células que son parcialmente o no funcionales debido a una estructura genética que es compartida por las células madres de un sujeto se pueden reemplazar por células madre exógenas que tengan una estructura genética totalmente funcional.

**[0023]** La acción de bloqueo de las células madre por una célula o estructura en una ubicación en un tejido interfiere con la acción de las células madre endógenas y trasplantadas. Una estructura que bloquea la acción de las células madre no necesita ser una célula. Material no celular, como tejido cicatrizal, puede bloquear tal regeneración. Esto puede explicar los fallos en la regeneración y en el trasplante de células madre. En la medida de lo posible en una situación dada, las estructuras de bloqueo no celulares se pueden eliminar de acuerdo con la presente invención.

**[0024]** Con la eliminación de materiales de bloqueo celulares y/o no celulares, células regenerativas apropiadas, como las células madre, se retienen o se suplen mediante trasplante con el fin de permitir la regeneración. "Totalmente funcional" se define como el grado de una función específica para un tipo de célula particular mostrado por una progenie disponible de una célula madre en un sujeto con o sin trasplante de células madre, lo que sea mayor.

**[0025]** Un ejemplo de un aparato (que no forma parte de la presente invención) se ilustra en la FIG. 1. El efector 10 es un dispositivo para destruir células. El efector 10 puede ser, sin limitación, un equipo de ultrasonido o un dispositivo para la administración de anticuerpos, como un gotero. El control 20 es un dispositivo para regular la operación del efector 10 de acuerdo con los parámetros predeterminados y/o como se modifique para garantizar la seguridad o la efectividad. Sin limitación, el control 20 puede ser un panel de control del efector 10. El monitor 30 proporciona información relacionada con el grado de respuesta inflamatoria y/u otros factores importantes de la dolencia del sujeto al que se aplica el efector 10. La información del monitor 30 se puede usar para ajustar el control 20 y por lo tanto para ajustar o cambiar la operación del efector 10. El monitor 30 puede ser, sin limitación, un termómetro conectado al control 20.

**[0026]** Se selecciona una técnica para destruir preferentemente células parcialmente funcionales o no funcionales o para eliminar composiciones no celulares, en lugar de la destrucción indiscriminada, que tiene un efecto tan grande en las células funcionales. Se puede seleccionar una técnica exponiendo células funcionales y parcialmente

funcionales y/o no funcionales a la técnica y eligiendo concentraciones, intensidades y características como la longitud de onda, la frecuencia, la forma de onda, la continuidad y la duración del tratamiento. La técnica que aplicar a un sujeto particular se puede elegir en base a la identificación de una selectividad aceptable para las células parcialmente funcionales y/o células no funcionales frente a las células funcionales.

5

**[0027]** Procedimientos de selección y criterios adecuados están fácilmente disponibles para los expertos en la materia. Tales procedimientos de selección son aplicados de forma rutinaria por los expertos en las materias pertinentes para seleccionar niveles de tratamiento de láser para eliminar imperfecciones, tratar cánceres mediante terapia de radiación, seleccionar anticuerpos monoclonales, seleccionar toxinas que usar de forma terapéutica, y

10 seleccionar propiedades ultrasónicas para la terapia, por ejemplo. De acuerdo con la presente invención, las técnicas seleccionadas discriminan las células funcionales frente a las no funcionales y/o parcialmente funcionales del mismo tipo de célula que las células funcionales.

**[0028]** Las técnicas que actúan sobre las diferencias entre las células funcionales y las parcialmente o no

15 funcionales se pueden basar en las propiedades celulares asociadas con la disfunción, como el entrecruzamiento, la rigidez de la membrana y la coloración marrón asociada con la lipofuscina en células viejas o senescentes en lugar de en células nacientes, que se dividen o funcionales. Técnicas como el ultrasonido, dirigidas a las frecuencias armónicas de membranas celulares o componentes entrecruzados, se pueden usar de acuerdo con la presente invención. Asimismo, técnicas como láseres o luz intensa de una longitud de onda absorbida preferentemente por

20 células parcialmente funcionales o no funcionales se pueden usar de acuerdo con la presente invención.

**[0029]** Técnicas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para localizar la terapia cuando sea necesario. La localización se puede conseguir, sin limitación, mediante tomografía asistida por ordenador, resonancia magnética, y tomografía por emisión de positrones. Más preferentemente, se pueden aplicar técnicas de

25 acuerdo con la presente invención a todo el organismo sin la necesidad de la localización.

**[0030]** Una vez que se eligen las técnicas para una o más dianas, las técnicas se pueden aplicar periódicamente, particularmente a una baja intensidad o concentración, para mantener o aumentar un equilibrio positivo entre las células funcionales frente a las parcialmente o no funcionales. La destrucción de células gradual frente a la

30 precipitada puede ayudar a evitar los efectos tóxicos de los niveles elevados de los productos de descomposición celular y/o los efectos perjudiciales de una respuesta inflamatoria.

**[0031]** Además de las aplicaciones terapéuticas, se pretende que se incluyan aplicaciones no terapéuticas, no humanas e industriales dentro del ámbito de la presente invención. También se contemplan las aplicaciones

35 cosméticas, las aplicaciones de diagnóstico y las aplicaciones veterinarias. La práctica repetida del procedimiento de acuerdo con la presente invención a un bajo nivel se puede asociar con la monitorización para determinar el grado de mejora como una medida de diagnóstico del componente de una dolencia debido a las células dañadas frente a los factores genéticos. Con respecto a las aplicaciones de los cultivos de tejidos y de células, por ejemplo, la destrucción de las células de bloqueo puede permitir que las células muertas y los residuos resultantes sean

40 eliminados mediante lavado. De este modo, se puede aumentar la productividad de los cultivos de células y de tejidos aumentando la proporción relativa de células productivas frente a células no productivas.

## EJEMPLOS

45 **[0032]** Los siguientes ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no se deberían interpretar como limitaciones de la invención reivindicada. Hay una variedad de técnicas y procedimientos alternativos disponibles para los expertos en la materia que permitirían de forma similar llevar a cabo con éxito la invención propuesta.

### EJEMPLO 1

50

**[0033]** En una forma de realización de la presente invención los productos finales de glicación, entrecruzamientos creados por azúcares adheridos a proteínas, se seleccionan como indicios de una acumulación de daño celular en correlación con la funcionalidad parcial o nula. Anticuerpos contra tales productos finales de glicación se pueden producir de acuerdo con procedimientos muy conocidos para los expertos en la materia (por ejemplo Aded y col.,

55 Patente estadounidense núm. 6.380.165; Bucala, Patente estadounidense núm. 5.702.704) y anticuerpos monoclonales humanizados que retengan regiones constantes que permitan la destrucción de células diana por el sistema inmunológico se pueden producir para la inyección, también de acuerdo con procedimientos muy conocidos (por ejemplo Basi y col., Patente estadounidense núm. 7.256.273). Los anticuerpos se pueden examinar para mayor efectividad de acuerdo con la presente invención etiquetándolos y aplicándolos por separado a células no tratadas

frente a células incubadas con un azúcar como ribosa usada para inducir la formación de productos finales de glicación. La unión de los anticuerpos a un mayor grado a las células previamente incubadas con azúcar en lugar de a las células no tratadas con azúcar indica un efecto preferencial contra la diana seleccionada.

5 **[0034]** Los anticuerpos producidos como se describe anteriormente se pueden administrar a un sujeto por vía intravenosa con monitorización para determinar que las respuestas inflamatorias como la fiebre o la hinchazón no exceden los límites que es bien sabido que son seguros. Este proceso se puede repetir a intervalos para mantener un nivel de regeneración. El proceso se puede centrar en eliminar células parcialmente y/o no funcionales en una ubicación particular (por ejemplo donde se dirige el trasplante de células madre).

10 **[0035]** La evaluación de la mejora o el mantenimiento de un resultado deseado se puede usar para dirigir la frecuencia de reaplicación de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención. La aplicación y reaplicación se puede determinar con el objetivo de una mejora gradual para evitar superar los mecanismos naturales, como la eliminación de células/residuos capturando células.

15 **EJEMPLO 2 (no forma parte de la invención reivindicada)**

20 **[0036]** En otra forma de realización de la presente invención, los productos finales de glicación, entrecruzamientos creados por azúcares adheridos a proteínas, se seleccionan como indicios de una acumulación de daño celular en correlación con la funcionalidad parcial o nula. Este entrecruzamiento se manifiesta en una mayor rigidez de las células. Los expertos en la materia interpretan la rigidez para distinguir tipos de células proliferativas frente a no proliferativas (por ejemplo Kas y col., Patente estadounidense núm. 6.067.859).

25 **[0037]** El aparato de ultrasonido se puede usar de acuerdo con prácticas muy conocidas para los expertos en la materia para destruir células mediante técnicas de vibración (por ejemplo Chapelon y col., Patente estadounidense núm. 5.601.526). Los parámetros ultrasónicos (por ejemplo frecuencia, potencia, y pulsación) se pueden examinar para mayor efectividad al destruir selectivamente células más rígidas de acuerdo con la presente invención mediante la aplicación a células no tratadas frente a células incubadas con un azúcar como ribosa usada para inducir la formación de productos finales de glicación. Se prefiere la destrucción por vibración frente a la térmica mediante ultrasonido de acuerdo con la presente invención. Los parámetros seleccionados para la destrucción preferencial de células tratadas con azúcar en lugar de las células no tratadas previamente con azúcar indica el efecto preferencial contra la diana seleccionada.

35 **[0038]** El ultrasonido como se describe anteriormente se puede aplicar a un sujeto con monitorización para determinar que las respuestas inflamatorias como la fiebre o la hinchazón no exceden los límites que es bien sabido que son seguros. Este proceso se puede repetir a intervalos para mantener un nivel de regeneración. El proceso se puede centrar en eliminar células parcialmente y/o no funcionales en una ubicación particular (por ejemplo donde se dirige el trasplante de células madre).

40 **[0039]** La evaluación de la mejora o el mantenimiento de un resultado deseado se puede usar para dirigir la frecuencia de reaplicación de ultrasonido de acuerdo con la presente invención. La aplicación y reaplicación se puede determinar con el objetivo de una mejora gradual para evitar superar los mecanismos naturales, como la eliminación de células/residuos capturando células.

45 **[0040]** Mientras que la presente invención se ha descrito en términos de formas de realización preferidas, no se pretende que la presente invención esté limitada a las formas de realización descritas en este documento, sino, más bien, que la presente invención incluya todas las formas de realización dentro del ámbito de las reivindicaciones anexas debidamente interpretadas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento in vitro para fomentar los procesos regenerativos en un cultivo de tejidos o cultivo de células, que comprende administrar al cultivo de tejidos o cultivo de células un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana en dicho cultivo, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, preferentemente un anticuerpo monoclonal humanizado, o en el que el anticuerpo se conjuga a una toxina.  
5
2. Un procedimiento in vitro de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende además eliminar mediante lavado las células muertas y los residuos.  
10
3. Uso de un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana, para la fabricación de un medicamento para fomentar la regeneración de un tejido o un órgano en un sujeto destruyendo células diana parcialmente funcionales o no funcionales que tengan dicho producto final de glicación.
- 15 4. Un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana, para el uso en el fomento terapéutico de la regeneración de un tejido o un órgano en un sujeto destruyendo células diana parcialmente funcionales o no funcionales que tengan dicho producto final de glicación.
5. Uso de acuerdo con la Reivindicación 3, o un anticuerpo para el uso según la Reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, como un anticuerpo monoclonal humanizado, o en el que dicho anticuerpo se conjuga a una toxina.  
20
6. Una composición que comprende un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana, para el uso en el fomento terapéutico de procesos regenerativos, en la que la composición destruye selectivamente células senescentes.  
25
7. Una composición que comprende un anticuerpo que se une a un producto final de glicación en una célula diana, para el uso en la superación terapéutica de los efectos del envejecimiento, en la que la composición destruye selectivamente células senescentes.  
30
8. Una composición para el uso de acuerdo con la Reivindicación 6 o la Reivindicación 7, en la que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, como un anticuerpo monoclonal humanizado, o en la que dicho anticuerpo se conjuga a una toxina.

