

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 226**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.01.2010 PCT/EP2010/050048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10079161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2010 E 10700019 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2373339**

54 Título: **Un agente agotador de células B para el tratamiento de la aterosclerosis**

30 Prioridad:

06.01.2009 EP 09290005

07.01.2009 EP 09305013

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

18.08.2017

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)

**101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es:

**MALLAT, ZIAD;
AIT-OUFELLA, HAFID;
TEDGUI, ALAIN y
TEDDER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 630 226 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

Un agente agotador de células B para el tratamiento de la aterosclerosis

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la prevención o el tratamiento del infarto de miocardio, en particular a un anticuerpo anti-CD20 para la prevención o el tratamiento del infarto de miocardio.

Antecedentes de la invención

La aterosclerosis es la causa de mortalidad más común en las sociedades occidentales y se ha pronosticado que se convertirá en la causa principal de enfermedades cardiovasculares en el mundo en un plazo de dos décadas.

10 La aterosclerosis contribuye al desarrollo de enfermedades vasculares ateroscleróticas (AVD) que pueden afectar a las arterias coronarias (causando cardiopatía isquémica), a la circulación cerebral (causando enfermedad cerebrovascular), a la aorta (produciendo aneurismas que son propensos a trombosis y ruptura) y a vasos sanguíneos periféricos, normalmente en las piernas (causando enfermedad vascular periférica y claudicación intermitente). La cardiopatía isquémica (IHD) incluye la angina de pecho (dolor torácico causado por un riego sanguíneo insuficiente del músculo cardíaco) y el infarto de miocardio (muerte del músculo cardíaco), y la enfermedad cerebrovascular incluye el ictus y ataques isquémicos transitorios. Uno de cada tres hombres y una de cada cuatro mujeres morirán de IHD y la tasa de mortalidad por IHD fue de 58 por 100.000 en 1990.

15 Las placas ateroscleróticas comienzan como estrías grasas subyacentes al endotelio de grandes arterias. El reclutamiento de macrófagos y su posterior absorción de colesterol derivado de LDL (lipoproteínas de baja densidad) son los principales eventos celulares que contribuyen a la formación de estrías grasas. Muchos elementos de prueba sugieren que modificaciones oxidantes o no oxidantes en los componentes lipídicos y de apolipoproteína B (apo B) de las LDL impulsan la formación inicial de estrías grasas. Las propiedades específicas de las LDL oxidadas (oxLDL), estudiadas normalmente después de la oxidación de LDL nativas *in vitro*, dependen de la magnitud de la modificación. Ésta puede ir desde una modificación "mínima" (mmLDL), en donde la partícula de LDL puede seguir siendo reconocida por receptores de LDL, hasta una oxidación extensa, en donde el componente apo B está fragmentado y hay residuos de lisina modificados de forma covalente con productos de degradación reactivos de lípidos oxidados. Estas partículas no se unen al receptor de LDL, sino más bien a, así llamados, receptores de depuradores expresados en macrófagos y células de músculos lisos. A las mmLDL y oxLDL y a sus componentes se les ha atribuido una gran cantidad de propiedades proinflamatorias y proaterogénicas. Por ejemplo, la lisofosfatidilcolina o los fosfolípidos oxidados aumentan la adhesión de monocitos, la quimiotaxia de monocitos y células T, y pueden inducir expresión genética proinflamatoria. Aunque el reclutamiento de monocitos en la pared arterial y su posterior diferenciación en macrófagos puede cumplir inicialmente una función retirando partículas de oxLDL citotóxicas y proinflamatorias o células apoptóticas, la acumulación progresiva de macrófagos y su absorción de oxLDL conduce finalmente al desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

20 La transición desde la estría grasa relativamente simple hasta la placa más compleja se caracteriza por la migración de células de músculos lisos desde la túnica media de la pared arterial hasta la lámina elástica interna y hasta el espacio de la íntima o subendotelial, o por el reclutamiento de precursores de células de músculos lisos. Las células de músculos lisos de la íntima pueden proliferar y recoger lipoproteínas modificadas, contribuyendo así a la formación de células espumosas, y sintetizar proteínas de matriz extracelular que conducen al desarrollo de la capa fibrosa. Por lo tanto, la placa aterosclerótica avanzada se divide esquemáticamente en dos partes: la capa fibrosa, que constituye la capa superficial, y un núcleo lipídico, que constituye la capa profunda. Esta matriz extracelular (ECM) está compuesta por macromoléculas sumamente diferentes, incluyendo colágeno, elastina, glicoproteínas y proteoglicanos. En la capa fibrosa se depositan grandes cantidades de ECM, con lo que se mantiene la resistencia de la placa, mientras que en el núcleo lipídico, además de la deposición de lípidos, se produce una mayor degradación de ECM, lo que conduce a una mayor fragilidad del tejido. Esta fragilidad de la placa da lugar a una vulnerabilidad de la placa, que a su vez se convierte en una causa de rotura de placa.

25 Esta fase del desarrollo de la placa está influida por interacciones entre monocitos/macrófagos y células T que conducen a una amplia gama de respuestas celulares y humorales y a la adquisición de muchas características de un estado inflamatorio crónico. Al parecer, entre los elementos celulares de lesiones en desarrollo se producen interferencias significativas. Las células T de lesiones parecen ser activadas y expresar citoquinas tanto Th1 como Th2. De modo similar, los macrófagos, las células endoteliales y las células de músculos lisos parecen ser activadas sobre la base de su expresión de moléculas del MHC de clase II y numerosos productos inflamatorios tales como TNF, IL-6 y MCP 1.

Por lo tanto, en la técnica existe una necesidad reconocida y permanente de nuevos métodos fiables para tratar el infarto de miocardio

55 Una estrategia existente para el tratamiento de la aterosclerosis se basa en los indicios de que las rutas de Th1 y Th2 parecen desempeñar un papel clave. Por consiguiente, un tratamiento inmunomodulador que promueva una

inmunidad reguladora puede representar una herramienta atractiva para el tratamiento y/o la prevención de la aterosclerosis. Esto se puede llevar a cabo promoviendo la generación de células T reguladoras (Treg) tales como células Tr1, células CD4+CD25+ o células Th3. En este contexto, se ha demostrado que las células T reguladoras CD4(+)/CD25(+) originadas de forma natural, que mantienen activamente la tolerancia inmunológica a antígenos propios y extraños, son potentes inhibidores de la aterosclerosis en varios modelos de ratón.

Por otro lado, un estudio reciente sugiere que una deficiencia de células B aumenta la aterosclerosis en un modelo de ratón (Major et al., 2002). Otro estudio reciente ha demostrado que las células B confieren protección contra la aterosclerosis (Caligiuri et al., 2002). En consecuencia, la técnica anterior sugiere que el agotamiento de células B no es un método prometedor para el tratamiento de la aterosclerosis, al contrario de lo descrito, pero no demostrado, en las siguientes solicitudes de patente: US2004/202658, US2005/186206, US2008/260641, WO2007/053661 y US2004/167319. Más particularmente, estos documentos enseñan el uso de anticuerpos anti-CD20 (y antagonistas de CD20 en el caso de los documentos US2004/202658 y US2005/186206) para tratar enfermedades autoinmunes o cánceres, pero no sugieren el uso de anticuerpos anti-CD20 para la prevención o el tratamiento del infarto de miocardio.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD20 para el tratamiento o la prevención del infarto de miocardio. En particular, la presente invención está definida por las reivindicaciones.

La presente descripción también se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la aterosclerosis.

Descripción detallada de la invención

Los inventores han demostrado que la administración de un agente agotador de células B (es decir, un anticuerpo anti-CD20) permite reducir de forma significativa el tamaño de la placa aterosclerótica en un modelo de ratón.

En la patogénesis de trastornos (auto)inmunes intervienen respuestas dependientes de células B y el agotamiento de células B reduce significativamente la carga de diversas enfermedades mediadas por el sistema inmunitario. Sin embargo, la activación de células B se ha asociado hasta ahora con una protección contra la aterosclerosis (Caligiuri et al., 2002; Major et al., 2002; Binder et al., 2004; Miller et al., 2008), sugiriendo que las terapias de agotamiento de células B aumentarían el riesgo cardiovascular.

Aquí, los inventores demuestran inesperadamente que el agotamiento de células B maduras utilizando un anticuerpo monoclonal de CD20 induce una reducción significativa de la aterosclerosis en diversos modelos de ratón de la enfermedad. Este tratamiento preserva la producción de anticuerpos de IgM antilipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) naturales y potencialmente protectores sobre anticuerpos anti-oxLDL de tipo IgG, y reduce notablemente la activación de células T patógenas. Los mecanismos ateroprotectores del agotamiento de células B implican un cambio de la respuesta inmunitaria hacia una disminución de la secreción de interferón-gamma derivado de células T y un aumento de la producción de interleuquina 17, cuya neutralización anula la ateroprotección mediada por anticuerpos CD20.

Estos resultados ponen en duda el paradigma actual de que la activación de células B desempeña un papel protector global en la aterogénesis, identifican nuevas estrategias antiaterogénicas basadas en la modulación de células B, y sugieren que pacientes actualmente tratados con agentes agotadores de células B, tales como anticuerpos de CD20, para otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario también se pueden beneficiar de una reducción del riesgo cardiovascular a través de la limitación del desarrollo de lesiones ateroscleróticas o inflamaciones.

Los inventores también han demostrado que el agotamiento de células B es beneficioso en el infarto de miocardio.

Definiciones

El concepto "célula B" tiene su significado general en la técnica. Las células B son linfocitos que desempeñan un gran papel en la respuesta inmunitaria humoral (a diferencia de la respuesta inmunitaria mediada por células, que está dirigida por células T).

Un "agente agotador de células B" es una molécula que agota o destruye células B en un paciente y/o que interfiere con una o más funciones de las células B, por ejemplo reduciendo o previniendo una respuesta humoral provocada por la célula B. El agente agotador de células B se une preferiblemente a un marcador de superficie de células B. El agente agotador de células B preferiblemente puede agotar las células B (es decir, reducir los niveles de células B en circulación) en un paciente tratado con el mismo. Dicho agotamiento se puede lograr a través de diversos mecanismos tales como citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), inhibición de la proliferación de células B y/o inducción de muerte de células B (por ejemplo a través de apoptosis). Los agentes agotadores de células B incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, péptidos de secuencia sintética o nativa y antagonistas de moléculas pequeñas que preferiblemente se unen al

marcador de superficie de células B, opcionalmente conjugados con un agente citotóxico o fusionados con el mismo. El agente agotador de células B preferido comprende un anticuerpo, más preferiblemente un anticuerpo agotador de células B.

5 En una realización preferida, el agente agotador de células B no tiene la capacidad de agotar células plasmáticas. En otra realización preferida, el agente agotador de células B no tiene la capacidad de agotar células B10 (o células Breg). En otra realización preferida, el agente agotador de células B no tiene la capacidad de agotar células B1. En consecuencia, en una realización preferida particular, el agente agotador de células B no tiene la capacidad de agotar células plasmáticas ni células B10. En consecuencia, en una realización preferida particular, el agente agotador de células B no tiene la capacidad de agotar células plasmáticas, células B10 ni células B1.

10 El concepto "citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta de complemento clásica se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento a anticuerpos que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación de complemento se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al. (1997).

15 El concepto "citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que anticuerpos segregados unidos sobre receptores Fc (FcR) presentes sobre determinadas células citotóxicas (por ejemplo células asesinas naturales (NK), neutrófilos, monocitos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente maten la célula diana. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede llevar a cabo un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la Patente de los EE.UU. n° 5,500,362 o 5,821,337.

20 Un "marcador de superficie de células B" o "diana de células B" o "antígeno de células B" es aquí un antígeno expresado sobre la superficie de una célula B que puede ser fijada como diana con un agente agotador de células B que se une a la misma. Algunos marcadores de superficie de células B ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los marcadores de superficie de leucocito CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86. El marcador de superficie de células B que presenta un interés particular es expresado preferentemente sobre células B en comparación con otros tejidos que no son de células B de un mamífero y puede ser expresado tanto sobre células B precursoras como sobre células B maduras. En una realización, el marcador es uno como CD20 o CD19, que se encuentra sobre células B a lo largo de toda la diferenciación de la génesis desde la etapa de célula madre hasta un punto justo antes de la diferenciación terminal en células plasmáticas.

25 Un antígeno "CD20" es una fosfoproteína de 35 kDa no glicosilada, que se encuentra en la superficie de más de un 90% de células B procedentes de sangre periférica o de órganos linfoides. El CD20 es expresado durante el desarrollo temprano previo a la célula B y permanece hasta la diferenciación en células plasmáticas. El CD20 está presente tanto sobre células B normales como sobre células B malignas. Otros nombres para el CD20 en la literatura incluyen "antígeno restringido a linfocitos B" y "Bp35". El antígeno CD20 está descrito, por ejemplo, en Clark et al. PNAS (EE.UU.) 82:1766 (1985).

30 De acuerdo con la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado y se utilizan por igual en la presente invención. El término "anticuerpo" como se emplea en esta memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión de antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término "anticuerpo" no solo incluye moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpo así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. En anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están enlazadas entre sí mediante enlaces de disulfuro y cada cadena pesada está enlazada con una cadena ligera mediante un enlace de disulfuro. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (l) y kappa (k). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene distintos dominios de secuencia. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, designados colectivamente como CH). Las regiones variables tanto de las cadenas ligeras (VL) como de las cadenas pesadas (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad con respecto al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligeras (CL) y pesadas (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como asociación de cadenas de anticuerpo, secreción, movilidad transplacentaria, unión de complemento, y unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación de anticuerpos y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de anticuerpos están formados por residuos que proceden principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, residuos de regiones no hipervariables o de armazón (FR) influyen en la estructura de dominio global y por lo tanto en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de la complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que definen juntas la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de

- 5 inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen en cada caso tres CDR, designadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Por consiguiente, un sitio de unión de antígeno incluye seis CDR, que comprenden la CDR establecida tanto desde una región V de cadena pesada como desde una región V de cadena ligera. Las regiones de armazón (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR.
- El concepto "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo de la invención, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.
- De acuerdo con la descripción, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene un armazón de región variable y regiones constantes procedentes de un anticuerpo humano, pero que conserva las CDR del anticuerpo de la descripción.
- El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión de antígeno, en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, están unidas entre sí a través de un enlace de disulfuro.
- 15 El término "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión de antígeno, que es ligeramente más grande que el Fab unido a través de un enlace de disulfuro de la región bisagra, entre fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina.
- El término "Fab' " se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión de antígeno, que se obtiene cortando un enlace de disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.
- 20 Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL enlazado de forma covalente que normalmente se expresa a partir de una fusión génica, incluyendo genes codificadores de VH y VL enlazados mediante un enlazador codificador de péptido. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado mediante un enlace de disulfuro. Los fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes se pueden formar espontáneamente mediante asociación de scFv monovalentes o se pueden generar por copulación de scFv monovalentes mediante un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente.
- 25 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión de antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para posibilitar un apareamiento entre dos dominios de la misma cadena, los dominios están forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión de antígeno.
- 30 Los "anticuerpos agotadores de células B" se definen como aquellos anticuerpos que se unen a un marcador de superficie de células B sobre la superficie de células B y median en la destrucción o el agotamiento de éstas cuando se unen a dicho marcador de superficie celular. El concepto incluye fragmentos de anticuerpo. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-CD20, anti-CD 19, anti-CD22, anti- CD21, anti-CD23, anti-CD28, anti-CD37, anti-CD40, anti-CD52. Un ejemplo de un anticuerpo anti-CD20 es el RITUXAN® (rituximab). Los anticuerpos agotadores de células B también incluyen anticuerpos que destruyen células B a través de otros mecanismos. Por ejemplo, incluyen anticuerpos radiomarcados que facilitan la destrucción de células B mediante la unión a la superficie de las células B y el suministro de una dosis de radiación letal. Estos incluyen 131 I-Lym-1 (anti-HLA-D), 131 I-tositumomab (BEXXAR®), ibritumomab tiuxetan (Y-90, In-1 1 ZEVALIN®) y 90 Y-epratuzumab.
- 35 En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se emplea en esta memoria, significa invertir, aliviar o inhibir el progreso del trastorno o la enfermedad a los que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o enfermedad. El concepto "cantidad terapéuticamente eficaz" está previsto para una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para otorgar un beneficio terapéutico a un individuo. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" para un paciente es una cantidad tal que induce, mejora o causa de otro modo una mejoría de los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o las condiciones fisiológicas asociadas con un trastorno o con la resistencia a sucumbir a un trastorno.
- 40 En su sentido más amplio, el término "prevenir" o "prevención" se refiere a prevenir que se produzca la enfermedad o trastorno en un individuo que todavía no ha sido diagnosticado como paciente de la misma.
- 45 El término "paciente" se refiere a cualquier individuo (preferiblemente humano) aquejado de aterosclerosis o susceptible de padecer aterosclerosis.
- 50 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando son administradas a un mamífero, en especial un humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un material de carga, diluyente o encapsulante, o a una formulación auxiliar de cualquier tipo, sólidos, semisólidos o líquidos no tóxicos.
- 55

Métodos de tratamiento

La presente descripción se refiere a un método para prevenir o tratar la aterosclerosis en un paciente que lo requiera, que comprende la etapa de agotar la población de células B de dicho paciente.

5 Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar el infarto de miocardio en un paciente que lo requiera, que comprende la etapa de administrar un anticuerpo anti-CD20 a dicho paciente.

El método de acuerdo con la presente invención puede ser suministrado a un paciente al que se le han diagnosticado trastornos isquémicos con necrosis miocárdica, tales como infarto de miocardio con elevación del segmento ST o infarto de miocardio sin elevación del segmento ST.

10 De hecho, dichas patologías son complicaciones de la aterosclerosis y por lo tanto son consideradas como indicativas de aterosclerosis.

En una realización particular, el agente agotador de células B puede consistir en un anticuerpo agotador de células B.

15 Los anticuerpos dirigidos contra un marcador de superficie de células B se pueden obtener de acuerdo con métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, entre cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Es posible utilizar diversos adyuvantes conocidos en la técnica para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, son preferibles los anticuerpos monoclonales.

20 Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar y aislar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas de producción y aislamiento incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma-EBV. Alternativamente, algunas técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. n° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla contra un marcador de superficie de células B. Los anticuerpos útiles de acuerdo con la invención también incluyen fragmentos de anticuerpo incluyendo, pero sin limitarse a, fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar mediante digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para posibilitar una identificación rápida de fragmentos que tengan la especificidad deseada con respecto al marcador de superficie de células B.

25 También es posible preparar, de acuerdo con técnicas conocidas, anticuerpos humanizados de acuerdo con la presente descripción y fragmentos de anticuerpo de los mismos. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo de roedor) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor están sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de región de armazón (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los, al menos uno y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, Winter (Patente de los EE.UU. n° 5.225.539) y Boss (Celltech, Patente de los EE.UU. n° 4.816.397) describen métodos para producir anticuerpos humanizados.

30 Después de producir anticuerpos dirigidos contra un marcador de superficie de células B tal como se ha descrito más arriba, los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente aquellos que agotan células B, por ejemplo aquellos que agotan células B a través de citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC), citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), inhibición de la proliferación de células B o inducción de muerte de células B (por ejemplo a través de apoptosis).

35 En una realización particular, el anticuerpo agotador de células B puede consistir en un anticuerpo dirigido contra un marcador de superficie de células B que está conjugado con un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

40 Por consiguiente, la invención prevé el uso de inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo contra un marcador de superficie de células B conjugado con un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

55

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial una célula B, bien *in vitro*, bien *in vivo*. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular, tales como agentes que inducen una detención de G1 y una detención de la fase M. Los bloqueadores de fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido, y bleomicina. Estos agentes que detienen G1 también se extienden a una detención de la fase S, por ejemplo agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato y 5-fluorouracilo.

El concepto "agente citotóxico", como se emplea en esta memoria, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o que provoca la destrucción de células. El concepto incluye isótopos radiactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, por ejemplo gelonina, ricina, saporina, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos más abajo. Más abajo se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa destrucción de células tumorales.

La conjugación de los anticuerpos de la invención con agentes citotóxicos o agentes inhibidores del crecimiento se puede realizar utilizando una variedad de agentes de copulación proteínica bifuncional, incluyendo, pero sin limitarse a, (2-piridilditio) propionato de N-succinimidilo (SPDP), (N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tal como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricino tal como se describe en Vitetta et al. (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil metildietileno triaminopenta-acético marcado con carbono (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo (WO 94/11026).

Alternativamente se puede preparar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas codificadoras de las dos porciones del conjugado, bien adyacentes entre sí, bien separadas por una región codificadora de un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En una realización particular, el marcador de superficie de células B es CD20.

Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el agente agotador de células B es un anticuerpo anti-CD20.

Los ejemplos de anticuerpos agotadores previstos por la invención incluyen anticuerpos que se unen al antígeno CD20: "C2B8", que es "rituximab" ("RITUXAN®") (Patente de los EE.UU. n° 5,736,137, incorporada expresamente en esta memoria por referencia); el anticuerpo múrido 2138 marcado con itrio-[90] designado "Y2B8" (Patente de los EE.UU. n° 5,736,137, incorporada expresamente en esta memoria por referencia); IgG2a múrida "131" marcada opcionalmente con 131I para generar el anticuerpo "131I-B1" (BEXXARTM®) (Patente de los EE.UU. n° 5,595,721, incorporada expresamente en esta memoria por referencia); anticuerpo monoclonal múrido "1F5" (Press et al. Blood 69(2): 584-591 (1987)); anticuerpo "quimérico 2H7" (Patente de los EE.UU. n° 5.677.180 incorporada expresamente en esta memoria por referencia); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1133, B-C1 o NU-B2 disponibles de International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., en: Leukocyte Typing III (M cMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)).

Los términos "rituximab" o "RITUXAN®" se refieren aquí al anticuerpo monoclonal quimérico múrido/humano producido por ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20 y designado "C2B8" en la Patente de los EE.UU. n° 5.736.137, incorporada expresamente en esta memoria por referencia. El anticuerpo es una inmunoglobulina kappa IgG que contiene secuencias de región variable de cadena ligera y cadena pesada múridas y secuencias de región constante humanas. El rituximab tiene una afinidad de unión por el antígeno CD20 y de aproximadamente 8,0 nM. Está comercialmente disponible, por ejemplo de Genentech (South San Francisco, CA).

El agente agotador de células B de la invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica, tal como se describe más abajo.

Preferiblemente, dicho agente agotador de células B se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" quiere decir una cantidad suficiente del agente agotador de células B para tratar o prevenir la aterosclerosis con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

5 Se entenderá que el uso periódico total de los compuestos y las composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de diversos factores, incluyendo el trastorno tratado y la gravedad del mismo; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o de forma coincidente con el polipéptido específico empleado; y factores similares notoriamente conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, es muy conocido por el experto comenzar con dosis del compuesto en niveles menores de los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta alcanzar el efecto deseado. No obstante, la dosis diaria de los productos puede variar dentro de un amplio margen desde 0,01 hasta 1.000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis para el paciente que se ha de tratar. Un medicamento contiene normalmente desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente desde 1 mg hasta aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra generalmente en un nivel de dosis desde 0,0002 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, en especial desde aproximadamente 0,001 mg/kg hasta 7 mg/kg de peso corporal al día.

Composiciones farmacéuticas

El agente agotador de células B de la presente descripción se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación prolongada, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

25 En las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede ser administrado en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias adecuadas comprenden formas de administración por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal, y formas de administración rectal.

30 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación apta para ser inyectada. Éstos pueden ser, en particular, soluciones salinas estériles isotónicas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de estas sales), o composiciones secas, en especial liofilizadas, que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

35 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma ha de ser estéril y ha de ser suficientemente fluida para poder ser inyectada fácilmente con jeringuilla. Ha de ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se ha de preservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

40 Las soluciones que comprenden compuestos de la presente descripción en forma de base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. Bajo condiciones de almacenamiento y uso normales, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

45 El agente agotador de células B de la presente descripción se puede formular en una composición en una forma neutra o forma de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

50 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión, y mediante el

5 uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr utilizando en las composiciones agentes retardadores de la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

10 Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante incorporación de los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes arriba enumerados, en caso necesario, seguida de esterilización filtrada. Por regla general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre los arriba enumerados. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada de forma estéril.

15 Después de la formulación, las soluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables arriba descritas, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

20 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debería tamponar adecuadamente en caso necesario y el diluyente líquido primero se debería volver isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que pueden ser empleados según la presente descripción. Por ejemplo, una dosis se podría disolver en un 1 ml de solución isotónica de NaCl y bien añadir a 1.000 ml de fluido de hipodermocclisis, bien inyectar en el sitio de infusión propuesto. Necesariamente se producirá alguna variación de la dosis dependiendo del estado del individuo tratado. En todo caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el paciente individual.

25 El agente agotador de células B de la presente descripción puede ser formulado dentro de una mezcla terapéutica para que comprenda aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente de 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. También se pueden administrar dosis múltiples.

30 Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación temporizada; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

35 La invención se ilustrará adicionalmente con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras

Figura 1: Agotamiento de células B en la sangre después de 3 meses de tratamiento CD20 antimúrido, una inyección intraperitoneal (200 µg) cada 3 semanas.

40 Figura 2: Agotamiento de células B en el bazo después de 3 meses de tratamiento anti-CD20, una inyección intraperitoneal (200 µg) cada 3 semanas. Las Figuras 2A y 2B representan el agotamiento de células B en 2 experimentos diferentes.

Figura 3: Agotamiento de células B (B220 alto) en médula ósea después de 3 meses de tratamiento anti-CD20, una inyección intraperitoneal (200 µg) cada 3 semanas.

45 Figura 4: El agotamiento de células B induce una disminución de la expresión de CD69 por células CD4 T esplénicas, lo que parece indicar una desactivación de células CD4 T.

Figura 5: El agotamiento de células B induce una disminución de la expresión de CD44 alto por células CD4 T esplénicas, lo que parece indicar una desactivación de células CD4 T.

Figura 6: El agotamiento de células B induce una disminución de la incorporación de BrdU *in vivo* por células CD4 T esplénicas, lo que indica una disminución de la proliferación de células CD4 T *in vivo*.

50 Figura 7: Producción de citoquinas por células CD4+ T esplénicas purificadas, estimuladas *in vitro* con anticuerpo anti-CD3 en presencia de células dendríticas CD11c+ purificadas.

Figura 8: El recuento de células de neutrófilo (Ly6G+ CD11b+) y el recuento de células de monocito (CD11b+/Ly6G-/Ly6C alto, bajo o neg.) se evaluó utilizando citometría de flujo (primer conjunto de experimentos). Los inventores encontraron un mayor recuento de células de neutrófilo y monocito después de 3 meses de tratamiento anti-CD20.

5 Figura 9: El recuento de células de neutrófilo (Ly6G+ CD11b+) y el recuento de células de monocito (CD11b+/Ly6G-/Ly6C alto, bajo o neg.) se evaluó utilizando citometría de flujo (segundo conjunto de experimentos). Los inventores encontraron un mayor recuento de células de neutrófilo y monocito después de 3 meses de tratamiento anti-CD20.

Figura 10: El peso y los niveles de colesterol en plasma eran similares entre los grupos después de 3 meses de tratamiento.

10 Figura 11: Reducción significativa en el tamaño de lesión de seno aórtico en los grupos de ratones tratados con anticuerpo anti-CD20 (MB20-11) después de 6 o 12 semanas de tratamiento.

15 Figura 12: El tratamiento con mAb CD20 (α -CD20) agota células B y reduce el desarrollo de la aterosclerosis. Los cuadros A a D muestran una reducción del desarrollo de aterosclerosis después de una terapia α -CD20 en 4 experimentos diferentes utilizando ratones *Apoe*^{-/-} o *Ldlr*^{-/-} alimentados bien con dieta *chow* (CD) (alimento equilibrado para roedores), bien con dieta occidental (WD). Por cada configuración experimental se muestran microfotografías representativas de senos aórticos con coloración Oil red O junto con cuantificación del tamaño de lesión en la íntima. Las barras indican valores medianos.

20 Figura 13: El tratamiento con mAb CD20 (α -CD20) reduce el desarrollo de aterosclerosis en la aorta torácica. Análisis cuantitativo de la extensión de coloración Oil red O en aortas torácicas de ratones *Apoe*^{-/-} alimentados con una dieta occidental durante 12 semanas y tratados con α -CD20 o con un anticuerpo de control. Los datos (valores medios \pm e.e.m.) son representativos de 9 (control) a 10 ratones (α -CD20) por grupo.

Figura 14: Agotamiento de células B después de infarto de miocardio. Se muestra la función cardíaca cuantitativa.

Ejemplo 1: Agotamiento de células B y aterosclerosis

Resultados y discusión

25 El desarrollo de la aterosclerosis está asociado con signos de activación de células B, en particular manifestados por una producción incrementada de (auto)anticuerpos antilipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) de tipo IgM natural y de tipos IgG adaptativos (Caligiuri et al., 2002; Shaw et al., 2000). Sin embargo, a diferencia de otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, es decir, artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico, a las células B se les ha asignado un papel protector en la aterosclerosis (Caligiuri et al., 2002; Major et al., 2002; Binder et al., 2004; Miller et al., 2008). Aunque los anticuerpos anti-ox-LDL de tipos IgG muestran una asociación variable con riesgo vascular, los niveles de anticuerpos anti-ox-LDL de tipo IgM en circulación se han relacionado más frecuentemente con un riesgo vascular reducido en humanos (Karvonen et al., 2003; Tsimikas et al., 2007). En ratones, efectos ateroprotectores mediados por IL-5 e IL-33 se han asociado indirectamente con una activación de células B1 específica y una producción incrementada de anticuerpos anti-oxLDL de tipo IgM natural (Binder CJ et al., 2004; Miller AM et al., 2005). Por otro lado, la esplenectomía o la transferencia de médula ósea con deficiencia de μ MT (deficiencia de células B) a ratones susceptibles de aterosclerosis irradiados letalmente resultaba en una reducción profunda de IgG o de la producción total de anticuerpos anti-oxLDL y estaba asociada con la aceleración del desarrollo de lesiones.

Estos estudios condujeron al paradigma actual de que la activación de células B global es ateroprotectora.

40 Sin embargo, sorprendentemente, todavía no se ha investigado si un agotamiento de células B maduras acelera el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en ratones inmunocompetentes, como es de esperar a partir de los estudios previos. Esta es una cuestión crítica dado el riesgo potencialmente importante de complicaciones cardiovasculares que pueden surgir del uso clínico de inmunoterapia dirigida a CD20 agotadora de células B en pacientes con artritis reumatoide severa o lupus eritematoso sistémico, que presentan un riesgo particularmente alto de enfermedades cardiovasculares.

45 Con el fin de evaluar directamente el papel de las células B en la aterosclerosis, los inventores han examinado el desarrollo de lesiones en ratones con o sin agotamiento de células B. Primero utilizaron ratones *Apoe*^{-/-} alimentados con una dieta occidental rica en materia grasa, un modelo previamente conocido y asociado con una activación significativa de células B y una alta producción de anticuerpos anti-ox-LDL, y previamente utilizado para evaluar el papel protector de las células B en la aterosclerosis. Para agotar las células B, los ratones fueron tratados cada 3 semanas con un anticuerpo CD20 monoclonal de ratón previamente validado (Uchida et al., *Int Immunol*, 2004; Uchida et al., *J Exp Med*, 2004) durante 6 o durante 12 semanas. Los ratones de control recibieron un anticuerpo monoclonal de control (mAb). Como era de esperar, el tratamiento con mAb CD20 condujo a una reducción mantenida y profunda de la cantidad de células B maduras en la sangre (Figura 1), el bazo (Figura 2), el peritoneo y la médula ósea. Las células B220^{alto} IgM⁺ se agotaron en gran medida (del 92% al 100%) en todos los sitios estudiados. Las células B220^{bajo} IgM⁺ de bazo también mostraron una reducción notable (~ 80%), pero, como ya se

había observado previamente, las células B220^{bajo} (IgM⁺) de médula ósea inmaduras (Figura 3) eran menos susceptibles al agotamiento mediado por mAb CD20. El tratamiento con mAb CD20 durante 6 semanas no afectó a los niveles de colesterol en plasma ($6,4 \pm 0,9$ frente a $6,3 \pm 0,8$ g/l en el grupo de control y el grupo tratado con mAb CD20, respectivamente, $P = 0,88$), pero inesperadamente condujo a una reducción significativa, no a una aceleración, del desarrollo de lesiones ateroscleróticas (Figura 12A). Los inventores analizaron a continuación los experimentos de ratones *Apoe*^{-/-} tratados durante 12 semanas bajo una dieta rica en materia grasa y todavía encontraron una reducción significativa de la aterosclerosis en 2 sitios vasculares diferentes (Figura 12B y Figura 13), a pesar de niveles similares de colesterol en plasma ($18,7 \pm 1,1$ frente a $17,9 \pm 1,0$ g/l en el grupo IgG de control y el grupo tratado con anti-CD20, respectivamente, $P = 0,68$). Con el fin de descartar la posibilidad de que el efecto ateroprotector del tratamiento con mAb CD20 se debiera al uso de un modelo de ratón que generara una inflamación excesiva en respuesta a una sobrecarga de lípidos muy alta, el efecto de un agotamiento de células B se examinó en ratones *Apoe*^{-/-} alimentados con una dieta *chow*. El tratamiento de estos ratones con anticuerpo CD20 durante 12 semanas también condujo a una reducción significativa del desarrollo de lesiones (Figura 12C), a pesar de niveles similares de colesterol en plasma ($5,5 \pm 0,6$ frente a $5,7 \pm 0,8$ g/l en el grupo IgG de control y el grupo tratado con anti-CD20, respectivamente, $P = 0,96$). Los niveles elevados de colesterol en plasma en ratones *Apoe*^{-/-} son en su mayoría del subtipo de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), mientras que un nivel elevado de LDL es el principal factor de riesgo de aterosclerosis en humanos. Por lo tanto, los inventores examinaron los efectos del agotamiento de células B en el modelo de ratón con deficiencia de receptor de LDL (*LDLR*^{-/-}). De nuevo, el tratamiento de ratones *LDLR*^{-/-} con mAb CD20 condujo a un agotamiento notable de células B y a una reducción significativa de la aterosclerosis (Figura 12D).

En conjunto, estos estudios proporcionan una prueba sólida de un papel proaterogénico insospechado de células B en tres modelos de ratón de aterosclerosis.

Los inventores abordaron a continuación los mecanismos potenciales responsables de la ateroprotección después del agotamiento de células B. Comprobaron que el tratamiento con anticuerpo agotador de CD20 resultaba en una reducción profunda de anticuerpos anti-oxLDL de tipo IgG tanto después de 6 como después de 12 semanas de tratamiento, lo que era coherente con el agotamiento profundo de células B220^{alto} en sangre, bazo y médula ósea. Se podría argumentar que la reducción de IgG anti-oxLDL podría haber limitado las consecuencias potencialmente perjudiciales de la formación de inmunocomplejos en la aterosclerosis. Sin embargo, en otros estudios, y en particular después de una esplenectomía, se observó una profunda reducción de niveles de IgG anti-oxLDL en asociación con una aceleración, no una reducción, de la aterosclerosis. Por lo tanto, en ausencia de estudios que aborden directamente el papel de los anticuerpos anti-oxLDL de tipo IgG en la aterosclerosis, los cambios en los niveles de IgG anti-oxLDL después de tratamiento con mAb CD20 no podían ser considerados como responsables de la reducción de lesiones. Los niveles de anticuerpos de tipo IgM bien contra LDL oxidadas con cobre, bien contra LDL modificadas con dialdehído malónico, también se redujeron después de 6 o 12 semanas de terapia dirigida CD20. Los anticuerpos de tipo IgM están dotados de propiedades ateroprotectoras y su reducción después de terapia con mAb CD20 no podía explicar la ateroprotección, sino que, en lugar de ello, podría haber obstaculizado la reducción de la aterosclerosis. No obstante, es interesante señalar que los anticuerpos anti-oxLDL de tipo IgM y los anticuerpos IgM T15id⁺ mostraban una reducción mucho menor en comparación con anticuerpos de tipo IgG, que podrían haber preservado una ruta ateroprotectora. Los anticuerpos de tipo IgM dominan la respuesta humoral a oxLDL en ratones *Apoe*^{-/-} y aumentan incluso a una edad temprana (antes del inicio del tratamiento con mAb CD20 en este estudio), lo que podría explicar, al menos en parte, la persistencia de un nivel de IgM significativo después de inmunoterapia de CD20, un tratamiento que no afecta drásticamente a títulos de anticuerpos preexistentes. La persistencia de IgM también puede estar relacionada con el retraso requerido para agotar de forma notable las células B1 peritoneales utilizando mAb CD20.

Los inventores examinaron después la composición de lesiones ateroscleróticas para comprender mejor los mecanismos de la ateroprotección. De forma interesante, el tratamiento con mAb CD20 estaba asociado con una reducción significativa y específica de la acumulación de linfocitos T dentro de las lesiones, lo que sugiere que las células B desempeñan una función en el avance de inflamaciones de lesiones dependientes de células T. Como era de esperar en esta etapa de formación de lesiones, se detectaron muy pocas células B dentro de las placas o dentro de la capa adventicia sin tener en cuenta el grupo de tratamiento, lo que sugiere que lo más probable es que la modulación de células T de lesión por la terapia con mAb CD20 se produjera como consecuencia de una modulación sistémica de la función de células T después de un agotamiento de células B sistémico. Para abordar esta hipótesis, los inventores examinaron la activación y proliferación de células T. De forma interesante, los inventores encontraron sistemáticamente reducciones notables en la expresión de CD69 y CD44^{alto} en células T CD4⁺ derivadas de bazo de ratones tratados con anticuerpo CD20 en comparación con los controles tanto después de 6 semanas como después de 12 semanas de dieta rica en materia grasa, lo que indicaba una activación de células T reducida. El agotamiento de células B también condujo a una reducción significativa de la tinción con BrdU *in vivo* de células T CD4⁺CD25⁻ efectoras, lo que sugiere una proliferación reducida. Una activación de células T reducida en ratones tratados con mAb CD20 también era coherente con la reducción notable de expresión de CD40 en células dendríticas CD11c⁺. Por lo tanto, una consecuencia principal del agotamiento de células B utilizando anticuerpo CD20 es una reducción notable de la activación de células T *in vivo*, que podría explicar potencialmente su efecto ateroprotector.

Las citoquinas derivadas de células T cambian significativamente el desarrollo de lesiones. Por consiguiente, los inventores examinaron las consecuencias del agotamiento de células B en la producción de citoquinas por células T purificadas. Los inventores descubrieron una reducción notable del IFN- γ proaterogénico mediante células T purificadas recuperadas de ratones tratados con mAb CD20 en comparación con controles. Se ha de señalar que esto estaba asociado con una desviación de la respuesta inmunitaria hacia un aumento significativo de la producción de IL-17A derivada de células T en animales tratados con mAb CD20. En estudios recientes en el laboratorio de los inventores se identificó un papel regulador y protector inesperado para la producción de IL-17A en la aterosclerosis. También se ha demostrado que la IL-17A modula la polarización de Th1. Con el fin de examinar si los cambios inducidos por mAb CD20 en el perfil de citoquinas de células T (Th1 reducido e IL17 aumentada) podrían ser responsables de la ateroprotección dependiente de mAb CD20, se administró mAb CD20 a ratones *Apoe*^{-/-} (sometidos a dieta rica en materia grasa durante 6 semanas) en presencia de control o anticuerpo neutralizador anti-IL17A. La neutralización de IL17 condujo a un aumento de la producción de IFN- γ en las aortas ateroscleróticas y anuló por completo los efectos ateroprotectores de la terapia con mAb CD20, a pesar de unos niveles similares de colesterol en circulación y a pesar de no haber cambios significativos en los niveles de anticuerpos anti-oxLDL.

Colectivamente, estos resultados identifican un papel hasta ahora inesperado de las células B en la dirección del desarrollo de la aterosclerosis a través de la modulación de la activación de células T y la producción de citoquinas. Los presentes resultados pueden parecer ir en contra de estudios previos que muestran que tanto la deficiencia de μ MT como la esplenectomía aceleran la aterosclerosis en ratones. Sin embargo, estos estudios no abordan directamente el papel del agotamiento de células B maduras en la aterosclerosis en ratones inmunocompetentes. Otras diversas disfunciones de inmunocitos concomitantes pueden haber contribuido a un incremento del desarrollo de lesiones en animales con deficiencia de μ MT. Además, la limitación notificada de la aceleración de la aterosclerosis en ratones esplenectomizados después de reconstitución con células B purificadas podría haber sido confundida por la reducción significativa de los niveles de colesterol en plasma en ratones reconstituidos con células B y podría no ser atribuida selectivamente a células B ya que la reconstitución de células T también dio como resultado una ateroprotección. Por último se ha de señalar que, aunque el agotamiento de células B ha limitado significativamente el desarrollo de lesiones en los presentes estudios, los papeles de subtipos específicos de células B en la dirección o el control de la aterosclerosis merece una investigación más exhaustiva. Más particularmente, será importante abordar los papeles respectivos de células B reguladoras frente a células B no reguladoras en estos procesos.

En conclusión, los inventores proporcionan una prueba sólida de que el agotamiento de células B maduras reduce el desarrollo de aterosclerosis en ratones. Estos resultados ponen en duda el paradigma de que la función general de las células B es ateroprotectora y muestran que un papel principal de las células B en la aterosclerosis consiste en dirigir la activación de células T hacia un aumento de la respuesta inmunitaria de Th1 proaterogénica y una producción limitada de IL-17 ateroprotectora. Aunque en las etapas tempranas de la aterosclerosis se puede detectar una infiltración vascular de células B limitada, la acumulación de células B aumenta sustancialmente con el tiempo dentro y alrededor de lesiones coronarias ateroscleróticas avanzadas y aneurismas aórticos abdominales ateroscleróticos, tanto en ratones como en humanos, y es incluso prominente en inflamaciones vasculares asociadas con otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario. La inhibición de una activación excesiva de células B a través de agotamiento o inmunomodulación puede limitar sustancialmente la inflamación vascular y el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

Métodos

Animales. Todos los ratones se basaban en la variedad C57B1/6. Los ratones *Apoe*^{-/-} eran machos de 10 semanas de edad mantenidos con una dieta *chow* durante 12 semanas o sometidos a una dieta occidental (20% grasa, 0,15% colesterol, 0% colato) durante 6 o durante 12 semanas. Los ratones *Ldlr*^{-/-} eran machos de 10 semanas de edad sometidos a una dieta occidental durante 6 semanas. A las 10 semanas de edad, los ratones fueron tratados por vía intraperitoneal (i.p.) con un anticuerpo CD20 monoclonal de ratón previamente validado (Uchida et al., *Int Immunol*, 2004; Uchida et al., *J Exp Med*, 2004) o con una IgG de control (200 μ g cada 3 semanas), durante 6 o durante 12 semanas. En algunos experimentos, los ratones recibieron una inyección i.p. de anticuerpo específico anti-IL-17A neutralizador purificado (200 μ g/ratón, dos veces por semana) (Uytenhove et al., 2006 y 2007; Wang et al., 2009) o de IgG de control durante 6 semanas. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices veterinarias francesas y las formuladas por la Comunidad Europea para el uso de animales en experimentación (L358-86/609CEE), y fueron aprobados por la institución Inserm de los inventores.

Extensión y composición de lesiones ateroscleróticas. La cuantificación del tamaño y la composición de las lesiones se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente (Taleb et al., 2007).

Recuperación y purificación de células, cultivo, proliferación y ensayos de citoquinas. Unas células CD11c⁺ y CD4⁺ se purificaron y procesaron para ensayos de proliferación celular y producción de citoquinas tal como se ha descrito anteriormente de forma detallada (Taleb et al., 2007). Las producciones de IL-17 e IFN- γ en los sobrenadantes se midieron utilizando ELISA específicos (BD Biosciences y R&D Systems).

5 *Citometría de flujo.* Anti-CD3 ϵ conjugado con APC (145-2C11), anti-CD4 conjugado con FITC- o PE-Cy7 (RM4-5), anti-CD25 conjugado con APC (PC61.5), anti-CD69 conjugado con PE (H1.2F3), anti-IgM conjugado con APC (II/41), anti-CD86 conjugado con FITC (GLI), anti-CD80 conjugado con PE (16-10A1), anti-CD40 conjugado con APC (1C10), anti-CD11c conjugado con PE-Cy7 (N418), anti-CD11b conjugado con PE-Cy7 (M 1/70) y anti-CD45R conjugado con PE (B220)(RA3-6B2) eran de eBioscience. Anti-CD5 conjugado con FITC (53-7.3), anti-CD44 conjugado con biotina seguido por estreptavidina conjugada con APC, anti-CD45R conjugado con APC-Cy7 (B220) (RA3-6B2), anti-IFN γ conjugado con APC (XMG1.2) y anti-IL17A conjugado con PE (TC11-18H10) eran de BD Biosciences. Para la tinción de sangre, los eritrocitos se sometieron a lisis utilizando solución de lisis BD FACS (BD Biosciences). Para la tinción de citoquinas intracelulares, los linfocitos se estimularon *in vitro* con cóctel de activación de leucocitos (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante durante 4 horas. Antes de la permeabilización se llevó a cabo una tinción superficial utilizando un *kit* de tinción intracelular (eBioscience). Se emplearon una dispersión directa (FSC) y una dispersión lateral (SSC) para dar entrada a células vivas excluyendo eritrocitos, residuos y agregados celulares en poblaciones totales de esplenocitos, nodos linfáticos, médula ósea y peritoneo. Las células se analizaron utilizando un citómetro analítico BD Cantoll o BD LSRII (Becton Dickinson).

15 *Marcado con bromodeoxiuridina (BrdU) y análisis celular.* El marcado con BrdU se llevó a cabo tal como se ha descrito anteriormente (Fisson et al., 2007). Unas bombas miniosmóticas (ALZET1007D; Charles River Laboratories), que suministraban 1,2 mg de BrdU al día (Sigma-Aldrich) durante 7 días, fueron trasplantadas a ratones subcutáneamente bajo anestesia con isoflurano una semana antes del sacrificio. Las células de nodos linfáticos y los esplenocitos se tiñeron con un anti-CD4 conjugado con PE-Cy7 (RM4-5) y un anti-CD25 conjugado con APC (PC61.5). La detección de BrdU se llevó a cabo utilizando el *kit* FITC BrdU Flow (BD Pharmingen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se analizaron utilizando un citómetro analítico BD Cantoll o BD LSRII (Becton Dickinson).

25 *Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa.* La PCR en tiempo real cuantitativa se llevó a cabo en un ABI prizm 7700 por triplicado. Para normalizar la expresión genética se utilizó CT para GAPDH. La PCR en tiempo real cuantitativa se llevó a cabo para las siguientes proteínas: IL10, TGF- β e IFN- γ .

Determinación de anticuerpos en circulación. Los títulos de anticuerpos específicos para antígenos dados en plasma se determinaron mediante ELISA quimioluminiscente tal como se ha descrito anteriormente (Friguet et al., 1985; Binder et al., 2003; Chou et al., 2009).

30 *Análisis estadístico.* Los valores se expresan como valores medios \pm e.e.m. Las diferencias entre valores se examinaron utilizando pruebas no paramétricas de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis y se consideraban significativas en caso de $P < 0,05$.

Ejemplo 2: El agotamiento de células B está asociado con un aumento del acortamiento fraccional en un modelo de infarto de miocardio

35 En ratones C57BL6J macho de 8 semanas de edad se indujo un infarto de miocardio mediante ligación de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Una hora después de la lesión isquémica miocárdica, los ratones fueron tratados o no mediante inyección peritoneal de un anticuerpo CD20 monoclonal de ratón (160 μ g). Los inventores mostraron que las células B se infiltraron en el área de infarto. Los niveles de células B se analizaron mediante citometría de flujo los días 1, 3, 7 y 14 después del infarto de miocardio. El porcentaje de IgM + B220 + células B se había reducido notablemente después del tratamiento con anticuerpo CD20. Los ratones fueron sacrificados el día 40 14 después del infarto de miocardio y la función cardíaca se midió mediante ecocardiografía (Figura 14). Este tratamiento estaba asociado con un aumento de acortamiento fraccional, lo que sugiere que dicho tratamiento puede ser beneficioso para el tratamiento del infarto de miocardio.

Ejemplo 3: Efectos del agotamiento de células B en el aneurisma aórtico abdominal

45 En primer lugar, los inventores utilizan un modelo de formación de aneurisma de ratón validado. Los ratones Apoe $^{-/-}$ alimentados con una dieta *chow* o una dieta rica en materia grasa desarrollan un aneurisma aórtico abdominal cuando son sometidos a infusión con angiotensina (Ang) II durante 28 días (Daugherty A et al, 2000). Este modelo reproduce la acumulación de células inflamatorias, incluyendo células B, dentro y alrededor del vaso aneurismático.

50 Para unos resultados más precisos, los inventores también pueden utilizar un nuevo modelo de aneurisma aórtico con una alta incidencia de ruptura de aneurisma, descrito en la solicitud de patente WO2009056419. El modelo utiliza ratones Apoe $^{+/+}$ o Apoe $^{-/-}$, y asocia tanto la infusión de AngII como la neutralización de la actividad de TGF- β , dos factores con una alta relevancia para la enfermedad humana. En este modelo, la neutralización sistémica de la actividad de TGF- β conduce a un aumento notable e inesperado de la susceptibilidad de estos ratones al aneurisma aórtico inducido por AngII (92,5%), y a un alto nivel de mortalidad por disección y ruptura aórtica (65%).

55 El agotamiento de células B utilizando mAb anti-CD20 se iniciará en el momento de la inducción de aneurisma con el fin de evaluar su efecto en el desarrollo de aneurismas. Una primera infusión de 200 μ g i.p. se realiza una hora después de la inducción del aneurisma y una segunda dos semanas más tarde.

Los ratones son sacrificados cuatro semanas después. Se evalúan el aneurisma aórtico abdominal y la respuesta inmunitaria, y se realiza una ecografía.

Referencias

5 A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente descripción. Las descripciones de estas referencias se incorporan por referencia en la presente descripción.

Binder, C.J. et al. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med* 9, 736-43 (2003).

Binder, C.J. et al. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest* 114, 427-37 (2004).

Caligiuri, G., Nicoletti, A., Poirier, B. & Hansson, G.K. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 109, 745-53 (2002).

Chou, M.Y. et al. Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest* 119, 1335-49 (2009).

Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000;105:1605-1612.

Fisson, S. et al. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198, 737-46 (2003).

Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L. & Goldberg, M.E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 77, 305-19 (1985).

Karvonen, J., Paivansalo, M., Kesaniemi, Y.A. & Horkko, S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation* 108, 2107-12 (2003).

Major, A.S., Fazio, S. & Linton, M.F. B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1892-8 (2002).

Miller, A.M. et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 205, 339-46 (2008).

Roman, M.J. et al. Prevalence and relation to risk factors of carotid atherosclerosis and left ventricular hypertrophy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Cardiol* 87, 663-6, A11 (2001).

Shaw, P.X. et al. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity [see comments]. *J Clin Invest* 105, 1731-40 (2000).

Taleb, S. et al. Defective Leptin/Leptin Receptor Signaling Improves Regulatory T Cell Immune Response and Protects Mice From Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007).

Tsimikas, S. et al. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *J Lipid Res* 48, 425-33 (2007).

Uchida, J. et al. Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol* 16, 119-29 (2004).

Uchida, J. et al. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 199, 1659-69 (2004).

Uyttenhove, C. & Van Snick, J. Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 36, 2868-74 (2006).

Uyttenhove, C., Sommereyns, C., Theate, I., Michiels, T. & Van Snick, J. Anti-IL-17A autovaccination prevents clinical and histological manifestations of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 1110, 330-6 (2007).

Wang, Y. et al. A critical unsuspected role for TGF-beta activity in the protection against aortic aneurysm formation and complications in adult mice. Under Revision (2009).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD20 para utilizarlo en el tratamiento o la prevención del infarto de miocardio.
2. Un anticuerpo anti-CD20 para utilizarlo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-CD20 es rituximab.

5

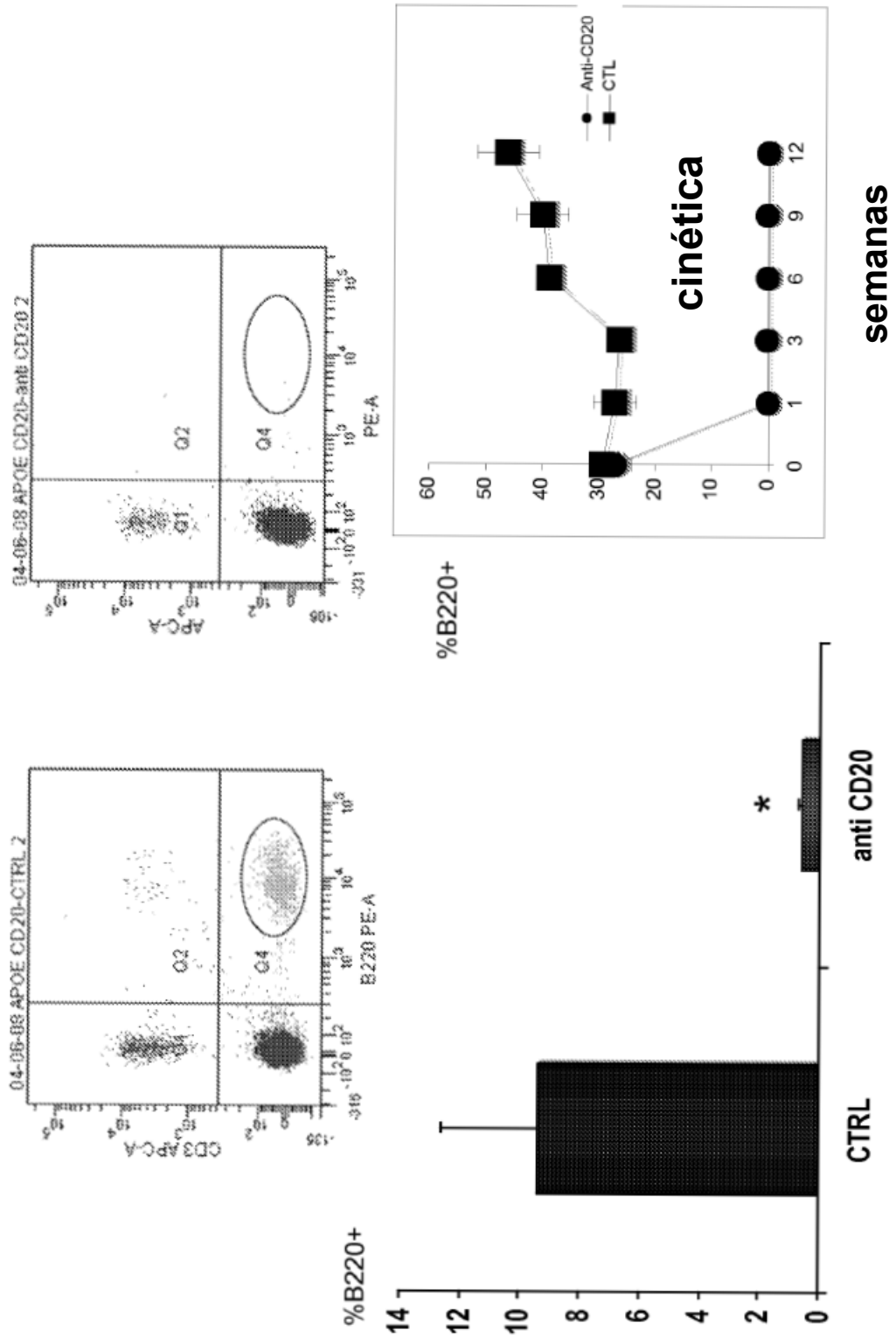


Figura 1

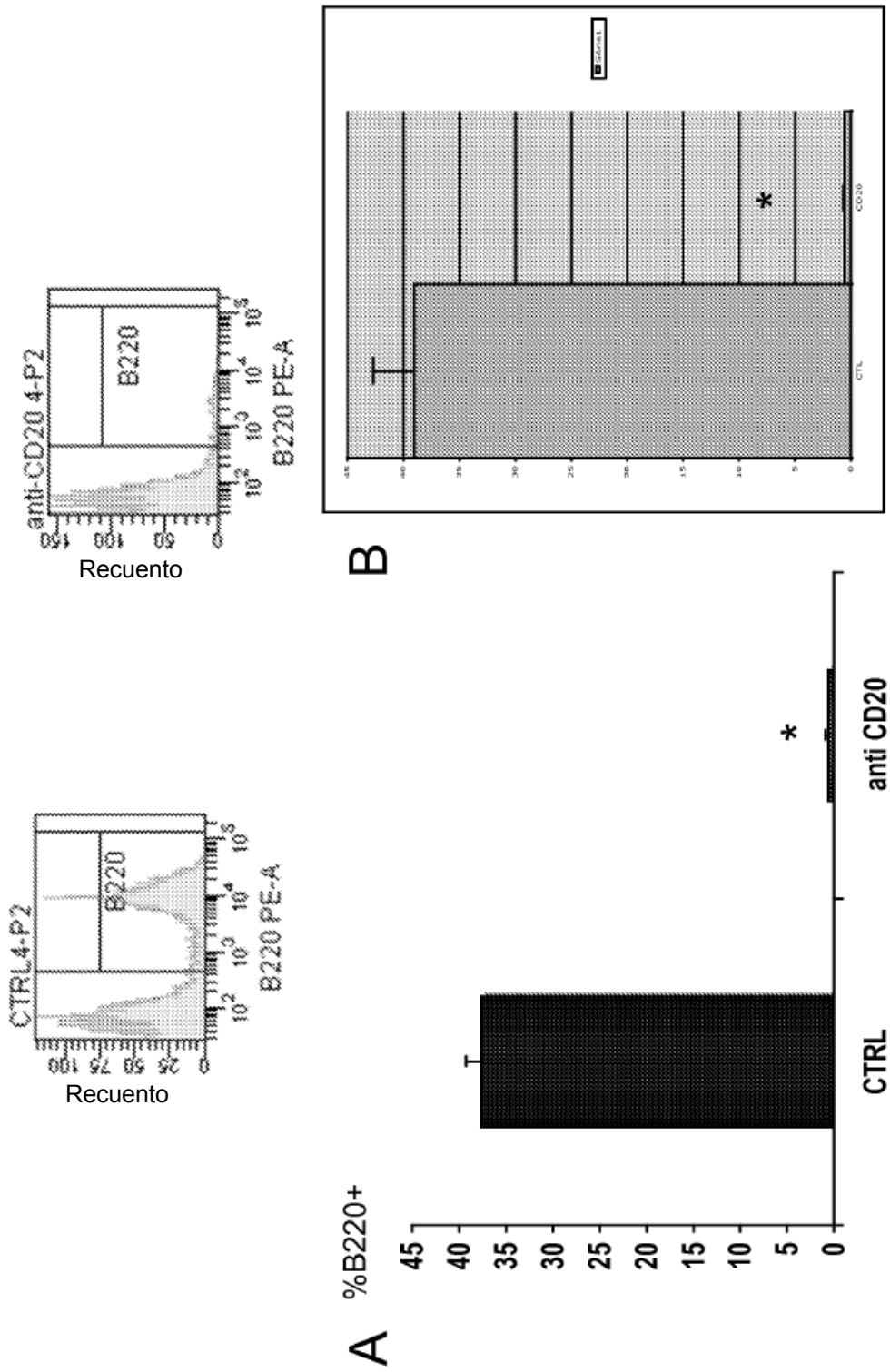


Figura 2

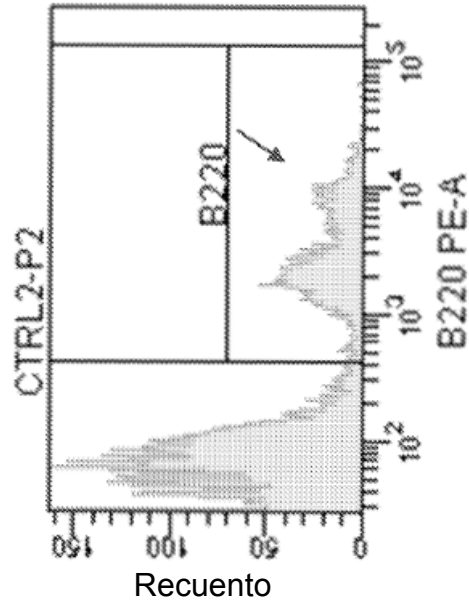
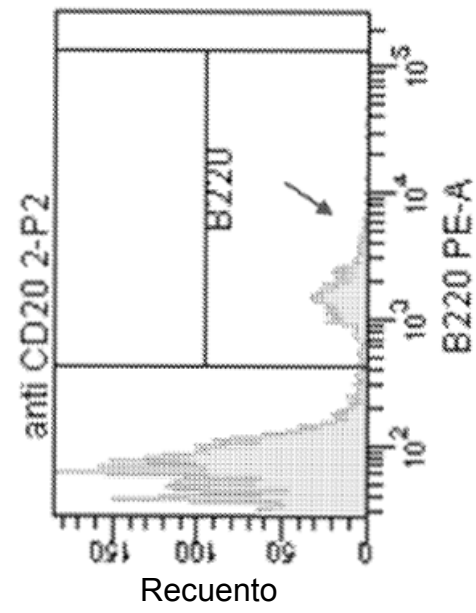


Figura 3

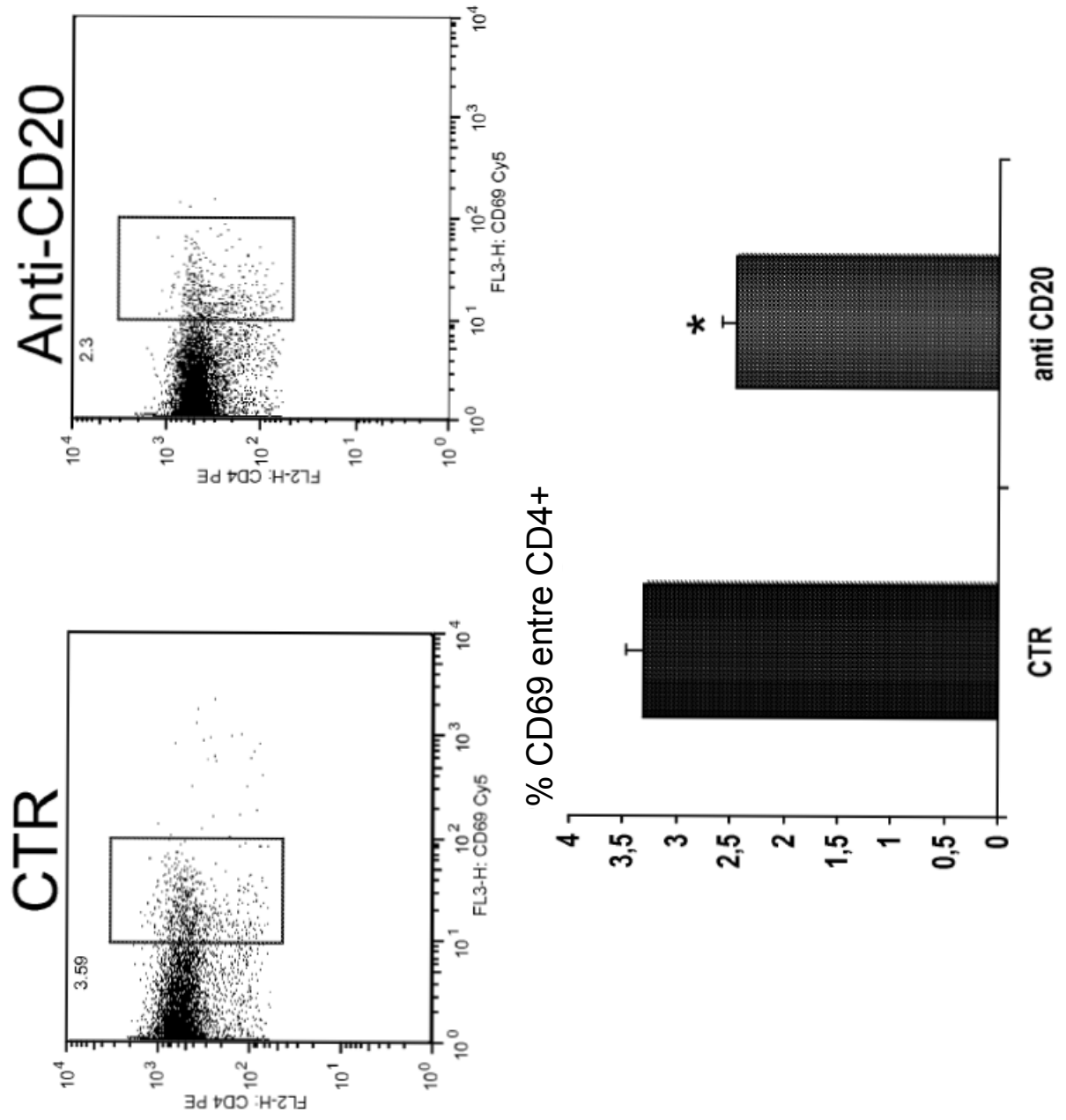


Figura 4

% CD44alto entre CD4+

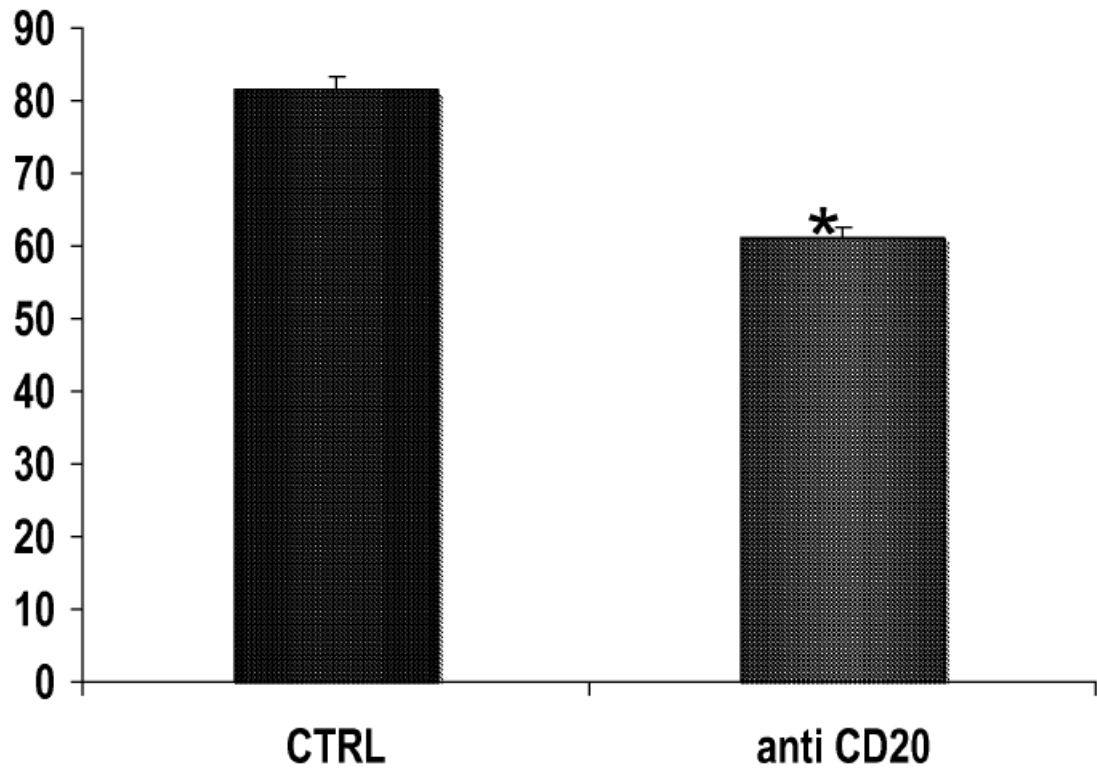


Figura 5

% BrdU entre CD4+CD25-

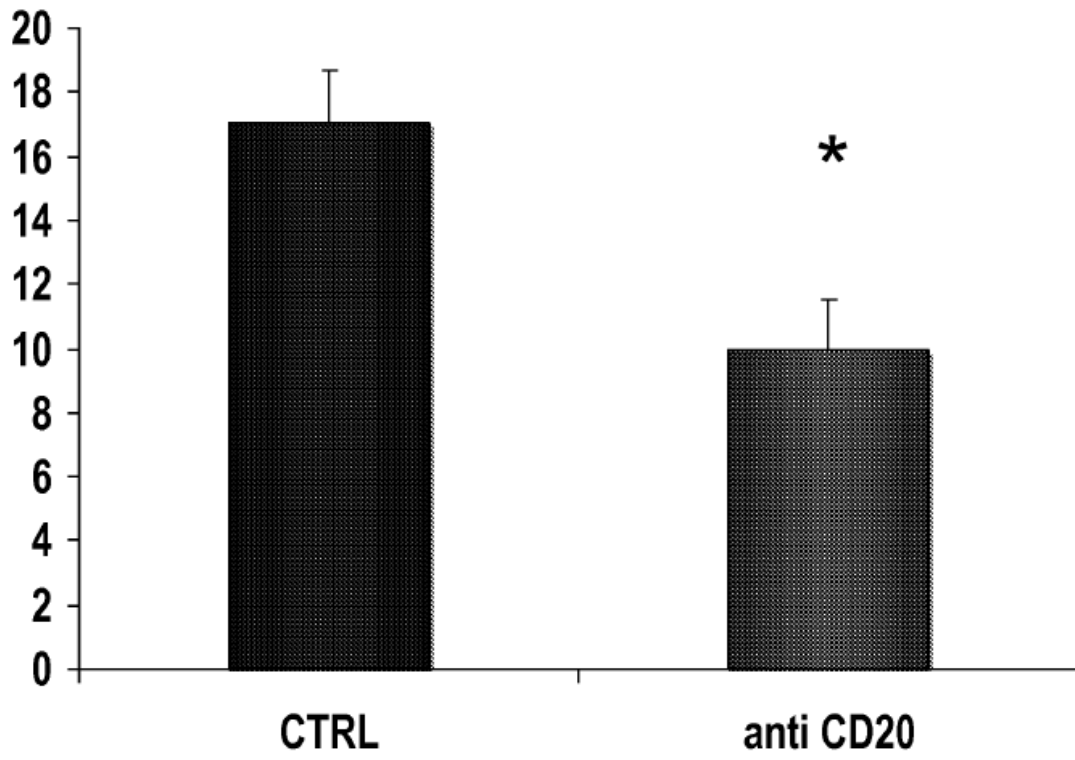
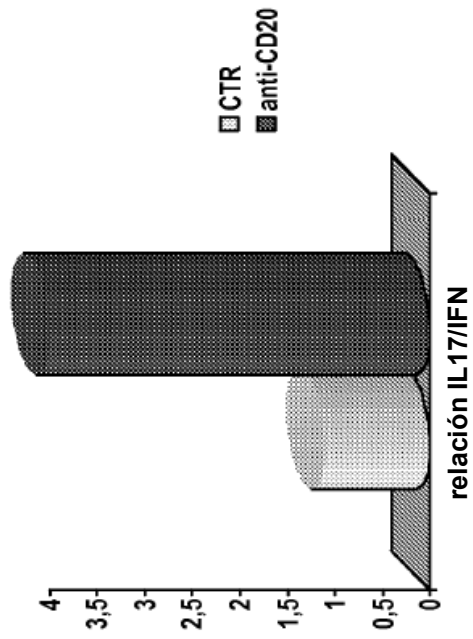


Figura 6

CD4+ DC

6 de junio de 2008



7 de junio de 2008

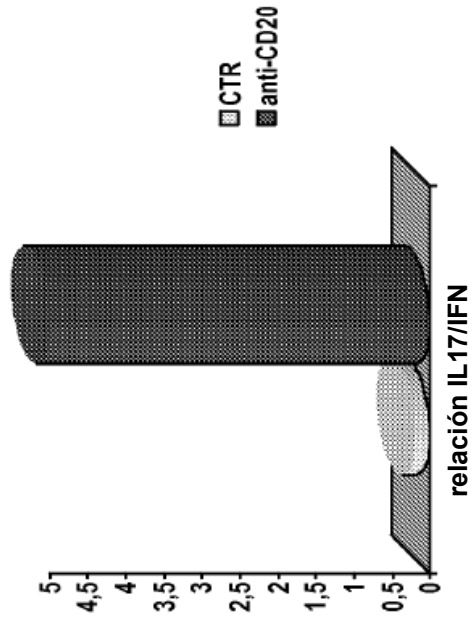
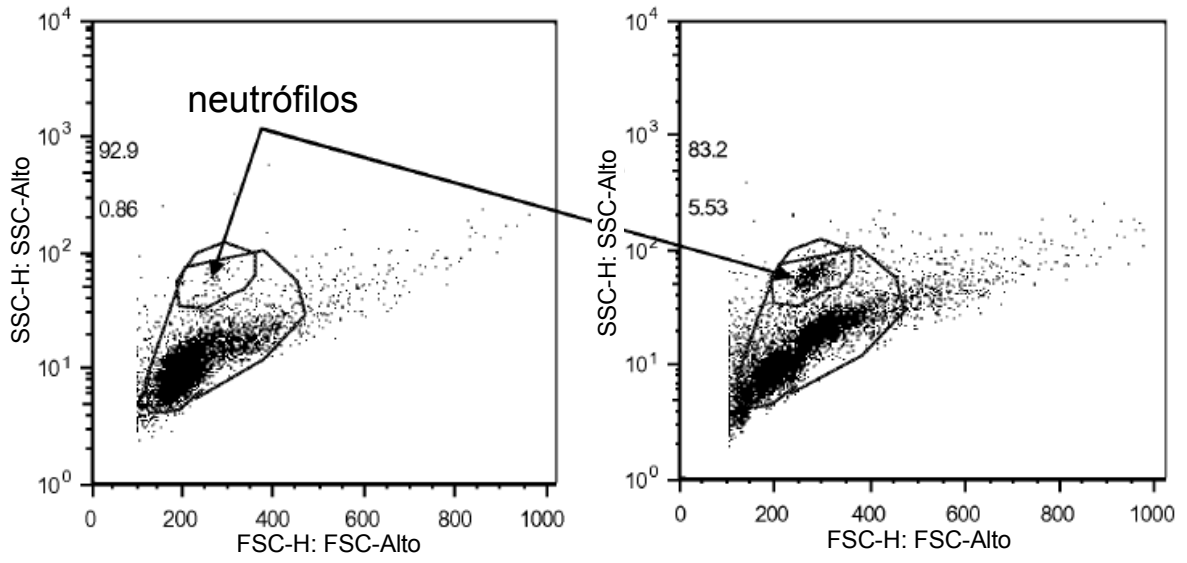
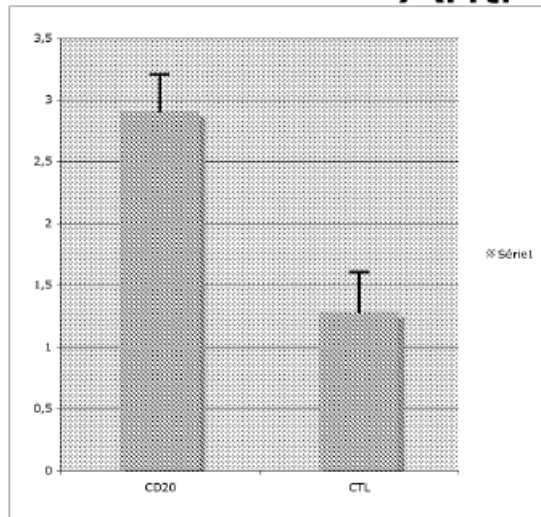


Figura 7



CTL

Anti-CD20



monocitos

Figura 8

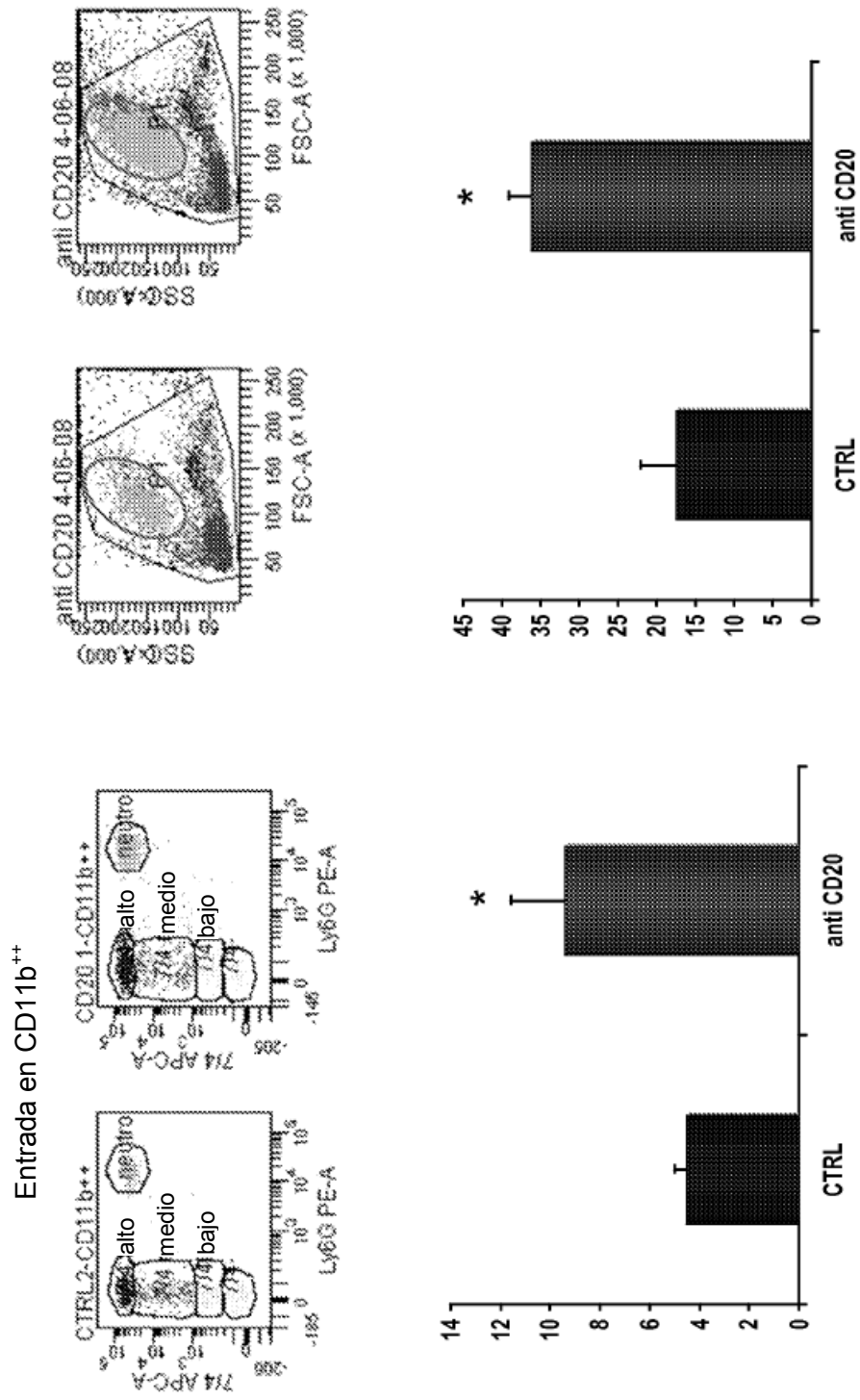


Figura 9

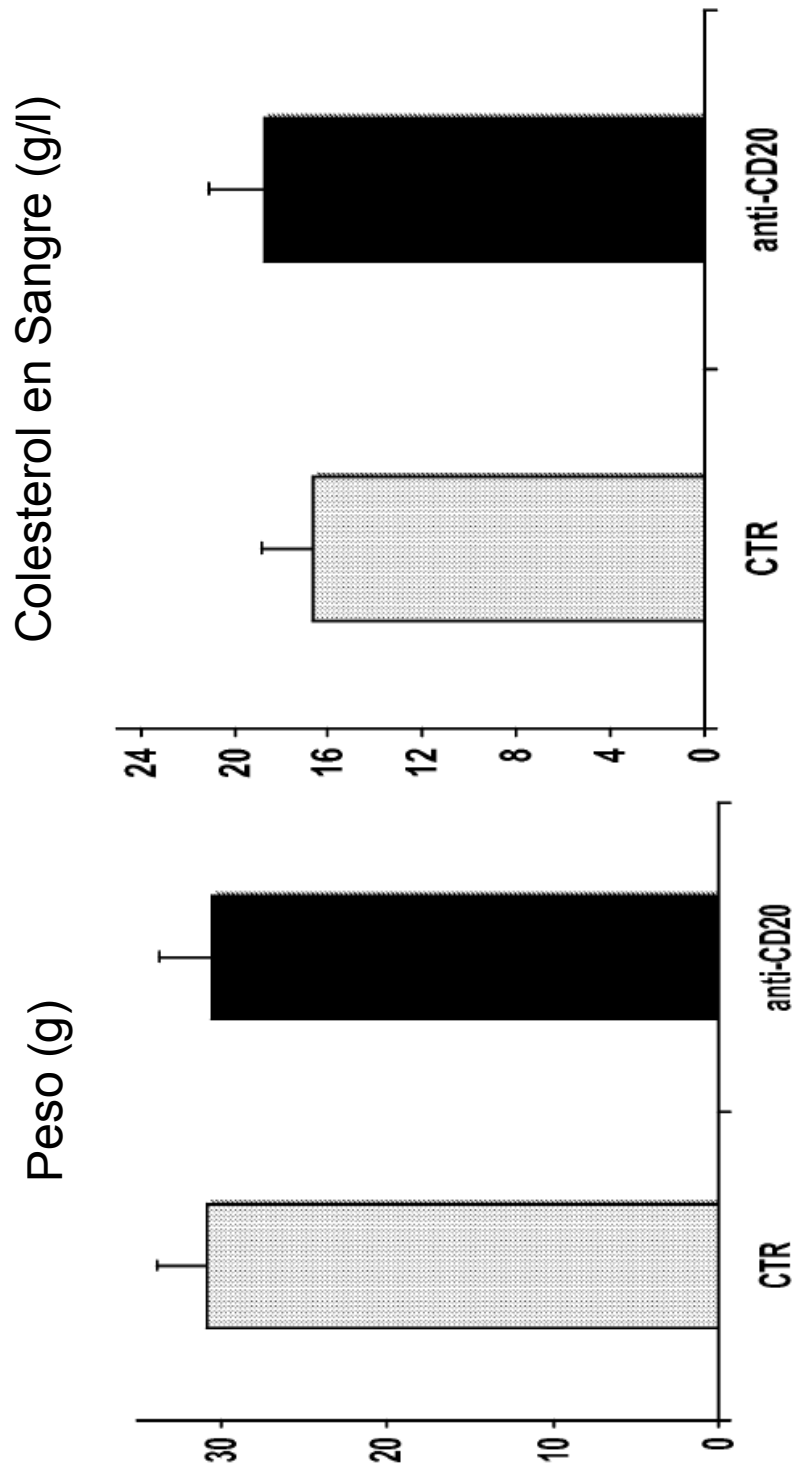


Figura 10

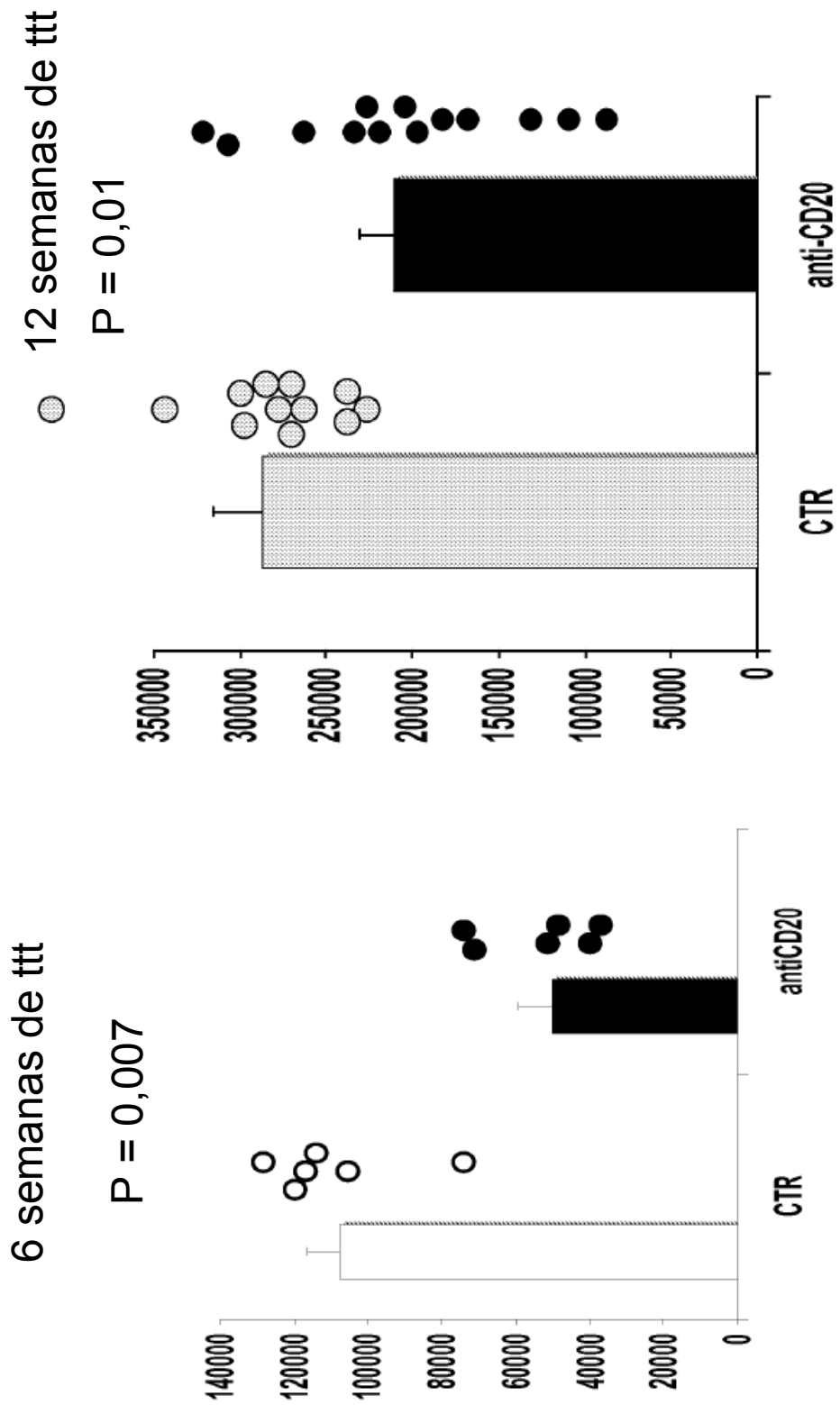


Figura 11

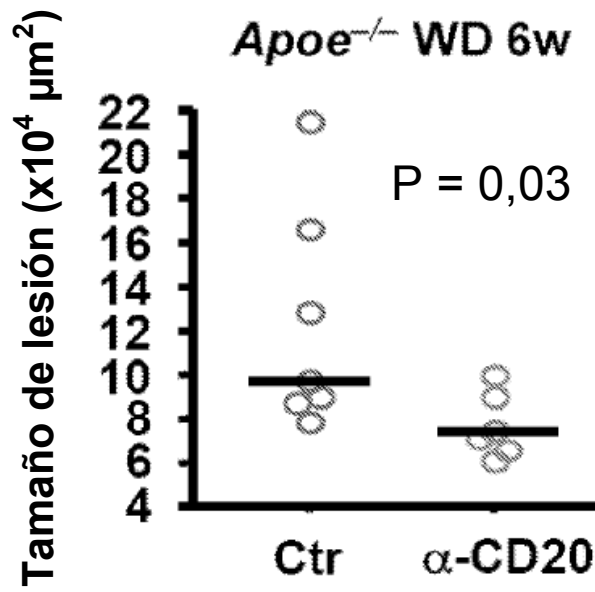


Figura 12A

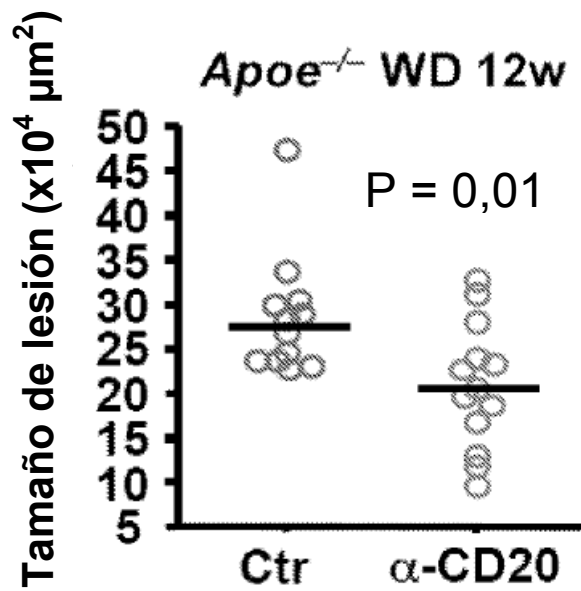


Figura 12B

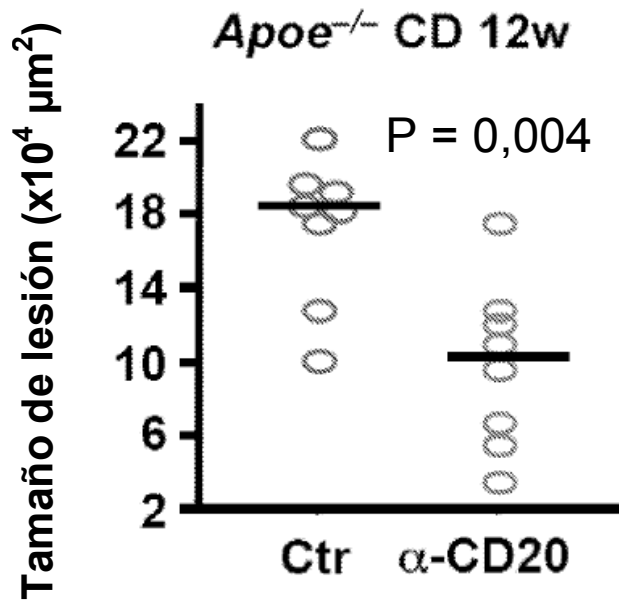


Figura 12C

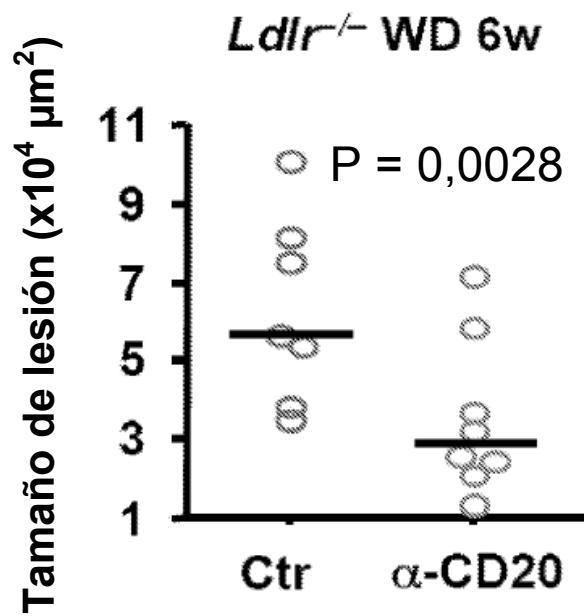


Figura 12D

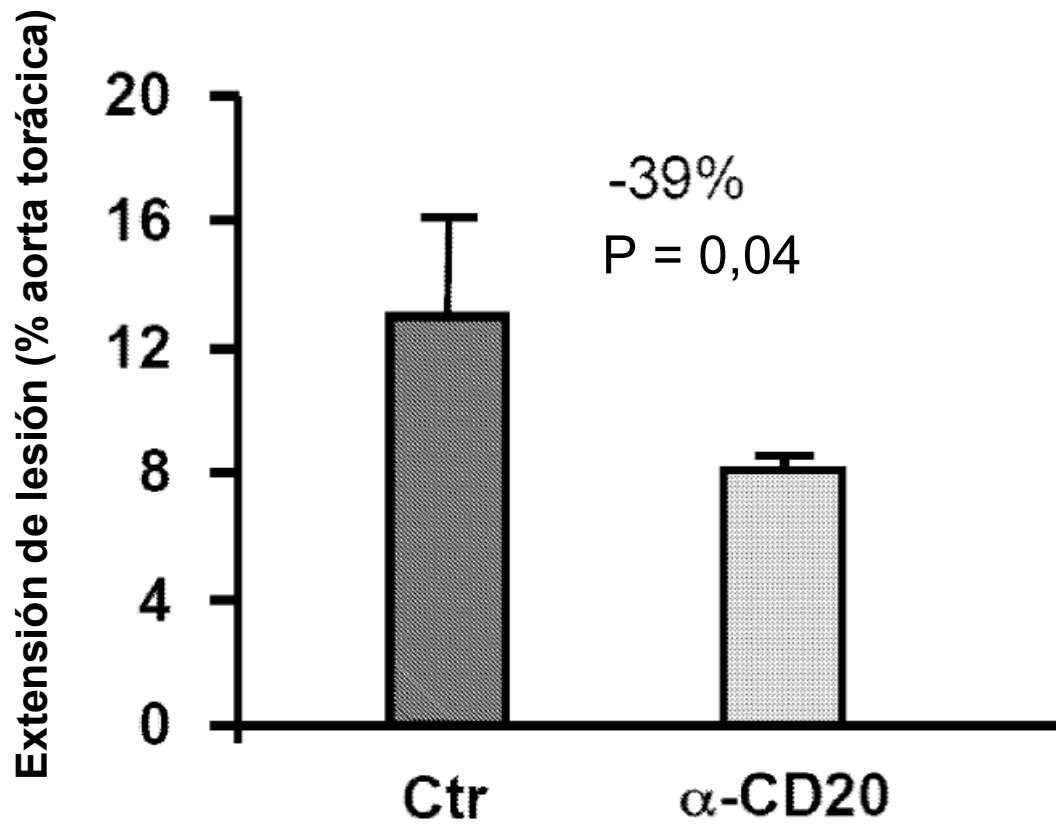


Figura 13

***Análisis ecocardiográfico el día 14
después de infarto de miocardio***

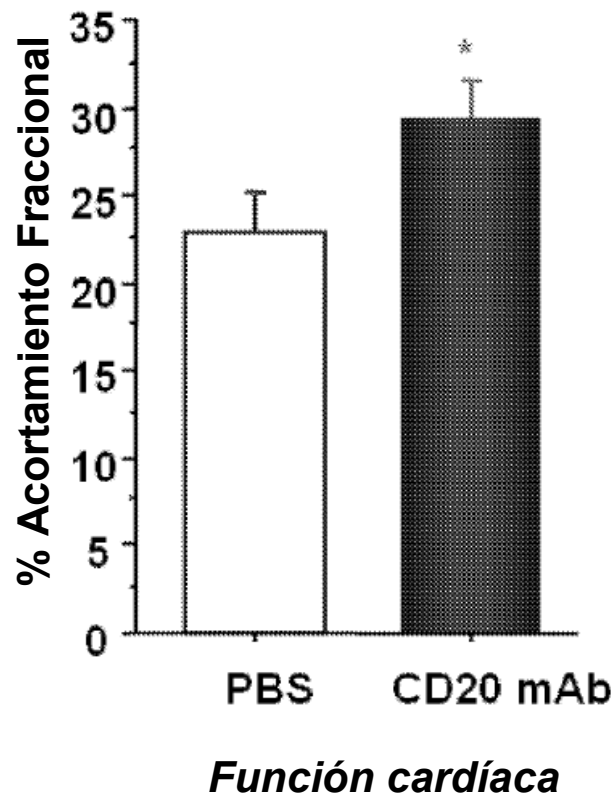


Figura 14