

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 267**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2009 PCT/US2009/066715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009 E 09768576 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2367849**

54 Título: **Método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

05.12.2008 US 120121 P

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**ALS THERAPY DEVELOPMENT INSTITUTE
(100.0%)
300 Technology Square Suite 400
Cambridge, Massachusetts 02139-3520, US**

72 Inventor/es:

**PERRIN, STEVEN;
VIEIRA, FERNANDO;
GILL, ALAN y
LINCECUM, JOHN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 650 267 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

Método para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto para su uso en el tratamiento de esclerosis lateral amiotrófica.

Antecedentes

10

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA), algunas veces llamada enfermedad de Lou Gehrig, es un trastorno neurológico letal progresivo caracterizado por la atrofia de fibras musculares resultante de la degeneración de neuronas motoras en la columna vertebral y el cerebro. La ELA afecta a aproximadamente 30.000 ciudadanos estadounidenses, estando solo aproximadamente el 10 % de los casos clasificados como la forma familiar de la ELA. En un subconjunto de pacientes familiares con mutaciones en la enzima metabólica superóxido dismutasa 1 (SOD1), la progresión patológica puede atribuirse a un aumento desconocido de la función asociado a una forma mutante de la enzima (dependiente de SOD1) (Rosen, 1993). Sin embargo en la mayoría de los casos de ELA, el gen SOD1 no contiene mutaciones, la actividad de la enzima SOD1 es normal, y el mecanismo de la patología de enfermedad es desconocido (independiente de SOD1). Por tanto, el 90 % restante de los pacientes con ELA se clasifican como casos esporádicos con componente genético o agente causal no bien caracterizado.

15

20

Debido a que la causa de la forma que se produce esporádicamente de la enfermedad es desconocida, los investigadores han recurrido a estrategias transgénicas para crear modelos de laboratorio de la enfermedad. La función de identificación del gen SOD1 ha conducido a una generación de modelos de roedor transgénico de ELA.

25

Una cepa de ratón transgénico que lleva 23 copias del transgén SOD1^{G93A} humano (el ratón "G93A") es el modelo murino de ELA más ampliamente usado y está aceptado como un modelo estándar para estudios terapéuticos de ELA (el ratón "G93A") (véanse Tu PH et. al. (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93:3155-3160 y Gurney ME (1997) J Neuro Sci 152 Suppl 1: S67-S73).

30

Aunque la ELA se caracteriza por la pérdida de neuronas motoras en la médula espinal produciendo atrofia muscular, la enfermedad también se manifiesta por sí misma con cambios en el transporte de axones, agregación de proteínas, excitotoxicidad, astrocitosis, disfunción mitocondrial, activación de la microglía y remodelación sináptica.

35

La activación de la microglía, astrocitosis y la presencia de células inflamatorias infiltrantes de la periferia ha sido bien descrita. Hay acumulación de depósitos inmunorreactivos de IgG en la médula espinal de pacientes con ELA, infiltración de linfocitos, células dendríticas, monocitos y macrófagos en la médula espinal en ELA. Aunque la función de células inmunitarias infiltrantes es poco entendida, trabajo reciente sugeriría que las poblaciones de linfocitos T infiltrantes son neuroprotectoras y no citotóxicas. Aunque la ELA tiene un componente inmunitario mediado por la activación de la microglía y astrocitos, no se considera que sea un trastorno autoinmunitario. A diferencia de enfermedades tales como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico en las que se ha descrito la participación de vías moduladoras inmunitarias específicas (por ejemplo, la vía coestimulante), la participación de tales vías no ha sido descrita para ELA.

40

45

Actualmente, los médicos han limitado las elecciones para tratar ELA. En este momento, riluzol es el único fármaco que ha sido autorizado por la FDA para el tratamiento de ELA. En ensayos clínicos, el riluzol ha mostrado solo un ligero beneficio en aumentar modestamente el tiempo de supervivencia. Así, hay una necesidad urgente de terapias eficaces para ELA. El documento WO2006/138316 desveló un método de tratamiento de un trastorno neurológico por administración de un agente inmunomodulador e inyección de una molécula terapéutica en un tejido inervado de un sujeto en el que el trastorno neurológico es ELA y el agente inmunomodulador es el anticuerpo monoclonal contra CD40L MR1.

50

Breve sumario

55

Según la presente divulgación, se proporciona un compuesto que bloquea las interacciones de CD40 y CD40L para su uso en el tratamiento de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, en el que el compuesto es un anticuerpo anti-CD40L, administrándose dicho compuesto solo.

Breve descripción de los dibujos

60

Las Figuras 1A-P representan los cambios temporales en los patrones de expresión de ARN de genes asociados a inducción de la vía coestimulante en la médula espinal y el músculo gastrocnemio del modelo de ratón G93A.

La Figura 2 muestra los resultados de un análisis de macrófago de infiltración de células en músculo gastrocnemio de ratones no transgénicos y G93A en los días 60 y 110.

65

La Figura 3A muestra la concentración de MR1 con el tiempo usando un eje de concentración lineal (Y).

La Figura 3B muestra la concentración de MR1 con el tiempo usando un eje de concentración logarítmica (Y).

La Figura 4 es un gráfico de las mediciones de peso corporal medio a partir del día 40 hasta la obtención del peso corporal pico para el grupo de control y de tratamiento.

La Figura 5 representa las mediciones de peso corporal diario medio desde el peso corporal pico hasta la muerte para los grupos de control y de tratamiento.

5 La Figura 6 representa el tiempo hasta la aparición de enfermedad basándose en el tiempo hasta el progreso a una puntuación neurológica de 2 desde el inicio del estudio.

La Figura 7 es un gráfico que representa la mediana de la edad (eje x) a la que a cada grupo se le dio una puntuación neurológica 0 a 4, además del número de días que cada grupo fue estable a una puntuación dada (eje y)

10 La Figura 8 muestra una representación de supervivencia de Kaplan Meier para los grupos de control y de tratamiento como se calcula por un modelo de riesgo proporcional de Cox.

La Figura 9A es un gráfico de las mediciones de peso corporal diario medio a partir del día 40 hasta la obtención del peso corporal pico para el grupo de control y el grupo tratado con MR1.

15 La Figura 9B es un gráfico que representa las mediciones de peso corporal diario medio desde el peso corporal pico hasta la muerte para el grupo de control y el grupo tratado con MR1.

La Figura 9C muestra el tiempo hasta la aparición de enfermedad basándose en el tiempo hasta el progreso a una puntuación neurológica de 2 en el grupo de control y el grupo tratado con MR1.

La Figura 9D muestra las mediciones de peso corporal diario medio desde el peso corporal pico hasta la muerte para el control y el grupo tratado con MR1.

20 Descripción detallada

I. Introducción

25 La presente divulgación describe un compuesto que bloquea la interacción de CD40 y CD40L para su uso en el tratamiento de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, en el que el compuesto es un anticuerpo anti-CD40L, administrándose dicho compuesto solo.

II. Abreviaturas y definiciones

30 Se usan las siguientes abreviaturas en el presente documento: esclerosis lateral amiotrófica (ELA); super óxido dismutasas-1 (*SOD1*); receptor de linfocitos T (TCR); complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); célula presentadora de antígenos (APC); solución salina tamponada con fosfato (PBS), regiones determinantes de la complementariedad (CDR). "IP" significa por vía intraperitoneal e "IV" significa por vía intravenosa.

35 MR1 es un anticuerpo monoclonal de hámster que se une al ligando de CD40 de ratón. "No mutado", como se usa en el presente documento, significa un ratón no transgénico. Como se usa en el presente documento, "molécula pequeña" significa un compuesto que tiene un peso molecular inferior a 2000 Daltons. "Tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente documento, incluye tratamiento profiláctico y terapéutico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para inhibir, o permitir una mejora en el trastorno o la afección que está tratándose, con administrado solo o tratamiento en un sujeto particular o población de sujetos. "ALS-TDI" es una abreviatura para el Instituto de Desarrollo de Terapias para ELA. El "modelo de ratón preclínico hSODIG93A", "modelo de ratón hSOD1G93A", "modelo de ratón preclínico G93A" y "modelo de ratón G93A" tienen el mismo significado que se usa en el presente documento. "Ratón hSOD1G93A" y "ratón G93A" tienen el mismo significado que se usa en el presente documento.

II. Evaluación *in vivo* de compuestos

50 Los compuestos usados en los métodos de la presente divulgación pueden evaluarse para su eficacia usando el modelo de ratón G93A [véase Tu PH et al. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:3155-60 y Gurney ME. et al. J Neurol Sci 1997;152(Suppl 1):S67-73]. Este modelo se construyó insertando 23 copias del gen *SOD1* humano, que contiene una mutación de glicina a alanina en la posición 93, en el genoma de ratón. Estos ratones resumen con exactitud la mayoría de los principales puntos de la patología de las formas esporádica y familiar humanas de la enfermedad, haciendo de este modelo la mejor opción actualmente disponible para probar las intervenciones que afectan la enfermedad.

60 No hay expresión fenotípica perceptible de la anomalía en el ratón G93A al nacer. Los signos de enfermedad visibles no se expresan hasta aproximadamente los 90 días de edad, tras lo cual experimenta una pérdida progresiva de la función de las patas traseras, produciendo parálisis completa y muerte aproximadamente a los 134 días de edad. Aunque se produce atrofia muscular progresiva por la muerte o disfunción de neuronas motoras, la muerte de estas células está asociada con y es parcialmente producida por interacciones con células circundantes que incluyen microglía y astrocitos. Primero aparece una astrocitosis pronunciada aproximadamente a los 80 días de edad, mientras que una neuroinflamación, mediada principalmente por la microglía, aparece aproximadamente a los 100 días de edad y se prolonga hasta la muerte.

65

Aunque la enfermedad humana puede empezar en cualquier región motora, la enfermedad de ratón de forma fiable afecta las regiones cervical y lumbar primero. En el ratón G93A, los números de neuronas motoras han disminuido significativamente en el momento de la aparición de síntomas visibles, aproximadamente en el día 85, y alcanzan más del 50 % pérdida con la muerte. Se observan anomalías en el citoesqueleto, neurofilamentos, transporte axonal, golgi, retículo endoplásmico, mitocondrias, maquinaria apoptótica, proteasoma y manipulación de proteínas citosólicas en neuronas durante el transcurso de la enfermedad. Aunque la enfermedad humana puede empezar en cualquier región motora, la enfermedad de ratón de forma fiable afecta primero las regiones lumbar y sacra. En el ratón G93A, los números de neuronas motoras han disminuido significativamente en el momento de la aparición de síntomas visibles, aproximadamente en el día 85, y alcanzan más del 50 % de pérdida con la muerte. Se observan anomalías en el citoesqueleto, neurofilamentos, transporte axonal, golgi, retículo endoplásmico, mitocondria, maquinaria apoptótica, proteasoma y manipulación de proteínas citosólicas en neuronas durante el transcurso de la enfermedad.

Hasta la fecha, ha habido al menos 50 publicaciones que describen agentes terapéuticos que prolongan la esperanza de vida de este ratón. Sin embargo, ningún agente terapéutico distinto de riluzol ha mostrado eficacia clínica correspondiente. El Instituto de Desarrollo de Terapias para ELA ha descrito el cribado de fármacos terapéuticos optimizado en el modelo de ratón G93A que controla variables de ruido [Scott S. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis 2008; 9: 4-15]. Scott et al. describen un diseño mínimo del estudio para el modelo de ratón G93A que trata y gestiona el ruido producido por las variables biológicas de confusión inherentes. En la validación de este diseño del estudio, se evaluaron nueve compuestos que habían sido previamente informados por ser eficaces en el modelo preclínico y posteriormente fracasaron en ensayos clínicos humanos, principalmente a dosis variables.

Varias de estas moléculas son moléculas antiinflamatorias que inhiben la señalización del factor de necrosis tumoral (TNF) y la activación de la microglía que incluyen Celebrex®, minociclina, talidomida y creatina. Se informó que Celebrex® mejoraba la esperanza de vida en el modelo de ratón G93A el 19 % (24 días), sin embargo, un estudio de alta potencia dejó de detectar cualquier cambio en la supervivencia (1,8 días, 0,52 %), (Scott et al.). Se obtuvieron resultados similares para minociclina (previamente informado; 15,8 % de mejora; estudio de alta potencia, -0,60 %), creatina (previamente informado 17,8 %; estudio de alta potencia 0,67 %) y talidomida (previamente informado 16 % de mejora en la supervivencia; estudio de alta potencia -1,9 %).

III. Identificación de compuestos candidatos

Como se describe en detalle en el Ejemplo 1, se realizó el análisis del perfil de expresión de genoma completo para ratones no mutados y ratones G93A en diversos momentos de tiempo durante la progresión de la enfermedad. Se analizaron genes identificados como diferencialmente expresados entre los dos grupos y los datos resultantes se usaron para centrar la selección de fármacos que iban cribarse. Entre los genes que fueron diferencialmente expresados se incluyen genes implicados en la respuesta inmunitaria y la adhesión de células que incluyen CD86, CD44, ICAM, ITGAM, ITGA ITGAX, ITGB2, H2-K1 (MHC II), H2-AB1(MHC II), H2-D1 (MHCII) y H2-Eb1 (MHC II).

Estos datos muestran que las marcas inflamatorias aumentan durante la progresión de la enfermedad y están de acuerdo con la participación de la vía coestimulante. La vía coestimulante implica interacciones entre tipos de células mediante interacciones CD28/CD80 o CD28/CD86 o CD40/CD40L, algunas de las cuales se identificaron en el análisis de expresión génica.

La vía coestimulante implica, junto con otras interacciones, la unión de CD40 sobre linfocitos B a CD40L (también conocida como CD154, gp39, T-BAM, antígeno 5c8, CD40CR y TRAP) sobre linfocitos T. Se expresa CD40 humana sobre linfocitos B maduros, además de macrófagos, células dendríticas, fibroblastos y células endoteliales activadas. Se cree que el bloqueo de la unión CD40:CD40L promueve el desarrollo de respuestas de linfocitos T colaboradores de tipo I.

Usando compuestos que bloquean estas interacciones e inhiben las señales coestimulantes, un cuerpo significativo de trabajo ha demostrado los efectos inmunomoduladores de bloqueo de uno o más de CD40L, CD80 o CD86 en modelos preclínicos de trasplante y autoinmunidad. El bloquear la función de CD40L con anticuerpos bloqueantes o expresión adenoviral de CD40L-Ig mejora el trasplante de aloinjerto de 30 a 90 días. Estudios similares que bloquean CD80/CD86 sobre APC con CTLA4-Ig o expresión adenoviral de CTLA4-Ig mejoran transitoriamente la supervivencia del trasplante de injerto. El rechazo de trasplante en estos modelos es transitorio y el rechazo del injerto resulta con el tiempo. La represión a largo plazo del rechazo de trasplante puede llevarse a cabo bloqueando tanto la vía coestimulante con CTLA4-Ig como el bloqueo de la activación de CD40L de APC con anticuerpos anti-CD40L.

Anticuerpos bloqueantes para CD40L o delección genética de CD40L en ratones ha demostrado que CD40L mejora la progresión de la enfermedad, supervivencia, y marcadores de enfermedad sustitutos en modelos preclínicos de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple, artritis inducida por colágeno y lupus sistémico. El bloqueo de la unión CD40:CD40L parece reducir la capacidad de macrófagos para producir óxido nítrico, que media en muchas de las actividades pro-inflamatorias de los macrófagos.

Parece de tales estudios que el bloqueo de las interacciones CD40:CD40L puede modular respuestas inmunitarias.

Se mostró que datos inmunohistoquímicos (Ejemplo 2) se correlacionaban bien con los datos de expresión génica y estos datos identifican macrófagos como una célula presentadora de antígenos que infiltra músculo esquelético durante la progresión de la enfermedad en el ratón G93A.

Debido a que los datos de expresión genética indicaron la participación de la vía coestimulante, se evaluó la eficacia de MR1 en el modelo de G93A. MR1 se une a CD40L, bloqueando así su interacción de CD40 que participa en la vía coestimulante implicada en una respuesta inmunitaria. Se ha informado en la bibliografía que MR1 es eficaz para el tratamiento de artritis reumatoide y enfermedad injerto contra huésped, ambas de las cuales tienen un fuerte componente inmunológico. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria y la enfermedad injerto contra huésped surge cuando el cuerpo del hospedador genera una vigorosa respuesta inmunitaria contra el tejido del injerto.

Aunque la ELA tiene un componente inmunitario mediado por la activación de microglía y astrocitos, no se considera que sea un trastorno autoinmunitario. Varios fármacos antiinflamatorios dejaron de mostrar eficacia en pruebas preclínicas o clínicas que incluyen inhibidores de TNF α , Celebrex®, minociclina y talidomida. Fue, así, inesperado encontrar que MR1 mostraba eficacia en el modelo de ELA de G93A.

Según la presente divulgación, se proporciona un compuesto que bloquea la interacción de CD40 y CD40L para su uso en el tratamiento de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, en el que el compuesto es un anticuerpo anti-CD40L, administrándose dicho compuesto solo.

Los compuestos terapéuticos usados en la invención incluyen cualquier compuesto que bloquea la interacción de CD40 con CD40L, en el que el compuesto es un anticuerpo anti-CD40L. Por ejemplo, varios estudios en animales describen agentes capaces de interrumpir la unión CD40:CD40L (véanse, por ejemplo, los documentos US2005158314 y US7173046). Y, por ejemplo, se han producido y caracterizado numerosos anticuerpos anti-CD40L (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.876.950) a Bristol-Myers Squibb). Anticuerpos anti-CD40L útiles en los métodos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, MR1, un anticuerpo monoclonal de hámster disponible de Taconic (Hudson, NY) y BD Biosciences (San Jose, CA); 5c8, un anticuerpo humanizado descrito en la patente de EE.UU. N.º 5.474.771; un anticuerpo quimérico de hámster-humano, IDEC 131/E6040 es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende cadenas pesadas gamma-1 humanas y cadenas ligeras kappa humanas con CDR del clon de anticuerpo monoclonal murino 24-31, comercialmente disponible de Ancell (catálogo X 353-020, Bayport, Minn.); ABI 793; Sgn-40; ImxM90 (Immunex); ImxM91 (Immunex); ImxM92 (Immunex); y un mAb anti-CD40L comercialmente disponible de Genzyme (Cambridge, Masa., N.º de catálogo 80-3703-01). También está comercialmente disponible un mAb anti-CD40L de PharMingen (San Diego, catálogo N.º 33580D). Realizaciones según la divulgación incluyen un compuesto que bloquea la interacción de CD40 y CD40L para su uso en el tratamiento de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, en el que el compuesto es un anticuerpo anti-CD40L, administrándose dicho compuesto solo. Una realización es un compuesto que bloquea la interacción de CD40 y CD40L para su uso en el tratamiento de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, en el que el compuesto es un anticuerpo anti-CD40L, administrándose dicho compuesto solo, en el que el anticuerpo anti-CD40L está seleccionado de MR1, 5c8, IDEC 131/E6040, clon 24-31, ABI 793, ImxM90, ImxM91, ImxM92, o Sgn-40. En una realización, el anticuerpo es 5c8. En otra realización, el anticuerpo es MR1.

En algunas realizaciones, los compuestos anti-CD40L son fragmentos Fab, F(ab')₂, F(ab'), anticuerpos monocatenarios, polipéptidos, construcciones de fusión de polipéptidos y similares.

V. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Para tratar cualquiera de los trastornos anteriores, pueden formularse composiciones farmacéuticas para su uso según la presente divulgación de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables.

Vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, además de por el método particular usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de los compuestos útiles en la presente divulgación (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Gennaro et al. Eds., Lippincott Williams and Wilkins, 2000).

Formulaciones adecuadas para administración por vía oral incluyen, por ejemplo, sistemas sólidos, semi-sólidos y líquidos tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi- o nano-partículas, líquidos o polvos; pastillas para chupar (incluyendo rellenas de líquido); chicles; geles; formas de dosificación de rápida dispersión; películas; óvulos; esprays; y parches bucales/mucoadhesivos.

Formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas para inyección estéril isotónica, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la

formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores y conservantes.

Según la presente divulgación, los compuestos pueden administrarse por cualquier medio adecuado, que puede variar, dependiendo del tipo de trastorno que está tratándose y de la naturaleza del propio compuesto. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse por vía oral, por vía parenteral o tópicamente. Para proteínas tales como anticuerpos, las vías de administración incluyen preferentemente parenteral, por ejemplo, intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. Preferentemente, la dosificación parenteral se administra mediante inyección, lo más preferentemente inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. La cantidad que va a administrarse dependerá de una variedad de factores tales como los síntomas clínicos, peso del individuo y si se administran otros fármacos. Debe apreciarse que la determinación de formas de dosificación apropiadas, cantidades de dosificación y vías de administración está dentro del nivel de experiencia habitual en las ciencias farmacéuticas y médicas, y se describe más adelante.

VI. Ejemplos

Ejemplo 1

Caracterización de los mecanismos moleculares de neurodegeneración en el modelo de ratón G93A de ELA.

Con el fin de identificar vías moleculares susceptibles a desarrollo terapéutico, se caracterizaron cambios en los patrones de expresión génica durante la progresión de la enfermedad en el modelo de ratón G93A. Se estudió el perfilado transcripcional del genoma completo usando GeneChips Affymetrix GeneChip® Mouse Expression set 430vII MOE430vII. Se empleó un diseño de estudio longitudinal que comparaba músculo esquelético y médula espinal de G93A con compañeros de camada no transgénicos. En el modelo de ratón G93A, la aparición de síntomas se observa primero como parálisis de la cola empezando aproximadamente en el día 75 con parálisis progresiva en las patas traseras, luego las patas delanteras, y finalmente el diafragma. La supervivencia media de la colonia de animales G93A es 134 días. El diseño de estudio longitudinal recogió músculo de ternero (músculo gastrocnemio) y médula espinal de animales G93A y compañeros de camada no mutados en los días 30, 50, 60, 80, 90, 100, 110 y 120 (el día 0 es la fecha de nacimiento). Para cada momento de tiempo, los tejidos se recogieron de 5 animales no mutados y 5 G93A y se procesaron independientemente para un total de 160 tejidos.

Los animales se sacrificaron según protocolos de IACUC en los momentos de tiempo apropiados descritos anteriormente. Los tejidos se recogieron inmediatamente y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Los tejidos congelados se almacenaron a -80 grados Celsius. El ARN total se aisló simultáneamente de los tejidos usando el kit Qiagen RNeasy como se describe por el fabricante. Se amplificó el ARN total aislado usando amplificación lineal de T7 estándar que incorpora un nucleótido biotinilado usando el kit de transcripción *in vitro* Ambion Message AMP II T7. La sonda marcada se fragmentó y se hibridó con Affymetrix GeneChip® Mouse Expression set 430vII según el protocolo del fabricante. Se lavaron GeneChips en Affymetrix GeneChip® Fluids Station 450 para eliminar la sonda no hibridada. Se barrieron GeneChips en un escáner Affymetrix GeneChip® 3000 7G.

Se realizó todo el procesamiento computacional y modelado usando R development language versión 2.6 de Bioconductor. Se analizaron independientemente los conjuntos de datos de médula espinal y gastrocnemio. Se usaron archivos de Affymetrix CEL para todo el procesamiento previo de datos. Todos los archivos de CEL en cada conjunto de datos fueron controlados para calidad usando las viñetas de Bioconductor SIMPLE AFFY, AFFY y AFFY PLM. Se evaluaron los cambios estadísticos en la expresión génica entre tejidos de G93A y no mutados en un momento de tiempo dado usando el paquete de LIMMA. Se usó el modelo de Bayes para determinar la significancia de los cambios de expresión entre grupos.

Genes que se encontró que se expresaban diferencialmente entre los animales no mutados y G93A incluyen genes que participan en la respuesta inmunitaria y adhesión de células que incluyen CD86, CD44, ICAM, ITGAM, ITGA ITGAX, ITGB2, H2-K1 (MHC II), H2-AB1(MHC II), H2-D1 (MHCII) y H2-Eb1 (MHC II). Los perfiles de expresión normalizados por log2 de estos genes de médula espinal de ratones no mutados y G93A y gastrocnemio a 30, 50, 60, 80, 90, 100, 110 y 120 días se muestran en la Figura 1. Las Figuras 1A y 1B muestran la expresión diferencial de CD89 en médula espinal y gastrocnemio, respectivamente. Las Figuras 1C y 1D muestran la expresión diferencial de CD44 en médula espinal y gastrocnemio, respectivamente. Las Figuras 1E y 1F muestran la expresión diferencial de ICAM en médula espinal y gastrocnemio, respectivamente. Las Figuras 1g y 1H muestran la expresión diferencial de ITGAM (CD11b) en médula espinal y gastrocnemio, respectivamente. Las Figuras 1I y 1J muestran la expresión diferencial de ITGAX en médula espinal y gastrocnemio, respectivamente. Las Figuras 1K y 1L muestran la expresión diferencial de ITGB2 en médula espinal y gastrocnemio, respectivamente. La Figura 1M muestra la expresión diferencial de H2-K1 (MHC II) en médula espinal. La Figura 1N muestra la expresión diferencial de H2-AB1 (MHCII) en gastrocnemio. La Figura 1O muestra la expresión diferencial de H2-D1(MHC II) en médula espinal. La Figura 1P muestra la expresión diferencial de H2-Eb1 (MHC II) en gastrocnemio.

Estos datos muestran que distintivos inflamatorios aumentan durante la progresión de la enfermedad. Estos cambios de expresión génica reflejan la activación de células presentadoras de antígenos tales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. El bloqueo de la interacción puede mejorar las respuestas inmunitarias que agravan la progresión de la enfermedad en ELA. La vía coestimulante puede inhibirse bloqueando interacciones CD-28/CD80 o CD-28/CD86 o CD40/CD40L.

Ejemplo 2

Caracterización de células presentadoras de antígenos en músculo esquelético y el sistema nervioso periférico.

Con el fin de determinar la presencia y localización de posibles células presentadoras de antígenos en músculo gastrocnemio de animales G93A y no mutados, se realizó inmunohistoquímica en tejidos de gastrocnemio que se recogieron de ratones G93A y no mutados, en el día 110. Inmediatamente después de la recogida, los tejidos se incorporaron en OCT. Secciones congeladas se tiñeron con H&E y se hibridaron con anticuerpos contra mielina (anticuerpo anti-S100b) o anticuerpos contra linajes celulares hematopoyéticos que incluyen linfocitos T (anticuerpo anti-CD3), linfocitos B (anticuerpo contra pan linfocitos B de CD45R) y macrófagos (anticuerpo anti-CD11b). En el día 110 hubo infiltración de macrófagos CD11b positivos y los macrófagos parecen localizarse en los axones de los nervios que inervan el músculo esquelético. La localización de macrófagos no se dispersa a través del músculo completo, que sugiere que la inflamación no es debida a atrofia muscular o remodelación de fibra muscular.

Con el fin de confirmar la identidad de las células de linaje de monocito en el músculo esquelético en el día 110 y para aclarar la relevancia de estas células en comparación con animales no transgénicos, se realizó inmunohistoquímica adicional con un panel de anticuerpos específicos para el linaje de macrófagos. Se utilizó un anticuerpo anti-S100b para marcar los axones asociados a mielina que inervan el músculo esquelético. Todos los anticuerpos específicos de macrófago (anticuerpo anti-CD11b, anticuerpo anti-CD86 y anticuerpo anti-MAC1) localizaron macrófagos en los axones de nervios que inervan el músculo esquelético de ratones G93A sin macrófagos presentes en los axones de animales no mutados. La localización de macrófagos fue específica de nervios que inervan el músculo sin macrófagos presentes en miofibras en el músculo.

Los datos de expresión génica sugieren que los genes asociados a la vía coestimulante están aumentando temporalmente durante la progresión de la enfermedad tanto en médula espinal, además de en músculo esquelético (Figura 1). Con el fin de caracterizar el momento exacto de la infiltración de macrófagos en músculo esquelético, se realizó inmunohistoquímica en secciones de gastrocnemio de los días 60, 80 y 100 en ratones G93A. No hubo evidencia de infiltración de macrófagos y localización en axones en el día 60. Los macrófagos fueron evidentes en el día 80 y se localizaron en los axones que inervan el músculo como se describe previamente para músculo esquelético en el día 110. El número de macrófagos aumentó entre el día 80 y día 100 y la acumulación de macrófagos fue específica para los axones que inervan el músculo esquelético.

Con el fin de cuantificar el aumento en la infiltración de macrófagos, se hibridaron secciones representativas de 5 animales G93A y 5 no mutados con anticuerpo anti-CD86 y se contó el número de macrófagos por 10.000 micrómetros cuadrados. El número de macrófagos en los animales no mutados fue el mismo en los momentos de tiempo de 60, 80 y 110 días. Como puede apreciarse en la Figura 2, los macrófagos están acumulándose en músculo esquelético temporalmente entre los días 80 y 100 y hay muy pocos macrófagos presentes en músculo esquelético no mutado.

En resumen, los datos inmunohistoquímicos se correlacionan muy bien con los datos de expresión génica e identifican macrófagos como la célula presentadora de antígenos que infiltra músculo esquelético durante la progresión de la enfermedad en el modelo de ratón G93A. Un hallazgo inesperado es que la infiltración de macrófagos parece estar específicamente dirigida a los axones que inervan el músculo esquelético como se localiza por el marcado con anticuerpos contra mielina y macrófagos.

Ejemplo 3

Análisis farmacocinético de MR1 en tejidos de G93A

Se determinaron niveles en tejido de MR1 dirigido contra CD40L murino usando un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) no competitivo de correspondencia de matriz en el formato de sándwich. Se incluyeron siete curvas patrón de puntos en cada placa. Los patrones se prepararon usando MR1 purificado enriquecido en solución de diluyente PBS. La solución de diluyente PBS se correspondió con la matriz con el tejido de ratón normal en la dilución equivalente de las muestras desconocidas para corregir cualquier efecto no específico resultante de los lisados de tejido.

Se tomaron 84 muestras de plasma para análisis farmacocinético durante un periodo de dos semanas después de la dosificación (10 mg/kg, IP) en tanto ratones G93A hembra como macho.

La semivida de eliminación fue similar en hembras (23 d) y machos (22 d) y similar a la semivida para un anticuerpo basado en IgG2 de ratón típico en el ratón. No se observaron signos de respuesta de anticuerpos anti-hámster.

Las hembras muestran un volumen algo más pequeño de distribución para MR1 que los machos, y así muestran niveles en plasma más altos cuando se administran con la misma dosis de 10 mg/kg. Los machos muestran una eliminación más rápida y mayor volumen de distribución. Así, para obtener niveles en plasma similares, los machos requerirían una mayor dosis. La Figura 3A muestra la concentración de MR1 con el tiempo usando un eje de concentración lineal (Y). La Figura 3B muestra concentración de MR1 con el tiempo usando un eje de concentración logarítmica (Y).

Ejemplo 4

MR1 retrasa la aparición de enfermedad, ralentiza la progresión de la enfermedad y prolonga la supervivencia en el modelo de ratón G93A de ELA.

Se emparejaron por camada 36 ratones G93A hembra y se aleatorizaron en dos grupos de estudio. Se colocaron 18 ratones G93A en el grupo de tratamiento de MR1 y los otros 18 ratones G93A se colocaron en el grupo de control. Los días de estudio se basan en días desde el nacimiento.

Se administró una única inyección de 56 µg de MR1 por vía intraperitoneal (IP) en el día 50. Después de la inyección en bolo se administró una inyección de mantenimiento semanal de 18 µg de MR1 por inyección IP. Las dosis se prepararon en vehículo (solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,3)), a un volumen total de 200 µl. Se administraron animales de control con 200 µl de PBS. Empezando en el día 54, los animales se monitorizaron diariamente durante todo el transcurso del estudio y se midieron las mediciones de peso corporal diario, además de la puntuación neurológica.

Las puntuaciones neurológicas para ambas patas traseras se evaluaron diariamente para cada ratón desde los 50 días de edad. La puntuación neurológica empleó una escala de 0 a 4 (Scott et al., ELA Journal Jan 2008).

Brevemente, los animales asignados con una puntuación de 0 tuvieron extensión completa de las patas traseras lejos de la línea central lateral cuando el ratón se suspende por su cola, y el ratón puede mantener esto durante 2 segundos, suspendido 2-3 veces. Los animales puntúan un 1 cuando muestran colapso o colapso parcial de la extensión de la pata hacia la línea media lateral (debilidad) o temblor de las patas traseras durante la suspensión por la cola. Los animales puntúan un 2 cuando los dedos de las patas se rizan hacia abajo al menos dos veces durante el caminar de 12 pulgadas, o cualquier parte del pie se arrastra a lo largo del fondo de la jaula / mesa. Los animales puntúan un 3 cuando tienen parálisis rígida o movimiento mínimo de las articulaciones, o un pie que no se usa para el movimiento hacia adelante. Los animales puntúan un 4 cuando no pueden ponerse derechos ellos mismos en el plazo de 30 segundos desde cualquier costado. Si una pata trasera se puntúa como 2, los gránulos de alimento se dejan sobre la cama. Si ambas patas traseras se puntúan como 2, se proporciona Nutra-Gel® (Bio-Serve N.º S4798) como alimento, además de gránulos de alimento sobre la cama y se coloca un tubo de pajita largo en la botella de agua.

Se registraron la fecha y causa de la muerte para cada ratón. Por motivos humanos, los animales se monitorizan estrechamente y se sacrifican como moribundos antes de la muerte real usando criterios para moribundez grave.

Para determinar la duración de la supervivencia de forma fiable y humanamente, se usó el estado moribundo, definido como la incapacidad de los ratones para enderezarse ellos mismos 30 segundos después de ponerse de un costado (una puntuación neurológica de 4). Los ratones moribundos se puntuaron como "muertos", y se sacrificaron usando dióxido de carbono.

El procedimiento convencional es eliminar muertes no relacionadas con ELSA en tanto los grupos de tratamiento como de control antes del análisis estadístico. En este caso, todas las muertes de los animales en tanto los grupos de control como de tratamiento se atribuyeron a ELA. Así, no se censuraron animales debido a muertes no relacionadas con ELA.

Los animales transgénicos *SOD1* mutantes muestran características de peso corporal (BW) normal como neonatos y ganan peso normalmente en comparación con los animales no transgénicos en la adultez. Dependiendo de la naturaleza de la mutación genética en el transgén y el número de copias de transgén mutante, la pérdida de peso llega a ser aparente en animales adultos y continúa hasta la muerte. El análisis de pérdida de peso en los grupos de tratamiento y de control puede proporcionar percepción en los efectos de tratamiento putativos sobre la aparición de enfermedad y la tasa de progresión. Con el fin de evaluar el impacto del tratamiento de MR1 en el peso corporal, se examinan dos parámetros resumen (1) Cambios en BW desde el inicio del estudio hasta la obtención del peso corporal pico que pueden reflejar un impacto sobre la aparición de enfermedad (2) Cambios en BW desde el peso corporal pico hasta la muerte que pueden reflejar un impacto sobre la progresión de la enfermedad.

Las curvas comparativas de tiempo con respecto a evento de grupo tratados con MR1 y de control durante el tiempo desde el día 40 hasta la obtención del peso corporal pico se muestran en la Figura 4. El tiempo medio hasta el peso corporal pico para el grupo de control fue 50 días en comparación con el grupo tratado con MR1 que fue 51 días. Esta diferencia no fue significativa cuando se analizó por Kaplan Meier usando los modelos estadísticos del rango logarítmico y de Wilcoxon, pruebas de riesgo proporcional de Cox, o estadísticas paramétricas.

Las curvas comparativas de tiempo con respecto a evento de grupos tratados con MR1 y de control durante el tiempo desde el peso corporal pico hasta la muerte se muestran en la Figura 5. El tiempo desde el peso corporal pico hasta la muerte fue estadísticamente significativo después de 15 días en animales tratados con MR1. Los animales de control tienen un riesgo de 2,4 a 4,7 veces mayor de morir antes después de alcanzar el peso corporal pico que los animales tratados con MR1. La mediana de tiempo desde el peso corporal pico hasta la muerte en el grupo de control fue 26 días, mientras que en el grupo tratado con MR1 fue 41 días. La significancia para cada uno de los análisis en este ejemplo se calculó de varias formas con el fin de evaluar mejor la significancia. El retraso es estadísticamente significativo cuando se analiza usando varios enfoques (Kaplan Meier, rango logarítmico $p=0,0110$ y Wilcoxon, $p=0,0069$; modelo de riesgo proporcional de Cox $p=0,05151$; modelo estadístico paramétrico, $p=0,0122$).

Basándose en los datos de peso corporal, parece que MR1 tiene menos impacto sobre la aparición de la enfermedad en el modelo de ratón G93A, pero tiene un efecto espectacular en el ralentizamiento de la tasa de pérdida de peso corporal desde el peso corporal pico hasta la muerte.

También se caracterizó el momento exacto de la aparición de enfermedad analizando las puntuaciones neurológicas diarias de los grupos tratados con solución salina y tratados con MR1. Al inicio del estudio (día 50), todos los animales tienen una puntuación neurológica de 0 sin síntomas o parálisis observables. La aparición de enfermedad puede caracterizarse examinando la progresión en la puntuación neurológica desde una puntuación neurológica de 0 hasta una puntuación neurológica de 2 cuando los animales están claramente arrastrando una pata trasera. La representación de tiempo con respecto a evento para la edad a la que los animales del grupo de MR1 y de control progresaron a una puntuación neurológica de 2 y el número de días al que una puntuación neurológica de 2 se muestran en la Figura 6. La mediana de tiempo a una puntuación neurológica de 2 para cada grupo se representa en la Figura 7. El tiempo para obtener una puntuación de 2 en el grupo de control es 115 días y para el grupo tratado con MR1 es 122 días. Basándose en los datos de puntuación neurológica, MR1 retrasa la aparición de enfermedad en el modelo de ratón G93A aproximadamente 7 días y el retraso es estadísticamente significativo cuando se analiza usando varios enfoques (Kaplan Meier, rango logarítmico ($p = 0,0378$) y Wilcoxon, ($p = 0,0591$); modelo de riesgo proporcional de Cox ($p = 0,0521$); análisis paramétrico, ($p = 0,0582$)). Los días gastados en cada nivel de puntuación neurológica se representan contra la mediana de la edad a ese nivel de puntuación en la Figura 7.

El tiempo de supervivencia de los animales tratados fue 13 días después que los animales de control. Las curvas comparativas de tiempo con respecto a evento de grupos tratados con MR1 y de control para el tiempo desde el peso corporal pico hasta la muerte se muestran en la Figura 8. La mediana de tiempo de supervivencia para el grupo de control fue 128 días y la mediana de supervivencia para el grupo tratado con MR1 fue 141 días. Los animales de control tuvieron un riesgo de 2,8 a 3,2 veces mayor de morir antes que los animales tratados con MR1. El retraso es estadísticamente significativo cuando se analiza usando varios enfoques (prueba de Kaplan Meier, rango logarítmico ($p = 0,0040$) y Wilcoxon ($p = 0,0109$); modelo de riesgo proporcional de Cox ($p = 0,0060$); análisis paramétrico ($p = 0,0049$)).

Ejemplo 5

Dosificación optimizada y metanálisis demuestran que el tratamiento con MR1 retrasa la aparición de enfermedad y mejora la supervivencia en ratones SOD1G93

60 Ratones G93A hembra y 36 macho se emparejaron por camada y se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento o de control. 30 de los ratones hembra y 18 de los machos se trataron con MR1 empezando en el día 50. Los días de estudio se basan en el nacimiento.

Se administró una única inyección en bolo de 5,22 mg/kg o 6,75 mg/kg de MR1 por vía intraperitoneal en el día 50 en hembras o machos, respectivamente. Posterior a la inyección en bolo, las hembras recibieron inyecciones semanales de 1 mg/kg de MR1 y los machos recibieron semanales inyecciones de 1,34 mg/kg de MR1 mediante inyección IP. Las dosis se prepararon en vehículo (solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,3)), a un volumen total de 200 μ l. Los animales de control fueron administrados con 200 μ l de PBS. Los animales se monitorizaron para peso corporal, puntuación neurológica, muertes no relacionadas con ELA y criterios para la eutanasia como se ha descrito previamente.

Las curvas comparativas de tiempo con respecto a evento de grupos tratados con MR1 y de control para el tiempo desde el día 40 hasta la obtención del peso corporal pico se muestran en la Figura 9A. La mediana de tiempo hasta el peso corporal pico para el grupo de control fue 49 días en comparación con el grupo tratado con MR1 que fue 53 días. Esta diferencia no fue significativa cuando se analizó por Kaplan Meier usando los modelos estadísticos de rango logarítmico y de Wilcoxon, pruebas de relación proporcional de Cox, o estadísticas paramétricas.

5 Curvas comparativas de tiempo con respecto a evento de grupos tratados con MR1 y de control para el momento desde el peso corporal pico hasta la muerte se muestran en la Figura 9B. El tiempo desde el peso corporal pico hasta la muerte fue estadísticamente significativo después de 6 días en animales tratados con MR1. La mediana de tiempo desde el peso corporal pico hasta la muerte en el grupo de control fue 29 días, mientras que en el grupo tratado con MR1 fue 35 días. La significancia para cada uno de los análisis en este ejemplo se calculó de varias formas, con el fin de evaluar mejor la significancia. El retraso es estadísticamente significativo cuando se analizó usando varios modelos estadísticos: Kaplan Meier, rango logarítmico ($p=0,0413$) y Wilcoxon, ($p=0,0732$); y el modelo de riesgo proporcional de Cox ($p=0,0460$). Basándose en los datos de peso corporal, MR1 parece tener menos impacto sobre la aparición de enfermedad en el modelo de ratón G93A, pero tiene un espectacular efecto en ralentizar la tasa de pérdida de peso corporal desde el peso corporal pico hasta la muerte.

10 Las representaciones de tiempo con respecto a evento para la edad a la que los animales del grupo MR1 y de control progresaron a una puntuación neurológica de 2 y el número de días a una puntuación neurológica de 2 se muestran en la Figura 9C. El tiempo para obtener una puntuación de 2 en el grupo de control fue 113 días y para el grupo tratado con MR1 es 121 días. Basándose en los datos de puntuación neurológica, MR1 retrasa la aparición de enfermedad en el modelo de ratón G93A aproximadamente 8 días y el retraso es estadísticamente significativo cuando se analiza usando varios modelos estadísticos: Kaplan Meier, rango logarítmico ($p = 0,0038$) y Wilcoxon; ($p = 0,0017$); y el modelo de riesgo proporcional de Cox ($p = 0,0010$).

15 El tiempo de supervivencia de animales tratados fue 9 días después que los animales de control. La mediana del tiempo de supervivencia para el grupo de control fue 124 días y la mediana de la supervivencia para el grupo tratado con MR1 fue 133 días, como se muestra en la Figura 9D. El retraso es estadísticamente significativo cuando se analiza usando varios modelos estadísticos: prueba de Kaplan Meier, rango logarítmico ($p = 0,0043$) y Wilcoxon ($p = 0,0040$); y el modelo de riesgo proporcional de Cox ($p = 0,0030$).

20 Se entiende que los ejemplos y realizaciones en el presente documento se describen para fines ilustrativos solo y que diversas modificaciones o cambios a la luz del mismo serán sugeridos a los expertos en la materia y deben incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto que bloquea la interacción de CD40 y CD40L para su uso en el tratamiento de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, en el que el compuesto es un anticuerpo anti-CD40L, administrándose dicho compuesto solo.

FIG. 1A

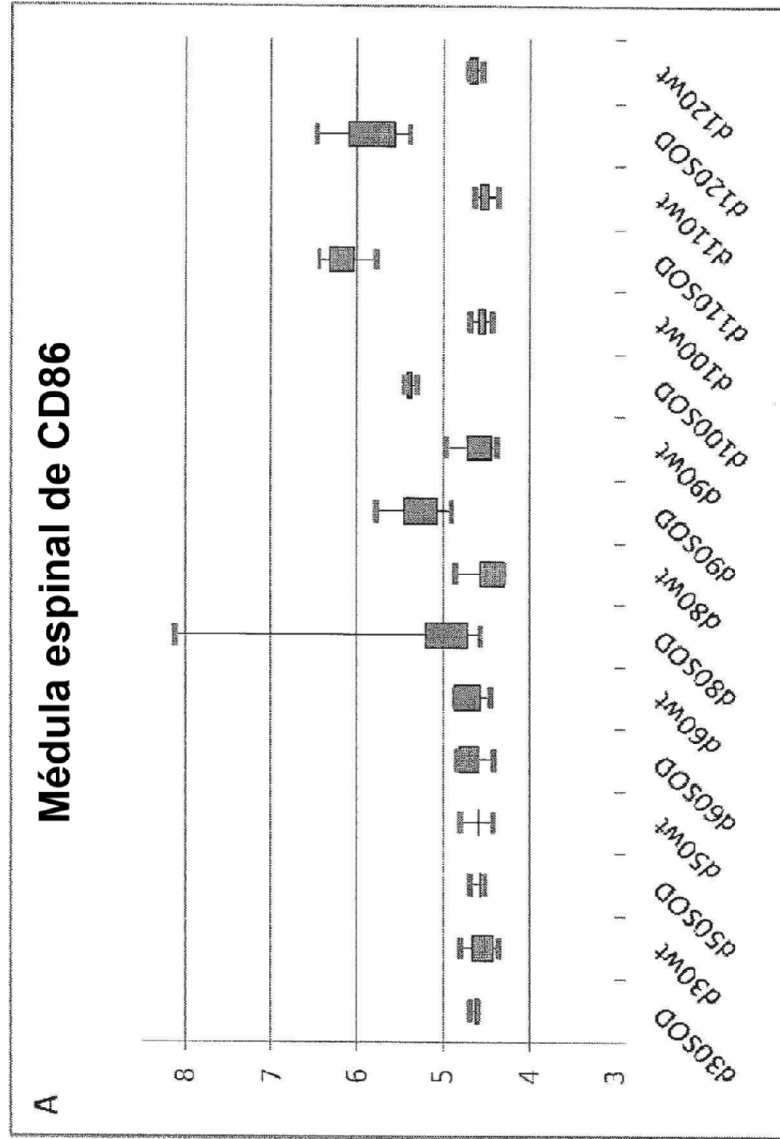


FIG. 1B

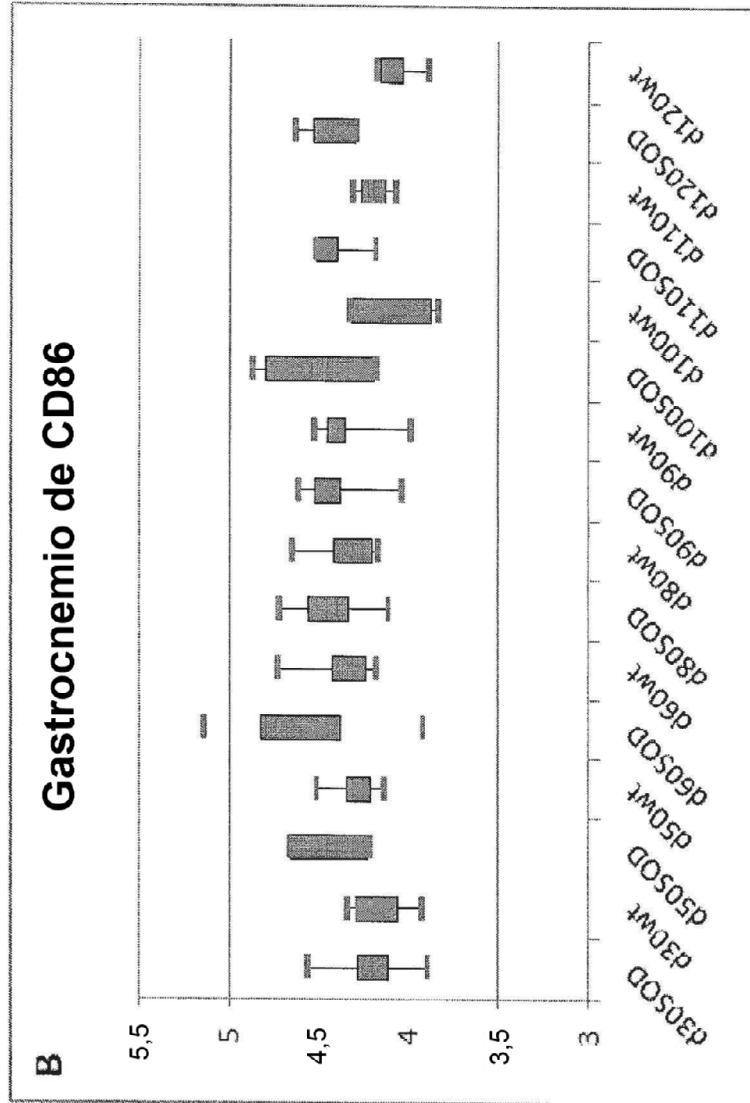


FIG. 1C

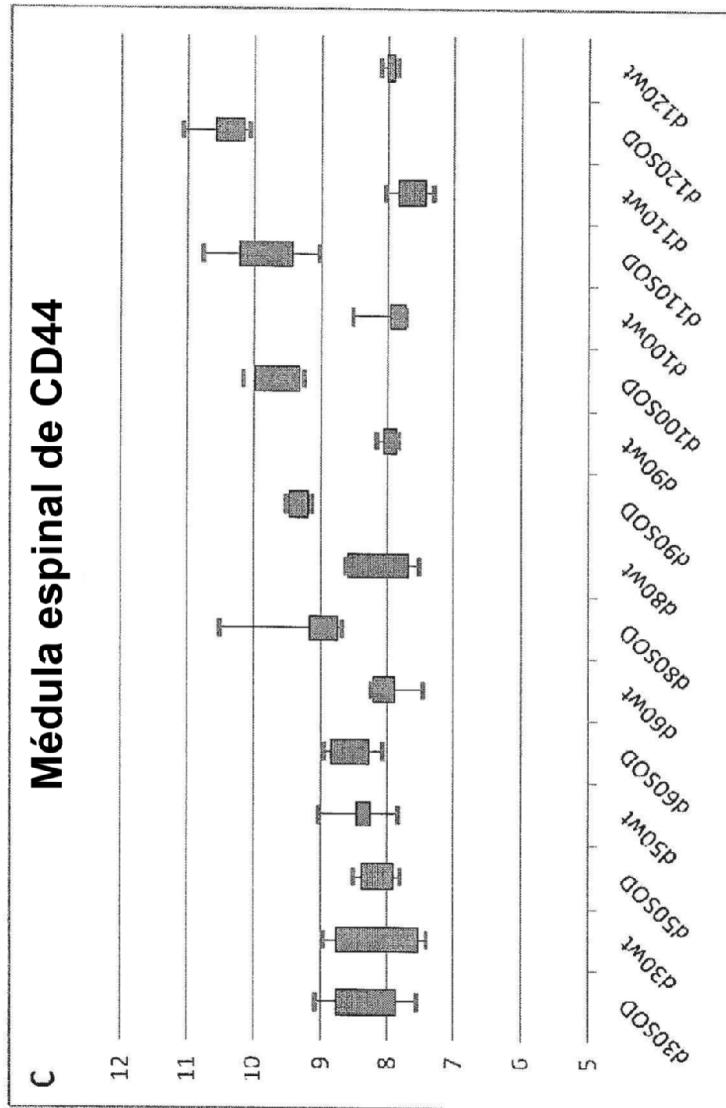


FIG. 1E

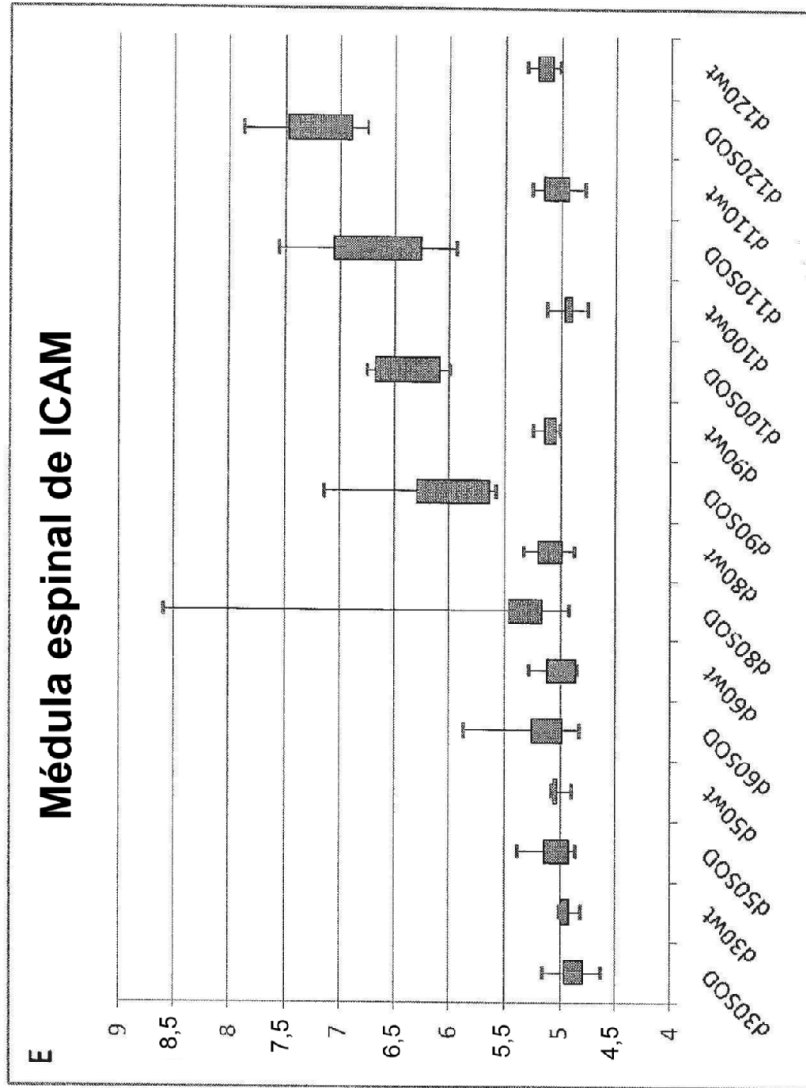


FIG. 1F

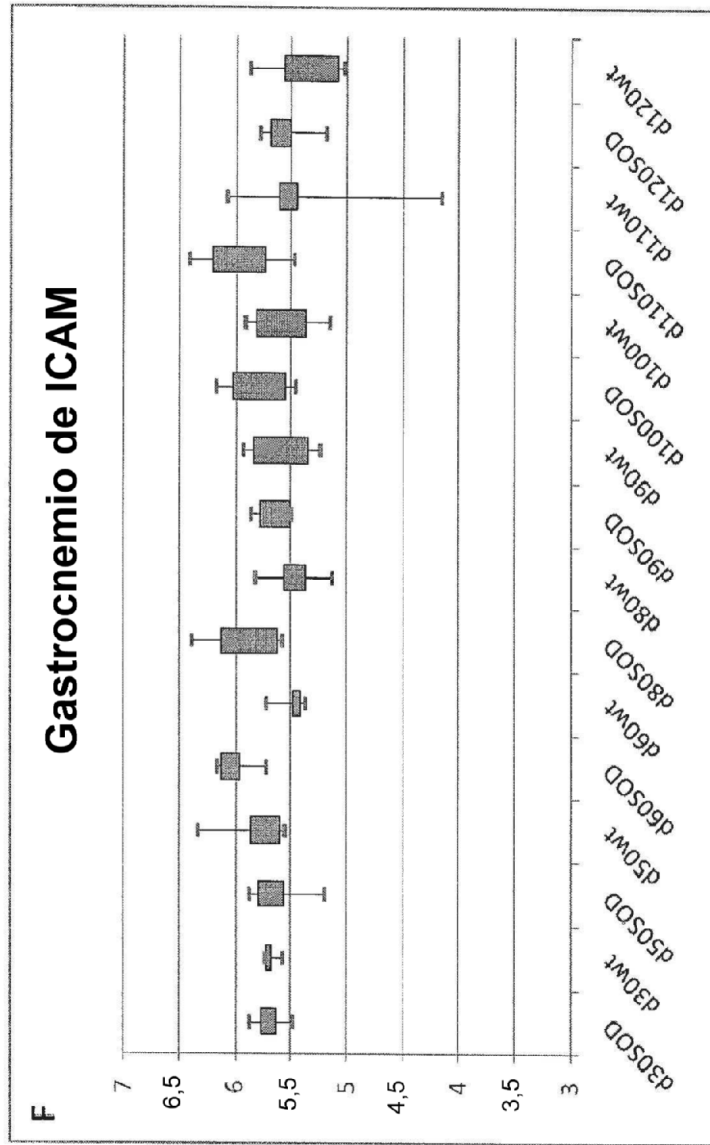


FIG. 1G

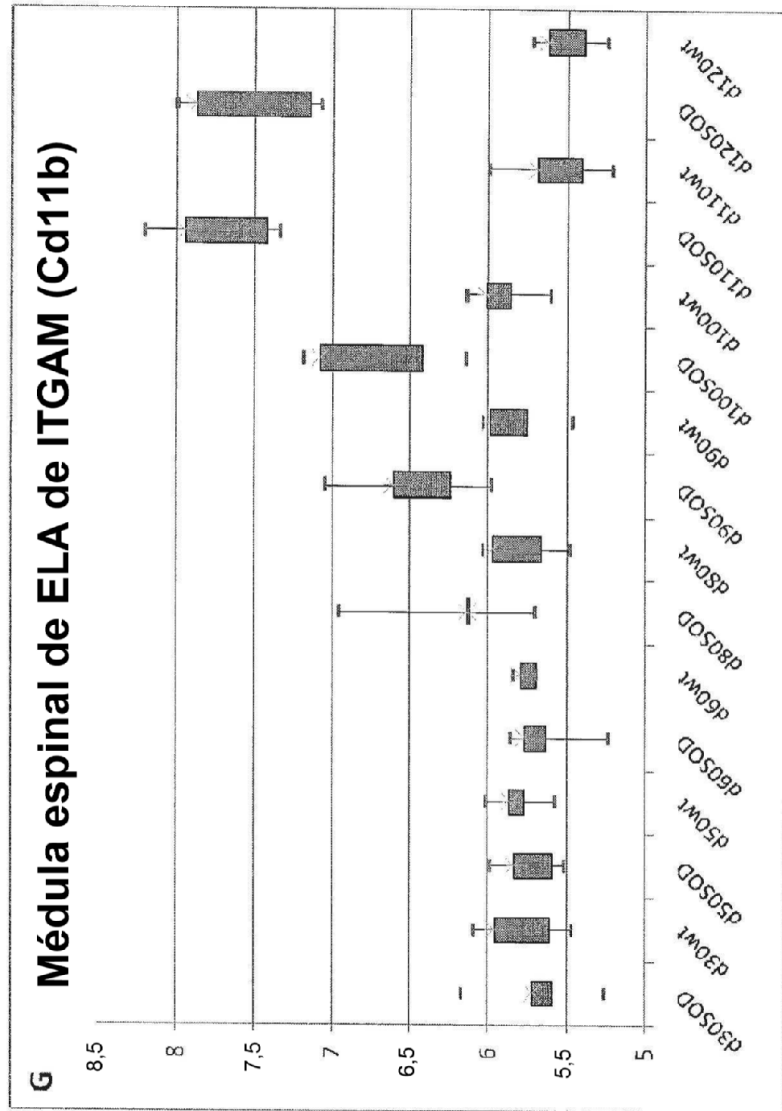


FIG. 1H

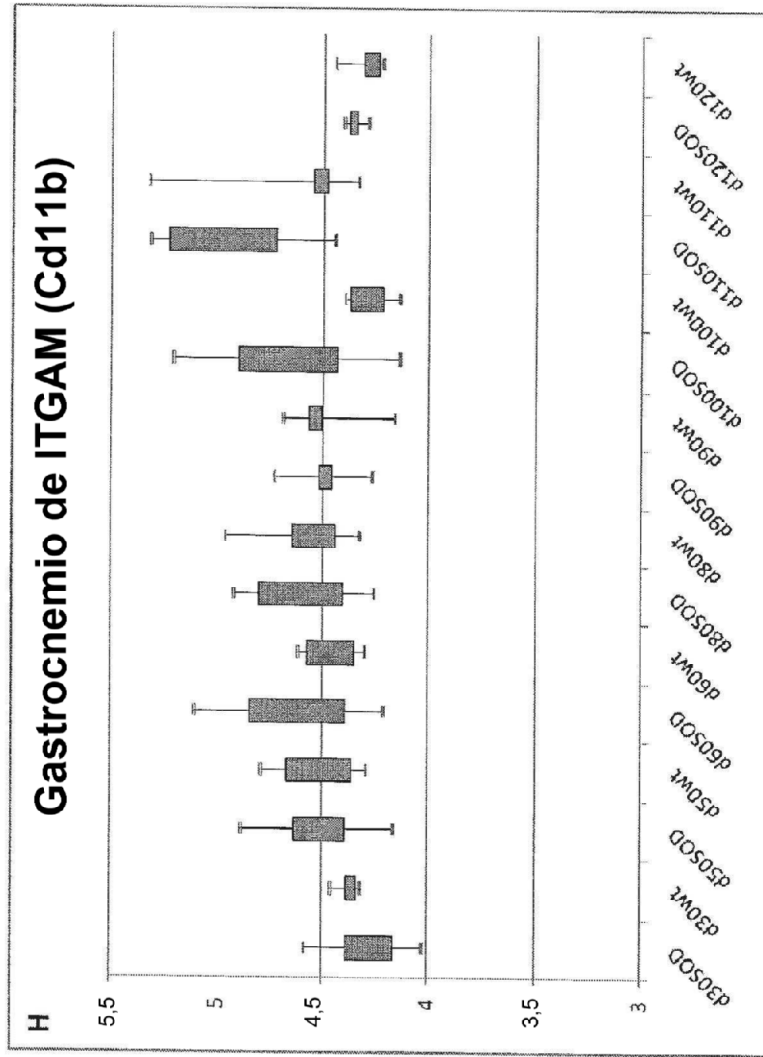


FIG. 1I

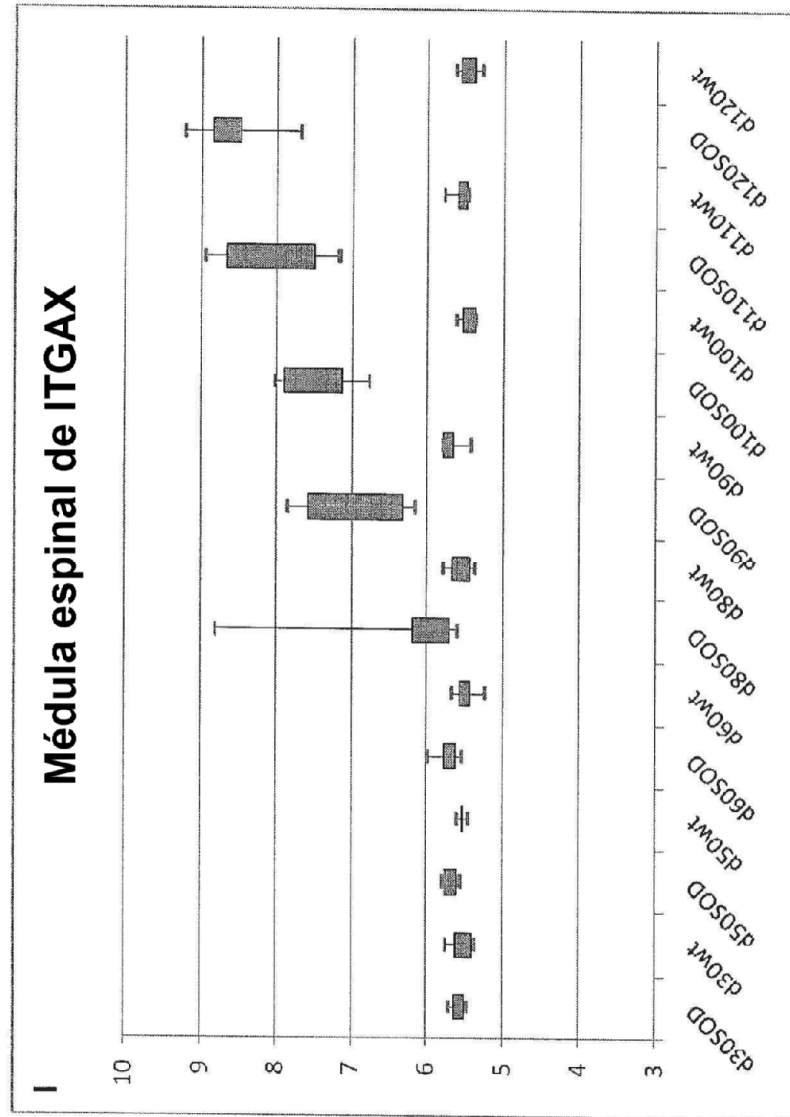


FIG. 1J

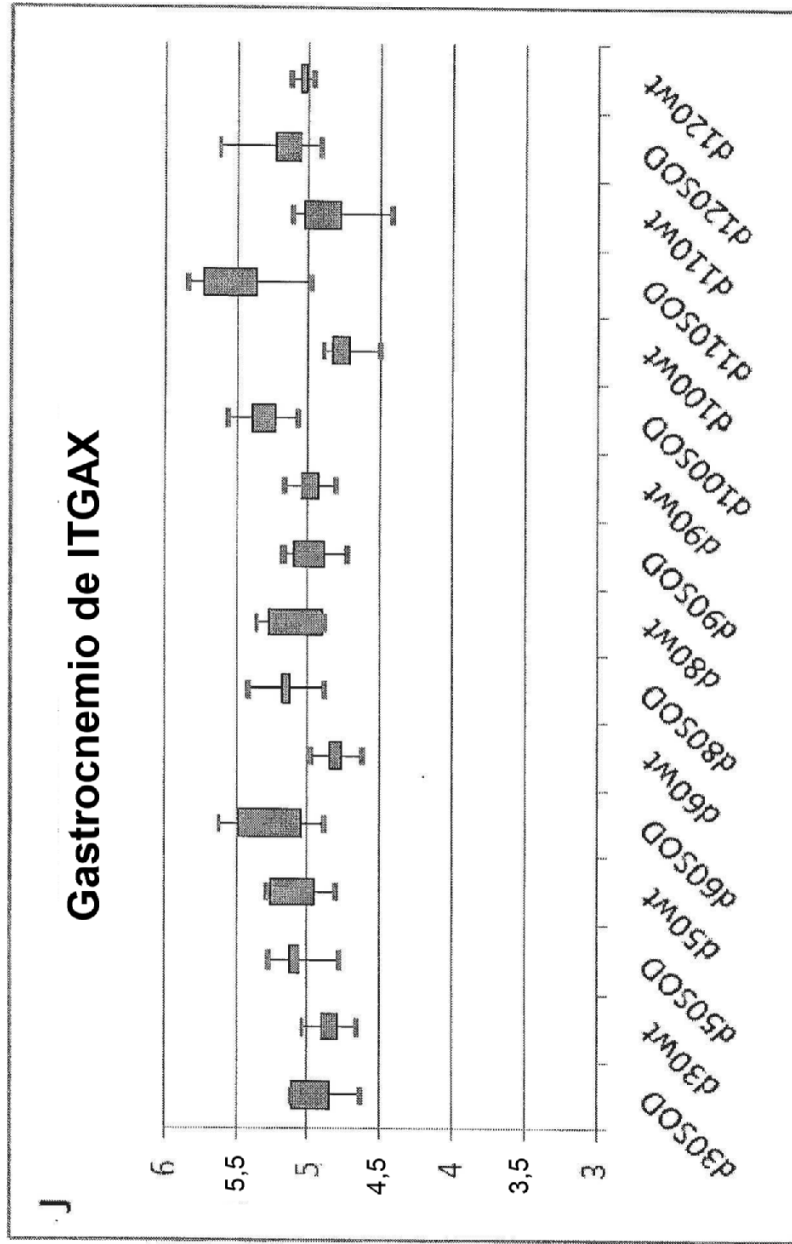


FIG. 1K

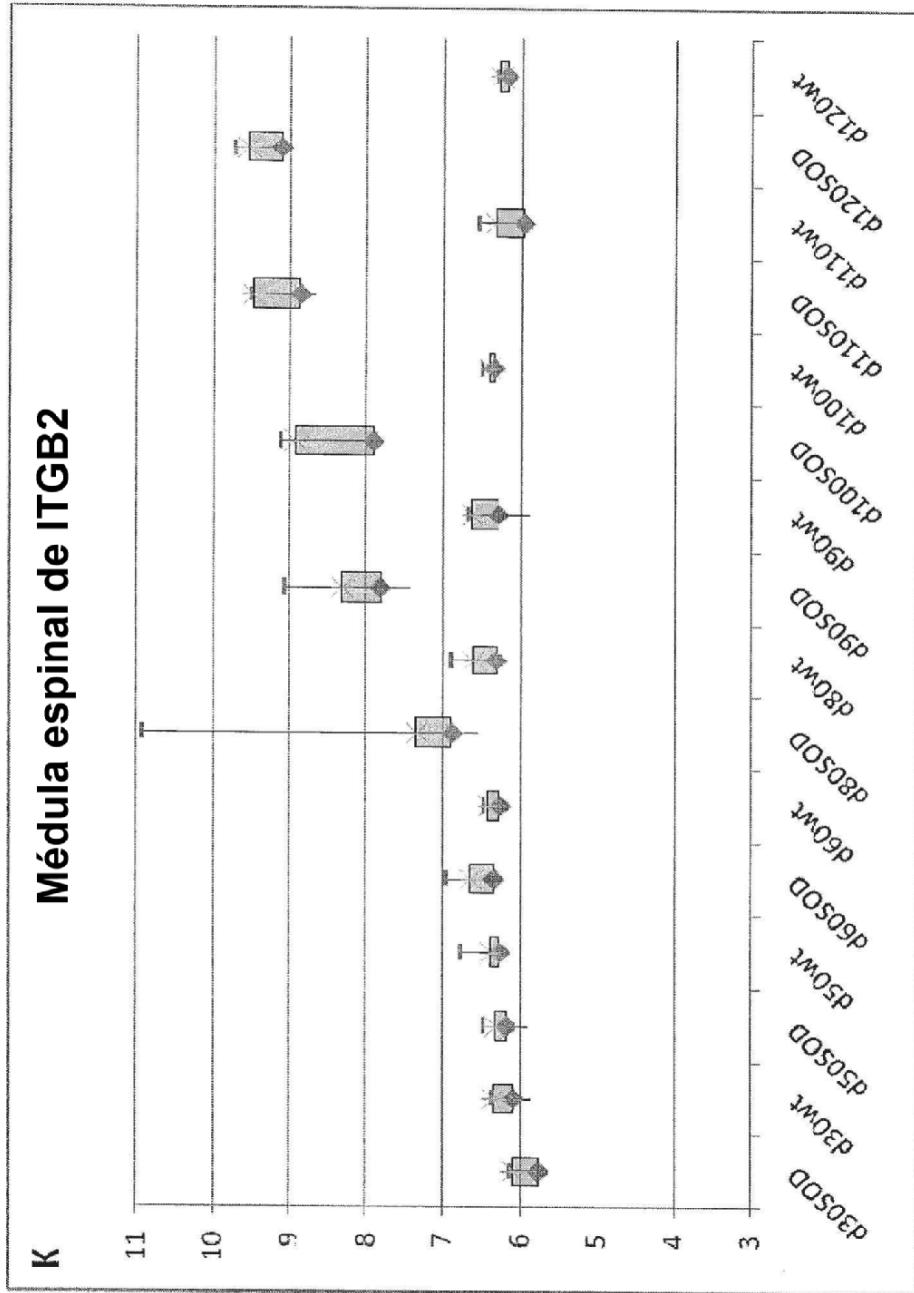


FIG. 1L

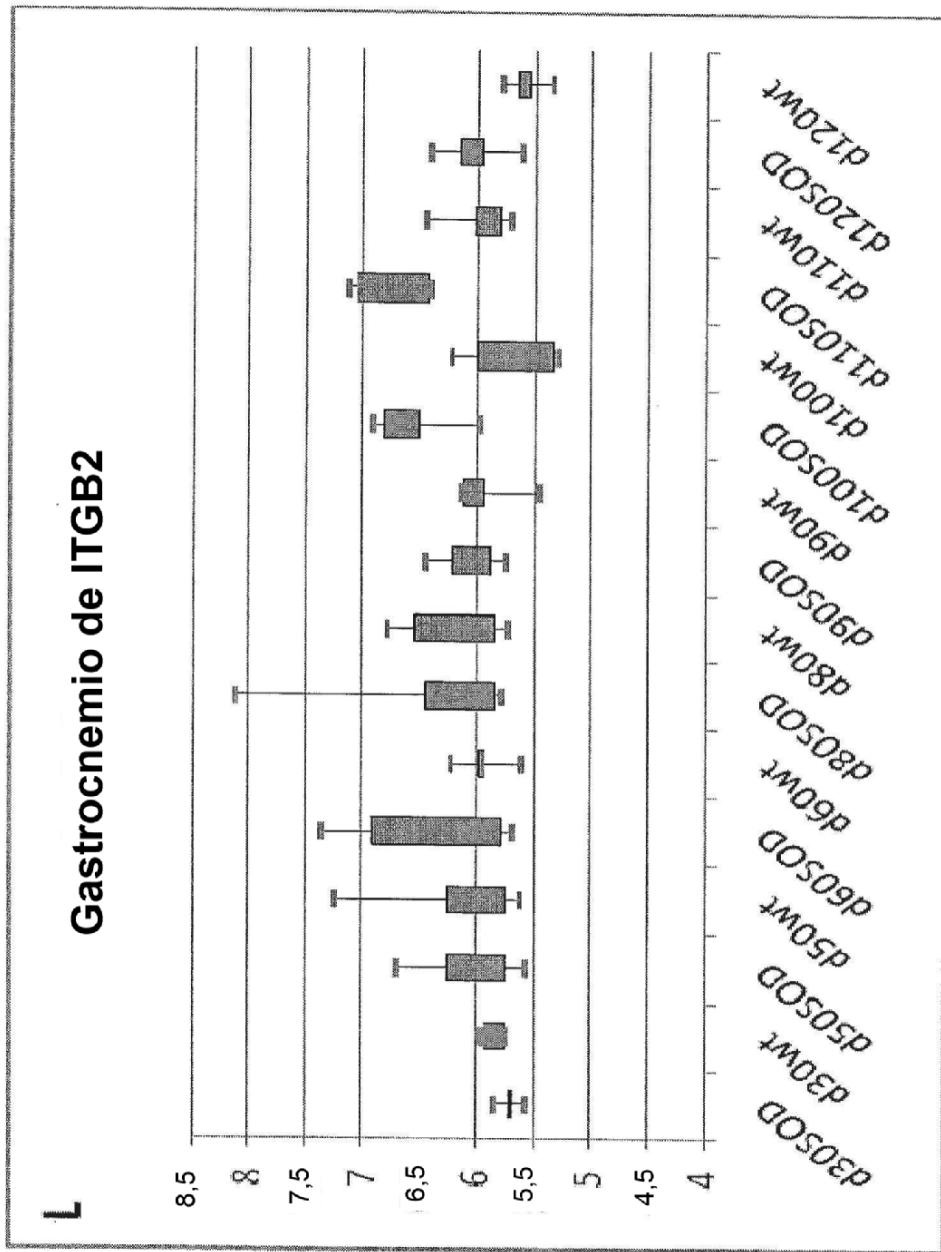


FIG. 1M

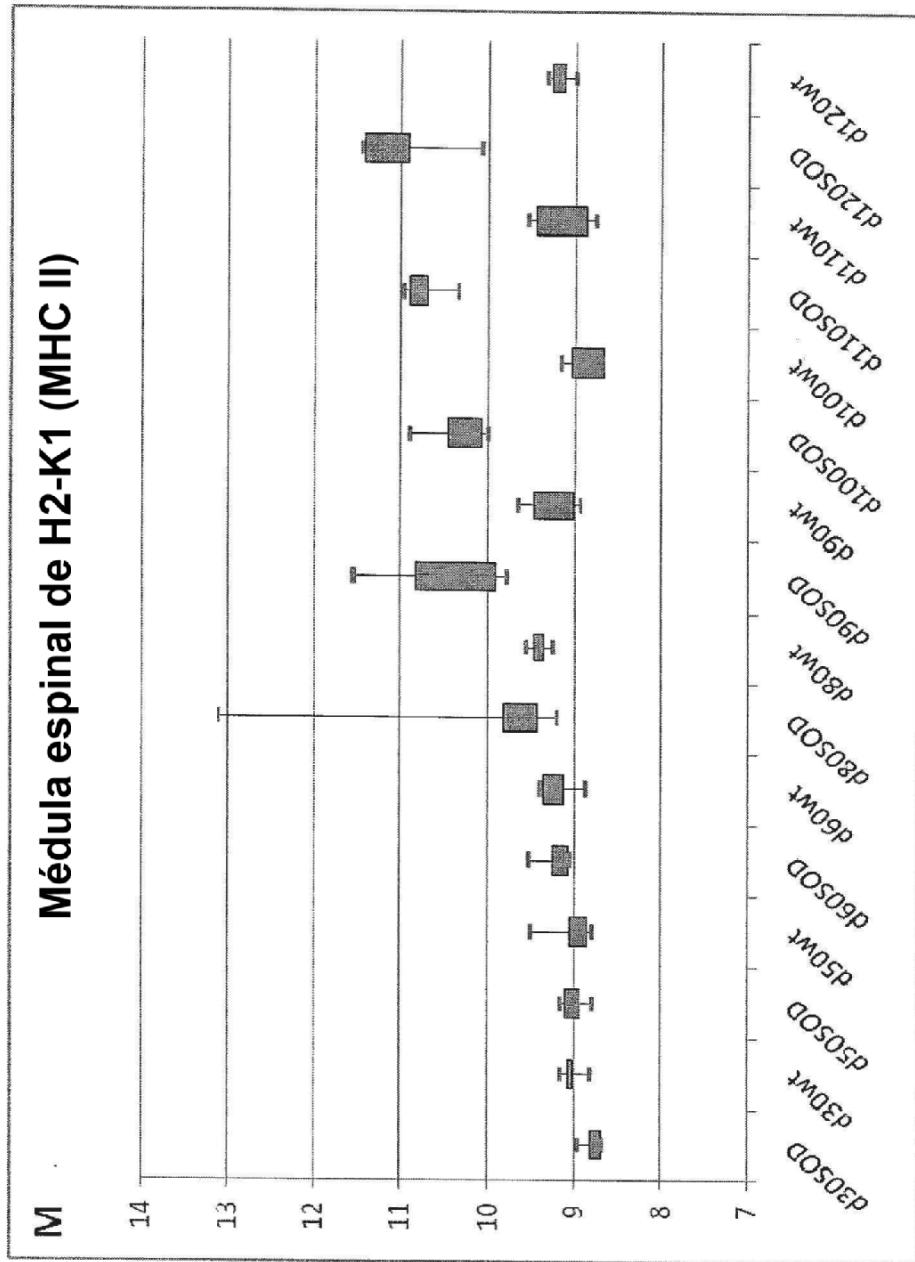


FIG. 1N

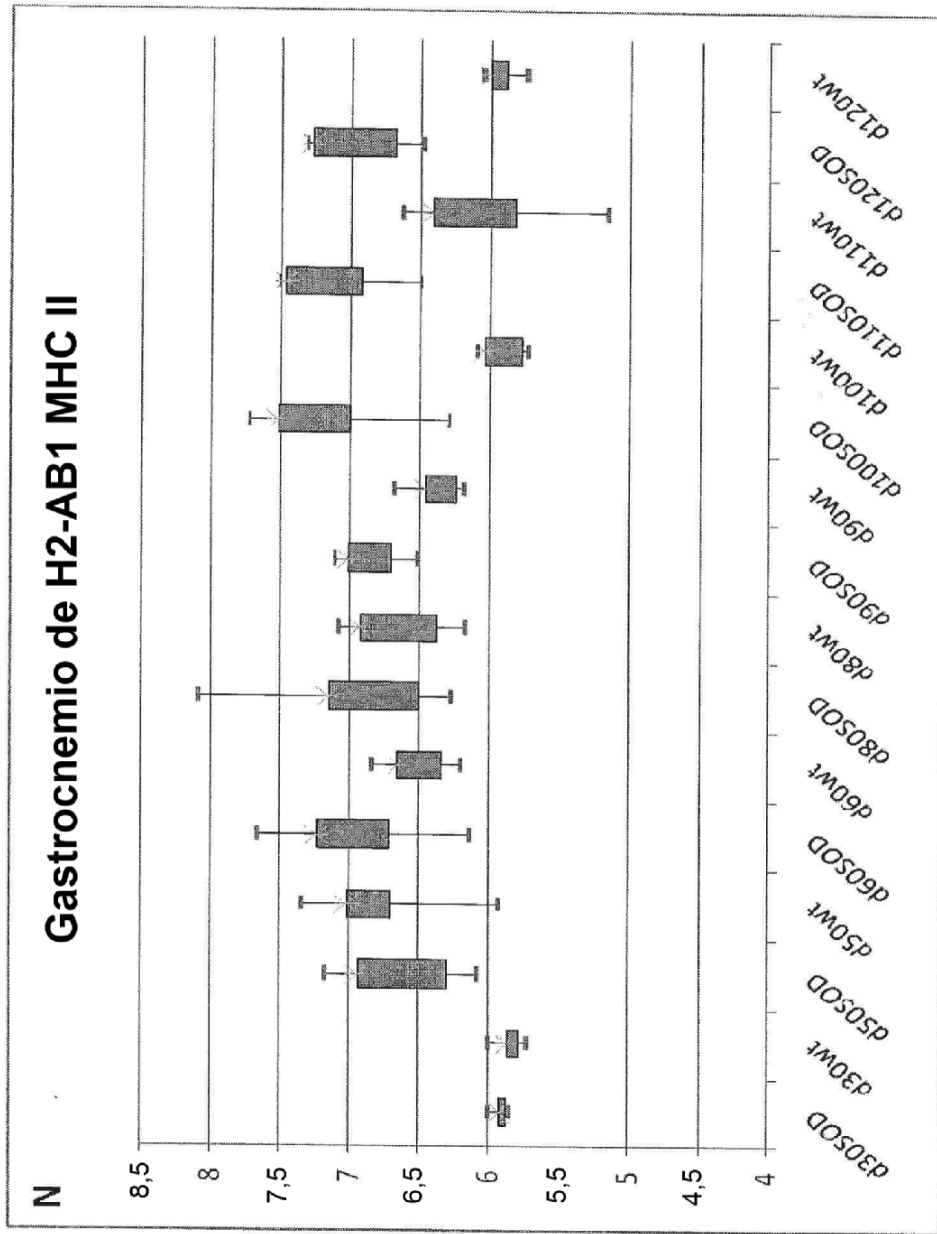


FIG. 10

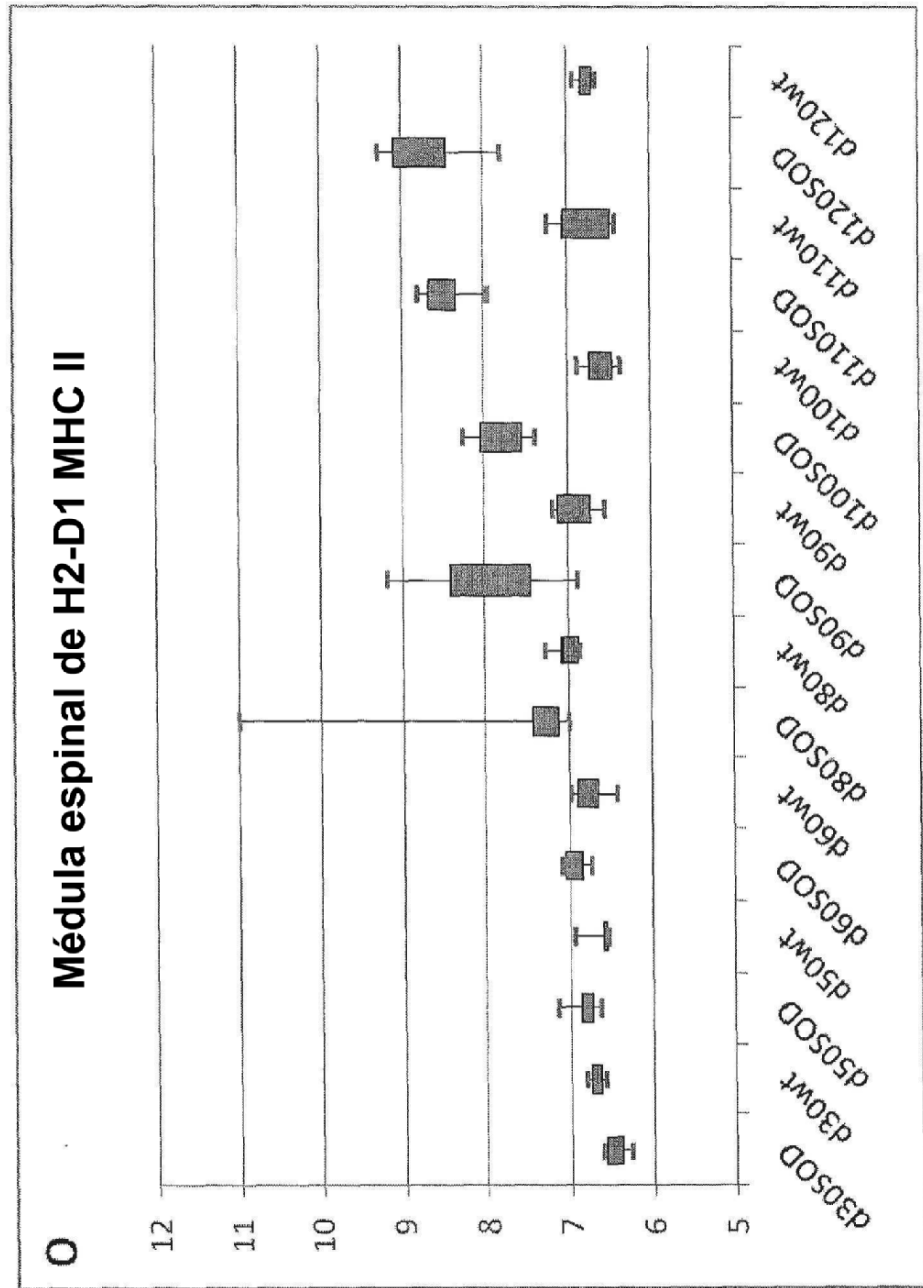


FIG. 1P

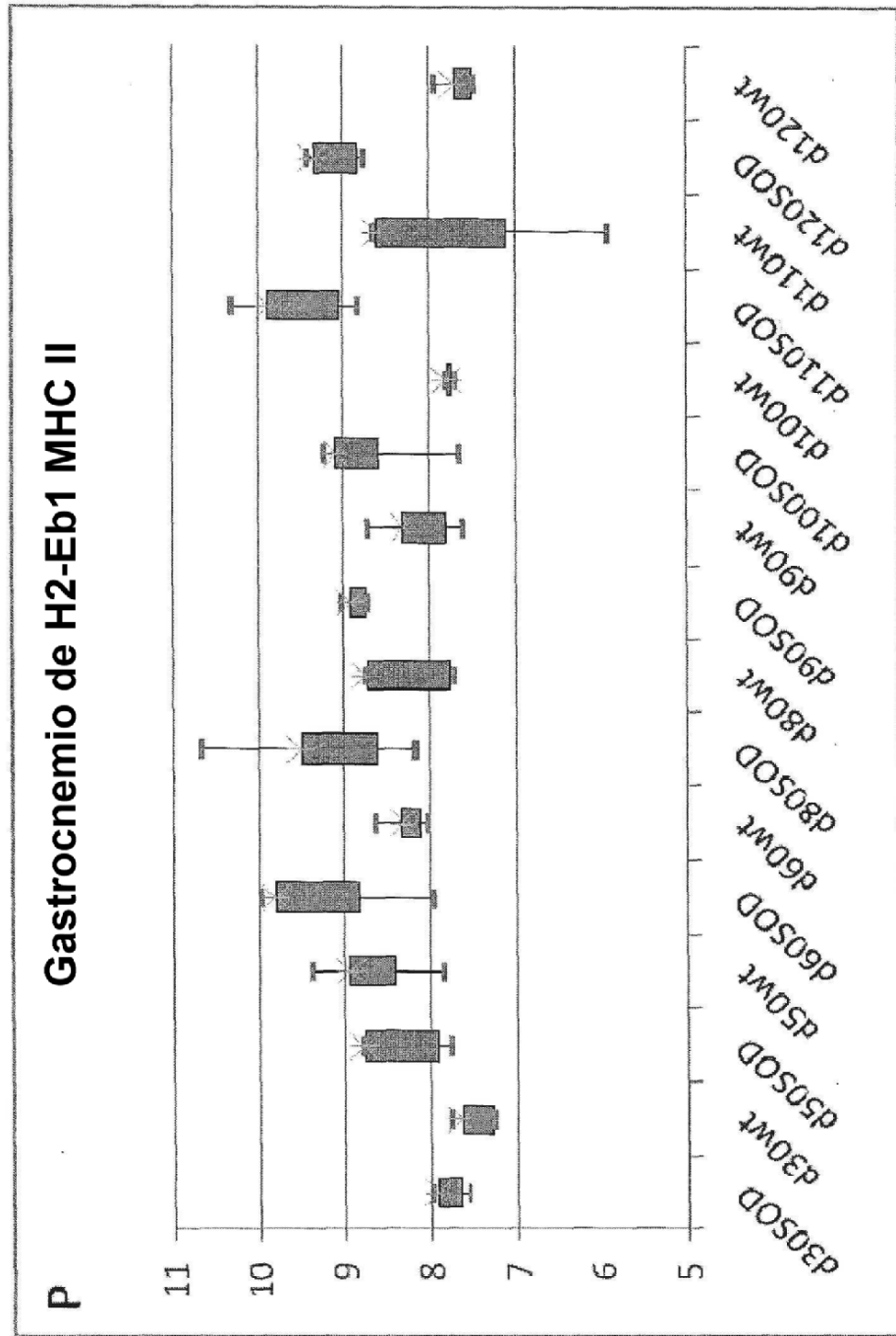


FIG. 2

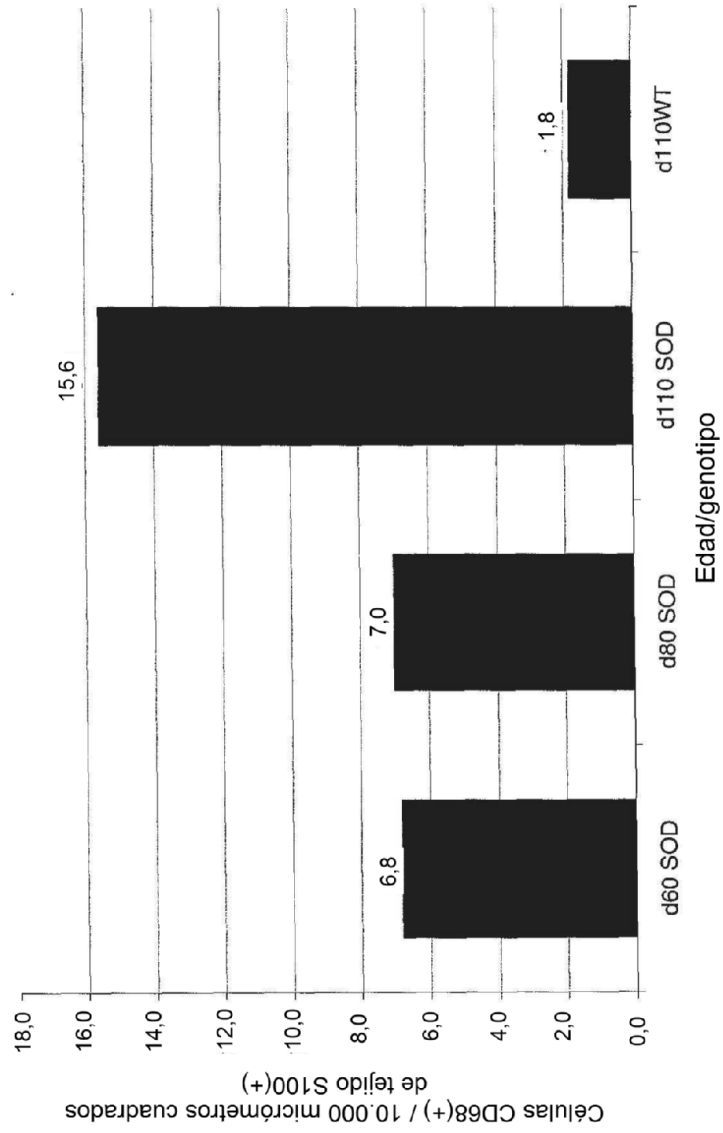


FIG. 3A

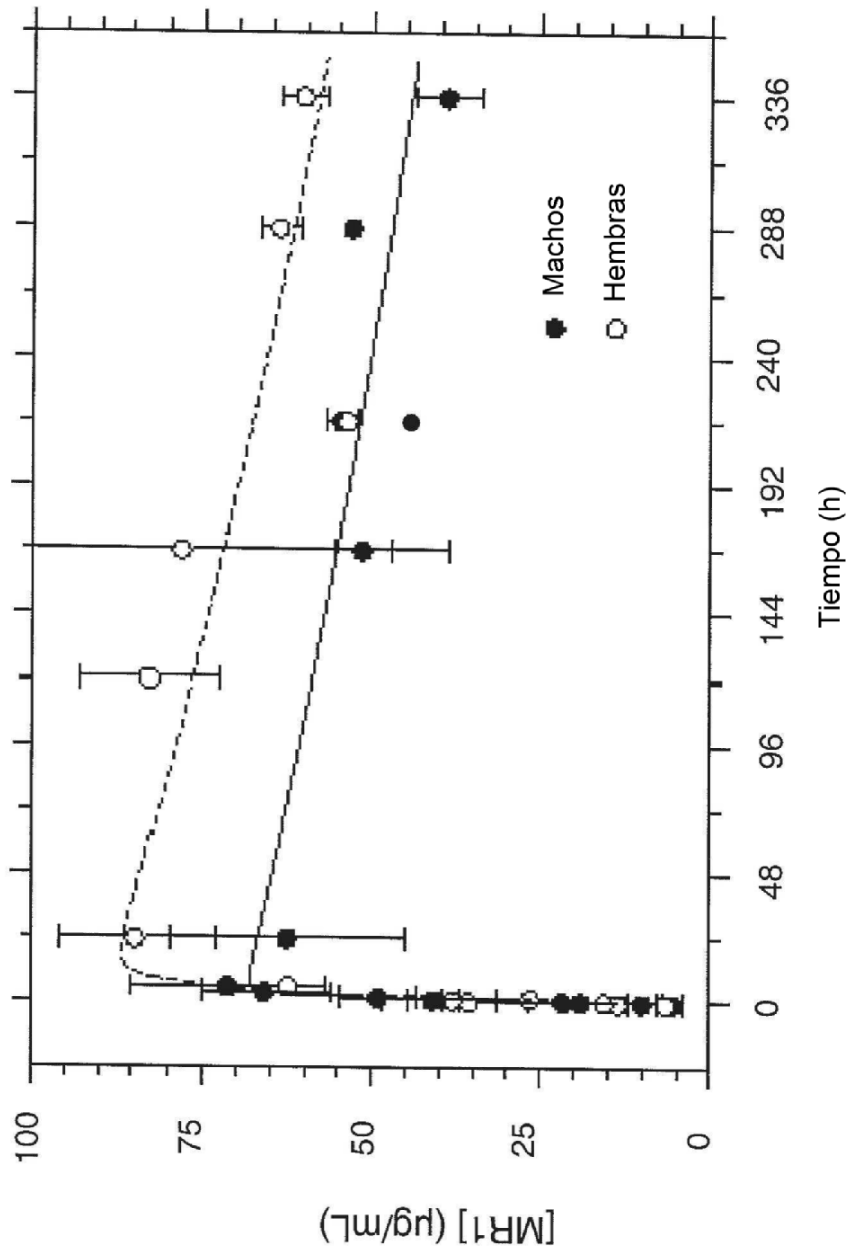


FIG. 3B

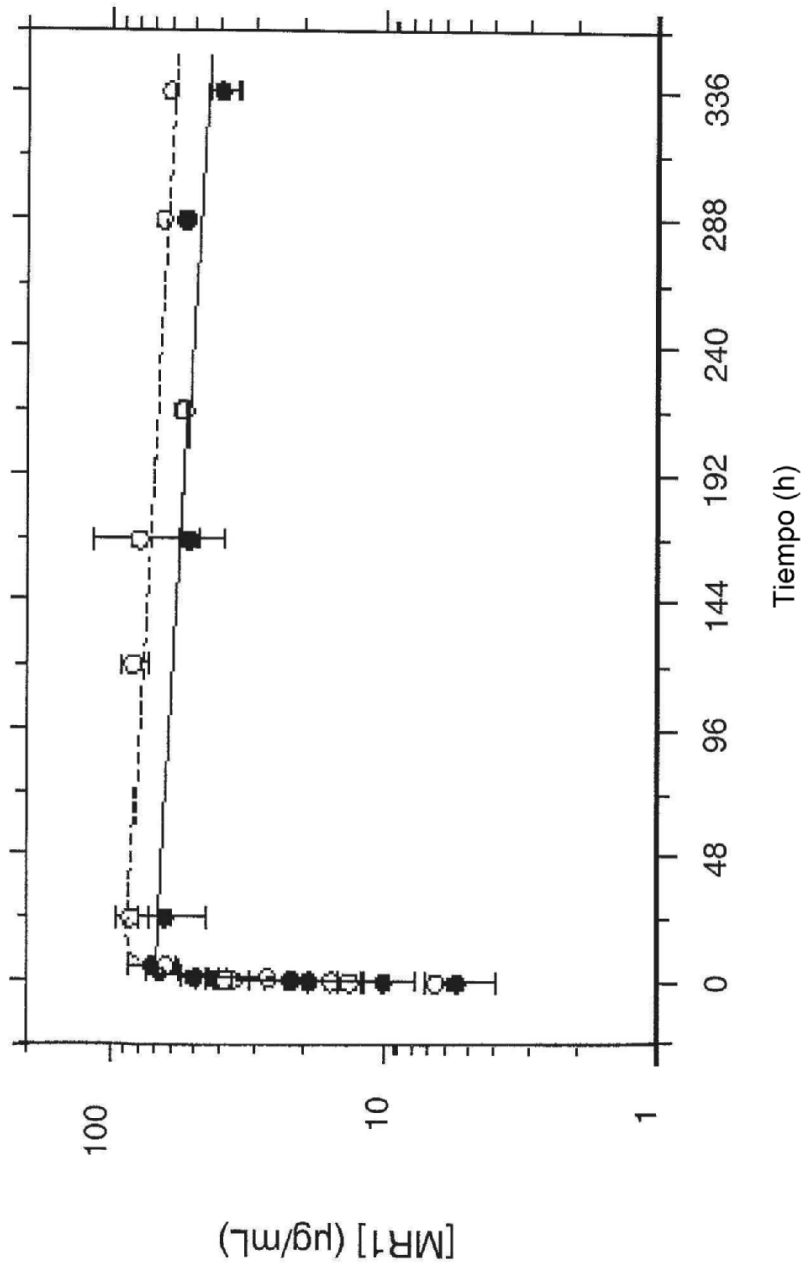


FIG. 4

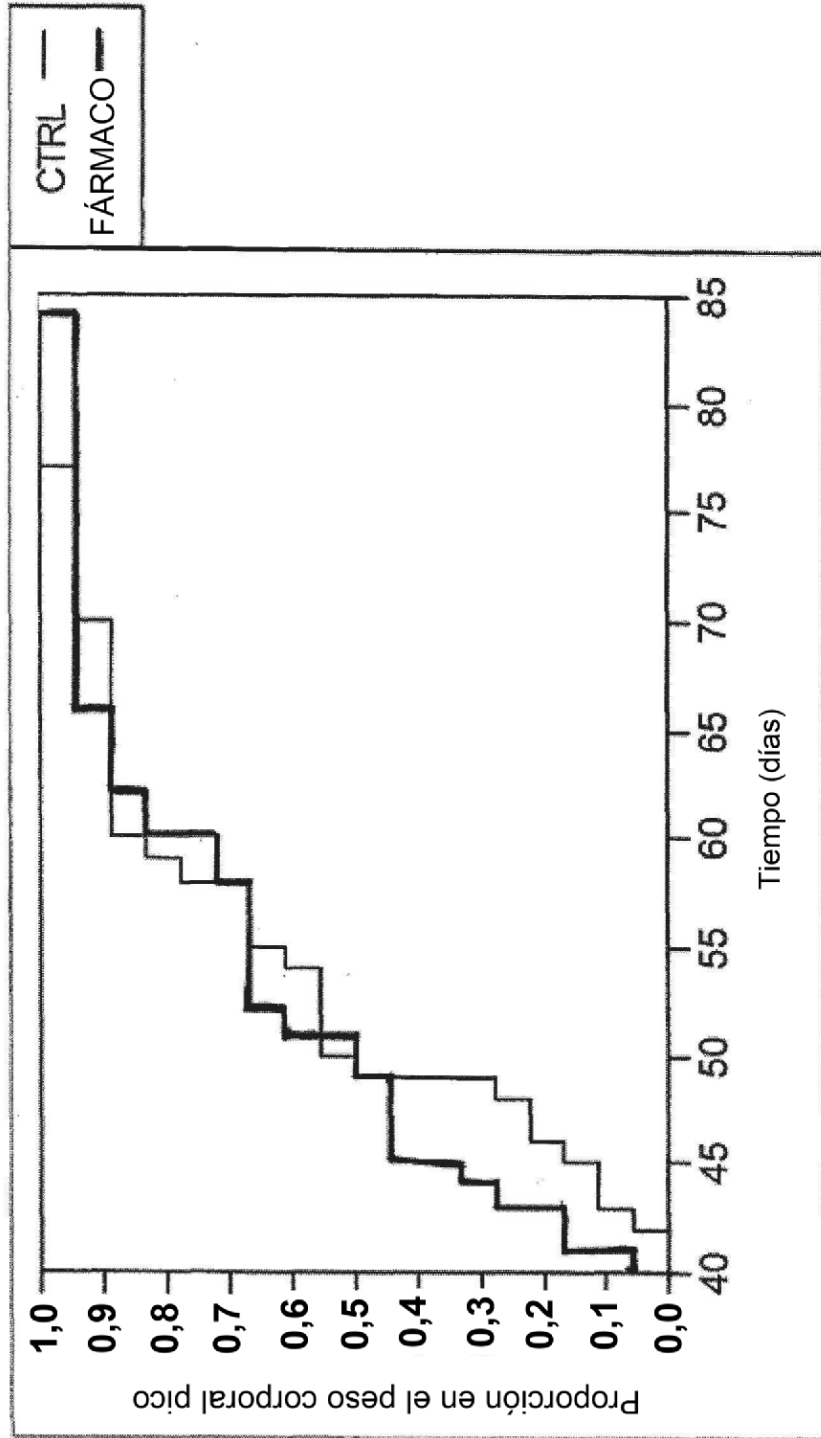


FIG. 5

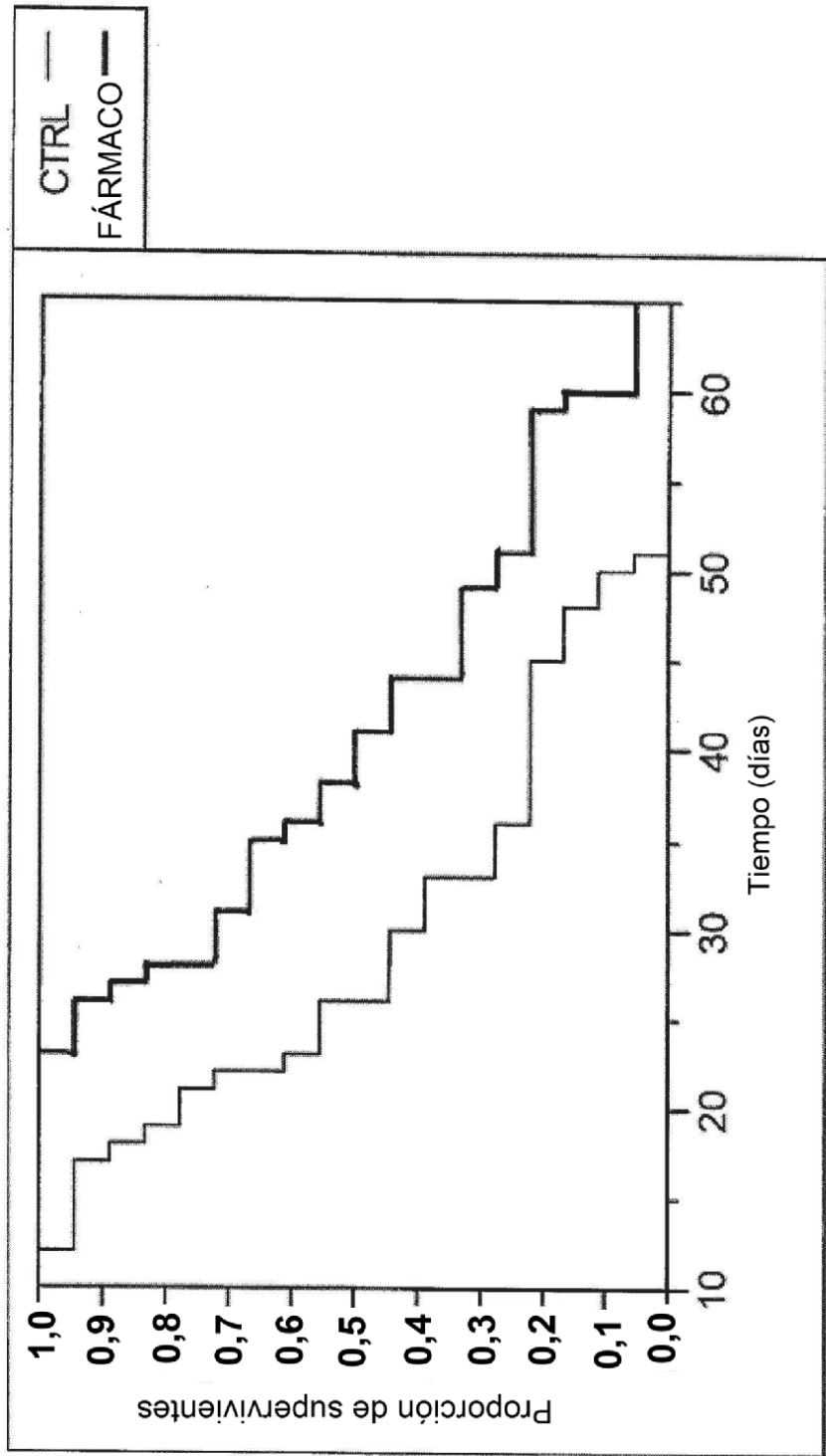


FIG. 6

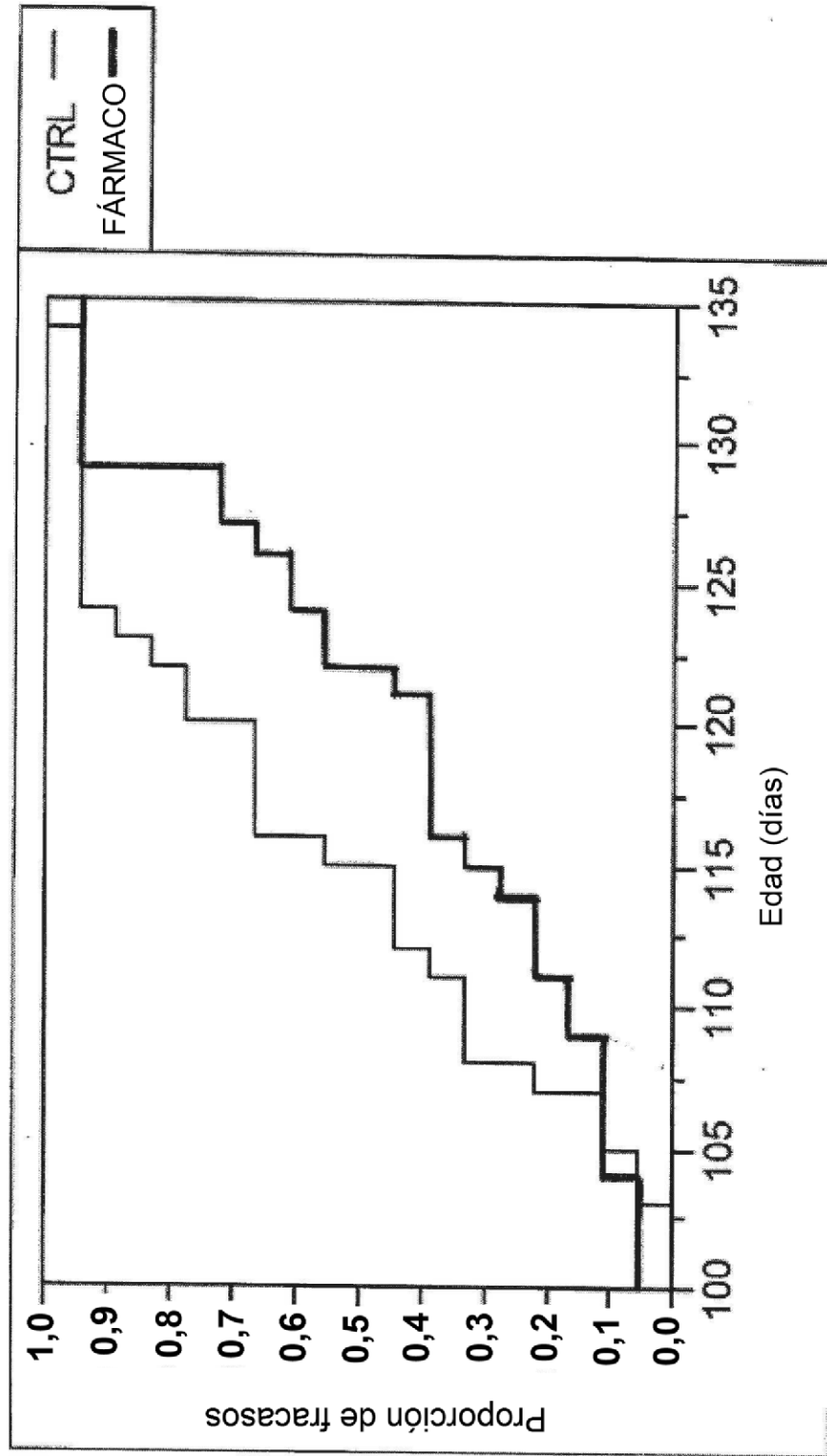


FIG. 7

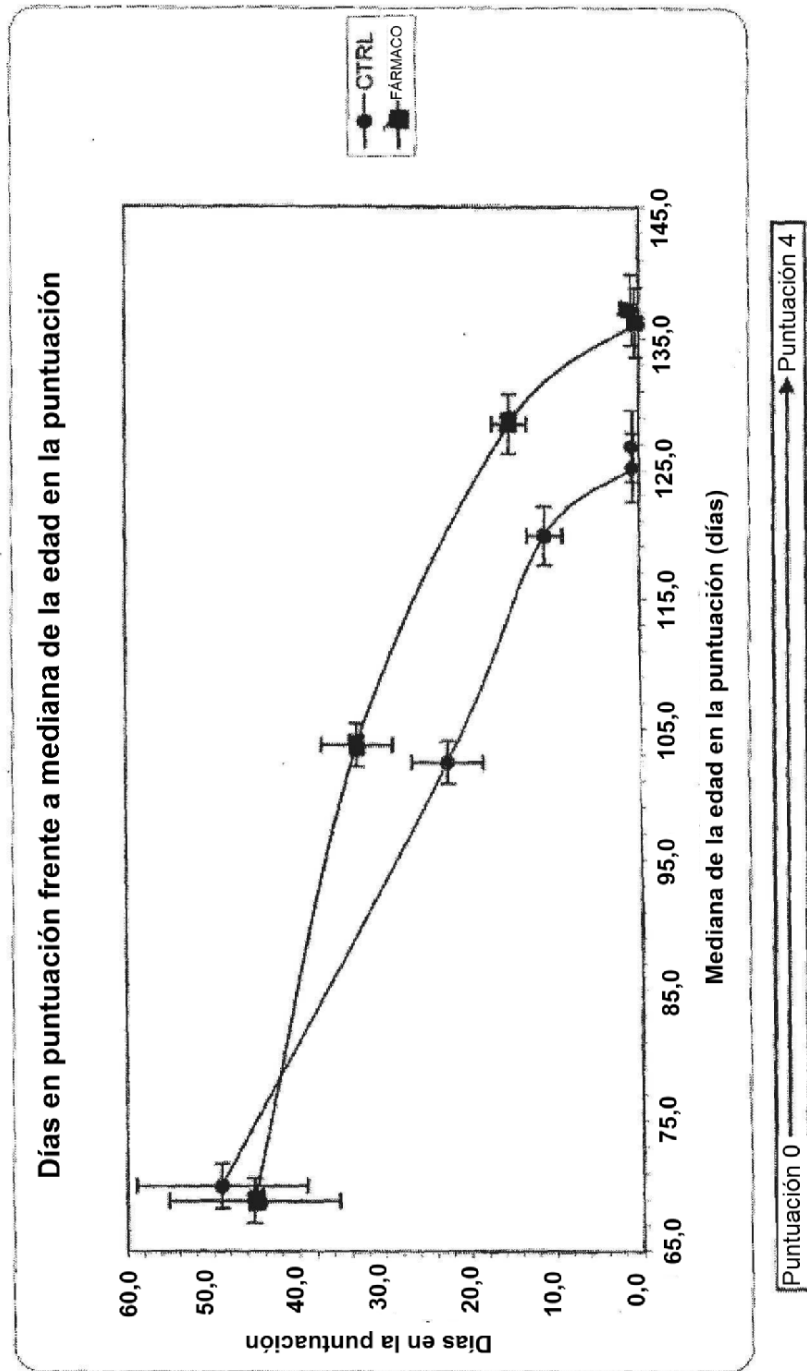


FIG. 8

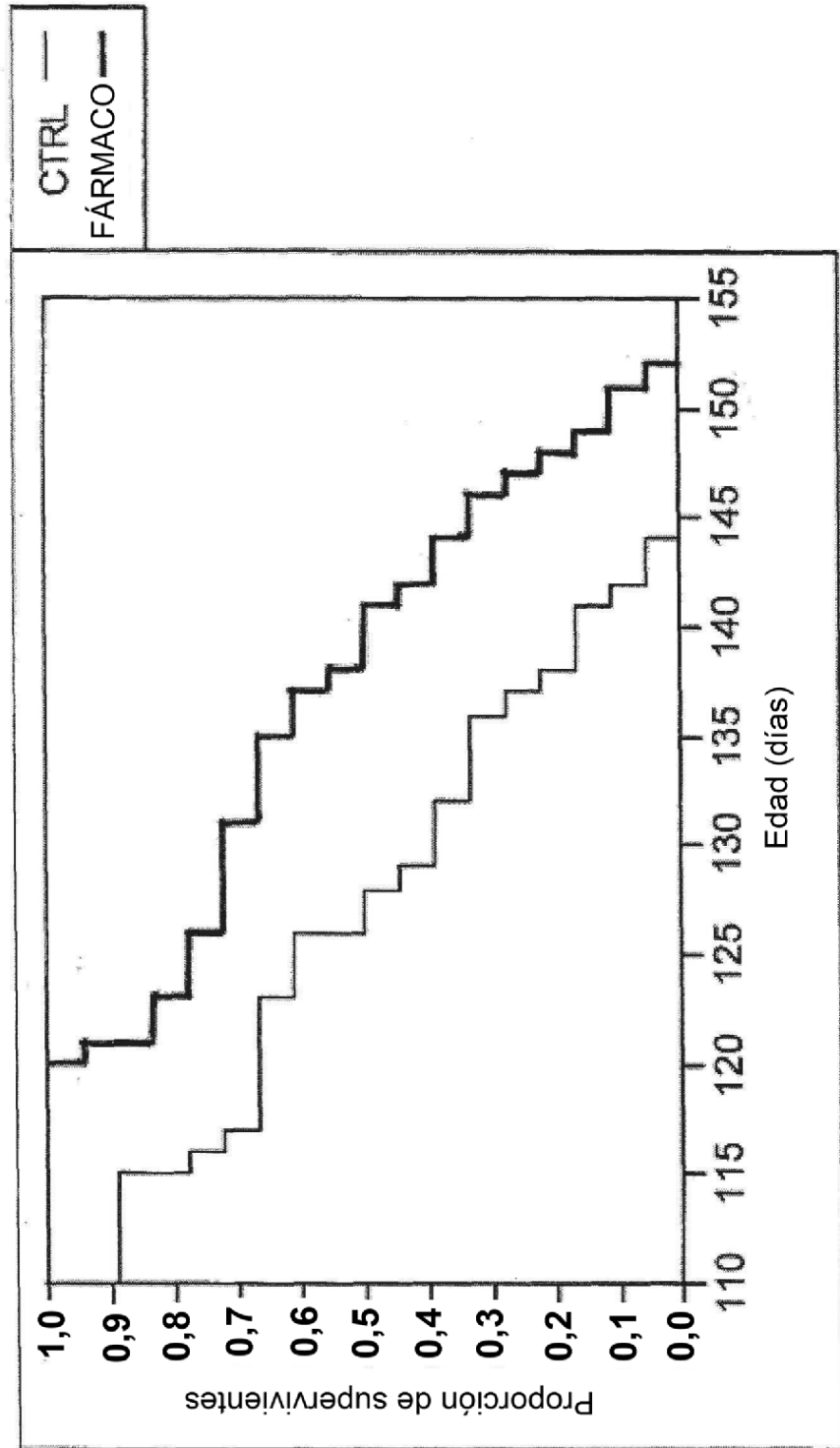


FIG. 9B

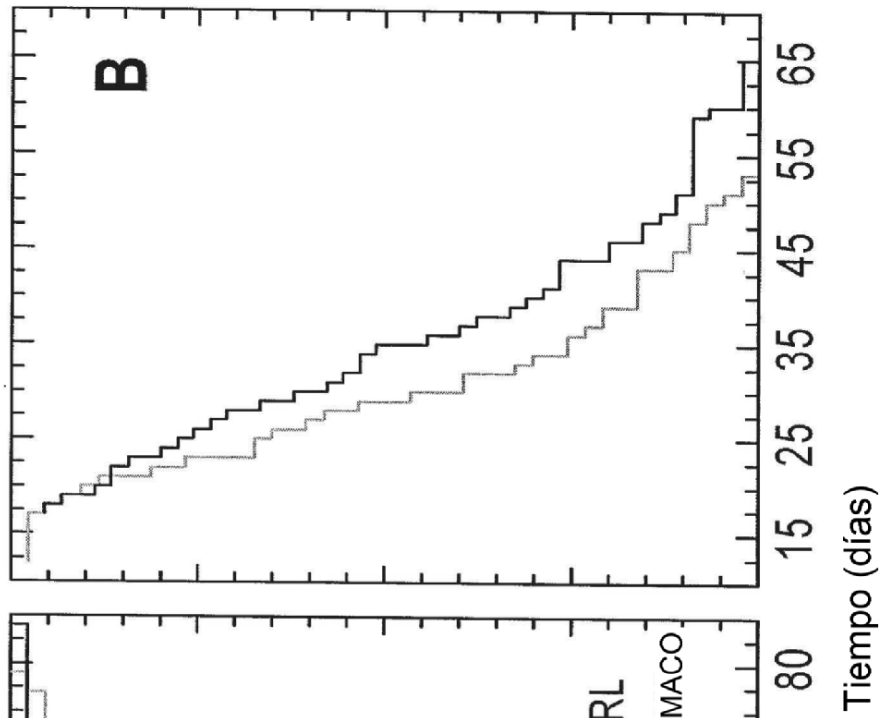


FIG. 9A

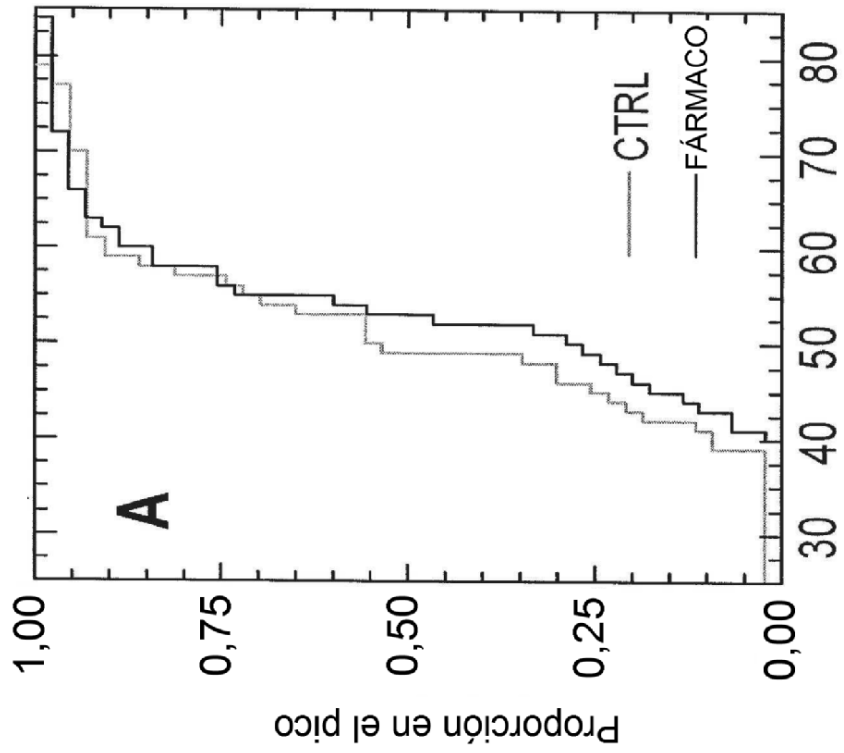


FIG. 9D

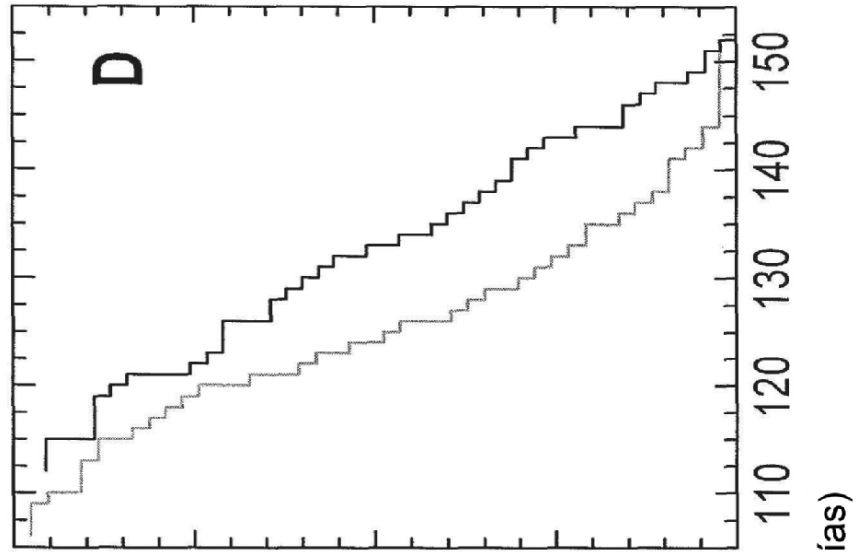


FIG. 9C

