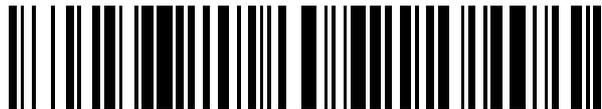


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 876**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2013 PCT/EP2013/058836**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2013 WO13164290**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2013 E 13719831 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2844671**

54 Título: **Anticuerpos contra hemopexina o fragmentos de los mismos para uso en el tratamiento de enfermedades oculares**

30 Prioridad:

**30.04.2012 EP 12382161**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.04.2018**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'  
HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (100.0%)  
Passeig Vall d'Hebrón, 119-129  
08035 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**HERNÁNDEZ PASCUAL, CRISTINA y  
SIMÓ CANONGE, RAFAEL**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**ES 2 663 876 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

Anticuerpos contra hemopexina o fragmentos de los mismos para uso en el tratamiento de enfermedades oculares

- 5 La presente invención se refiere al campo de estrategias médicas para enfermedades oculares que pueden producir una ceguera parcial o total. La invención proporciona herramientas útiles a aplicar en medicina, incluyendo anticuerpos o fragmentos de los mismos.

## ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

Hay varias enfermedades que afectan a la retina (enfermedades de la retina) incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética, edema macular y otras degeneraciones de la retina hereditarias, uveítis, desprendimiento de retina y cánceres de ojo. La retina es la parte del ojo sensible a la luz, y es un tejido complejo que contiene células fotorreceptoras especializadas, los conos y los bastones. Los

15 fotorreceptores están conectados a una red de células nerviosas para el procesamiento local de la información visual, que se envía al cerebro para obtener una imagen visual. Los bastones se localizan principalmente lejos del centro del ojo, en la periferia de la retina. La mayor concentración de conos se encuentra en el centro de la retina, la mácula, que es necesaria para la agudeza visual.

- 20 Debajo de la retina está localizada la coroides. El epitelio pigmentario retiniano (EPR) es una monocapa de células pigmentadas situada entre la neuroretina y la coroides. El EPR es la capa celular pigmentada justo por fuera de la retina neurosensorial que nutre a las células visuales de la retina. Las células del EPR se proyectan, soportan y alimentan a la retina sensible a la luz. La disfunción, alteración y/o pérdida de estas células del EPR juega un papel crítico en el desarrollo de la pérdida de visión. De esta manera, las células del EPR con frecuencia son las primeras
- 25 células en degenerar o sufrir lesiones como resultado de un acontecimiento o situación de traumatismo.

Otra estructura del ojo que tiene gran importancia en muchas de las enfermedades que cursan con disfunción de la retina es la barrera sangre-retina (BRB, por sus siglas en inglés), también denominada barrera hemato-retiniana (BHR). La BHR está constituida por la barrera sangre-retina interna y la barrera sangre-retina externa. La barrera

30 sangre-retina interna está formada por las uniones estrechas de las células endoteliales. La barrera sangre-retina externa es constituida por el EPR, cuyas células también están conectadas por uniones estrechas de las células endoteliales. Las uniones estrechas entre las células del EPR son esenciales para controlar el transporte de líquido y compuestos solubles a través de la BHR, así como de evitar la entrada de cualquier toxico a la retina.

- 35 Por lo tanto, el EPR es un componente clave de la barrera sangre-retina externa para asegurar la integridad de la retina. Las dos enfermedades de la retina más frecuentes debidas a una disfunción de la BHR externa y que por tanto resultan en edema retinal son el edema macular diabético y la degeneración macular asociada a la edad. Además, también ocurre una alteración de la BHR en una amplia variedad de situaciones del ojo, tal como en la uveítis, en traumas, en cirugía intraocular, en retinopatías vasculares, en distrofias hereditarias, etc. (Cunha-Vaz et
- 40 al., "The Blood-Retinal Barrier in Retinal Disease", European Ophthalmic Review -2009, Vol. No. 3, pp.:105-108)

- Se han realizado varias estrategias para identificar las causas de muchas de las enfermedades retinianas relacionadas con la disfunción de la retina. Una de ellas se basa en los resultados del análisis proteómico del humor vítreo. El humor vítreo es el gel transparente que rellena el espacio entre el cristalino y la retina del globo ocular de
- 45 seres humanos y otros vertebrados. Con frecuencia se denomina cuerpo vítreo o simplemente "vítreo".

El análisis proteómico por electroforesis diferencial en gel del vítreo se ha aplicado para la caracterización del proteoma en retinopatía diabética proliferativa y en otras patologías oculares tales como el edema macular diabético. Se encuentran ejemplos de esto en Ramirez et al., "Proteomic Analysis of Human Vitreous Fluid by DIGE: a New

50 Strategy for Identifying Potential Candidates in the Pathogenesis of Proliferative Diabetic Retinopathy", Diabetologia 2007, Vol. 50, pag.:1294-1303; en Gao et al., "Characterization of Vitreous Proteome in Diabetes without Diabetic Retinopathy and Diabetes with Proliferative Diabetic Retinopathy", Journal of Proteome Research - 2008, vol. 7, pág. 2516-2525; y en Hernández et al. "New pathogenic candidates for diabetic macular edema detected by proteomic analysis", Diabetes Care 2010; 33:e92.

55

Actualmente, la mayoría de los tratamientos de las enfermedades que afectan a la retina se ponen en práctica en fases avanzadas de la enfermedad en lugar de para detener o prevenir su desarrollo. De esta manera, en el caso particular del edema macular o en algunas retinopatías (retinopatía diabética proliferativa o no proliferativa), el

60 tratamiento normalmente se basa en fotocoagulación con láser, vitrectomía e inyecciones intravítreas de corticosteroides. Todos estos tratamientos se realizan en fases tardías de estas enfermedades, es decir, no hay tratamientos prematuros eficaces.

Además, implican muchos efectos secundarios (dolor, inflamación, hemorragia, etc.) y además se observa una alta tasa de fracasos.

Es digno de mención que todas estas enfermedades tienen un gran impacto, no solo porque conducen a ceguera o a una alteración de la visión que impide a las personas desarrollar una vida normal (trabajar, caminar, conducir, etc.), sino también porque generalmente están asociadas con trastornos altamente extendidos, tales como diabetes mellitus (en particular de tipo 2) y degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) . La relación con trastornos muy extendidos hace a su vez que todos estos trastornos de la retina de presencia común en la sociedad, representen un desafío para las instituciones sanitarias.

Otras estrategias terapéuticas se basan en la inyección de compuestos capaces de bloquear el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), tales como el anticuerpo Ranibizumab (nombre comercial Lucentis), que se ha aprobado para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) de tipo "húmedo" (también conocida como exudativa o neovascular), una forma común de pérdida de visión relacionada con la edad. El anticuerpo se inyecta por vía intravítrea una vez al mes. Los efectos secundarios más comunes asociados con este tratamiento en los ensayos clínicos eran hemorragia conjuntival, dolor ocular, cuerpos vítreos flotantes, aumento de la presión intraocular e inflamación intraocular.

De esta manera, existe la necesidad de estrategias terapéuticas adicionales para enfrentarse a todas las enfermedades que las que está afectada la retina, en particular las enfermedades en las que están comprometidos el EPR y la BHR.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Al enfrentarse con el problema de encontrar estrategias terapéuticas adicionales para tratar enfermedades que afectan a la retina, o enfermedades retinianas, los inventores proporcionan un nuevo método basado en la inhibición de un compuesto clave implicado en estas patologías, la hemopexina.

De esta manera, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad de la retina que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa, siendo la disfunción una alteración o afectación de la barrera sangre-retina debida a cualquier etiología, donde la enfermedad de la retina se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, retinitis pigmentosa y retinopatía diabética. Se describe un método para tratar y/o prevenir enfermedades de la retina en las que existe disfunción (o lo que es lo mismo, que cursan con disfunción) de la barrera sangre-retina externa, siendo la disfunción una alteración o afectación de la barrera sangre-retina debida a cualquier etiología, donde la enfermedad de la retina se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, retinitis pigmentosa y retinopatía diabética, comprendiendo el método administrar al sujeto que lo necesita un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina. Este aspecto puede formularse, como alternativa, como el uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad de la retina en la que existe disfunción (o que cursa con disfunción) de la barrera sangre-retina externa, siendo la disfunción una alteración o afectación de la barrera sangre-retina debida a cualquier etiología, donde la enfermedad de la retina se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, retinitis pigmentosa y retinopatía diabética .

La hemopexina (HPX), también conocida como beta-1 $\beta$ -glicoproteína, es una proteína que en los seres humanos se codifica por el gen HPX y pertenece a la familia de proteínas hemopexina. El gen HPX humano está localizado en el cromosoma 11 y corresponde al número de entrada del GenBank 3263. La proteína humana traducida tiene 462 aminoácidos y corresponde a la SEQ ID N°: 1, también identificada como P02790, Versión 2 de 1 de octubre de 1996 de UniProt/SwissProt.

La hemopexina se une al grupo hemo con una afinidad mayor que la de cualquier proteína conocida. Su función fisiológica es retirar el grupo hemo liberado o perdido por la renovación de proteínas hemo tales como hemoglobina y, por lo tanto, protege al cuerpo de las lesiones oxidativas que podría causar el grupo hemo libre. Además, la hemopexina libera su ligando unido para la internalización tras la interacción con un receptor específico situado en la superficie de las células hepáticas. Esta función de la hemopexina es conservar el hierro corporal. La hemopexina se sintetiza básicamente en el hígado, pero existen indicios de síntesis en el cerebro y la retina.

En el estado de la técnica, la hemopexina se ha usado como biomarcador de insuficiencia cardiaca aguda como se indica en el documento WO 2008087049, como biomarcador de nefropatía diabética, de acuerdo con los documentos KR 100792630 y WO 2008141285, y como biomarcador de ensayos de terapia en leucemia de acuerdo con el documento JP 2002220349.

Sorprendentemente, y como se ilustrará en los ejemplos proporcionados más adelante, la hemopexina puede romper el EPR. Basándose en este hecho, en el presente documento se proporcionan anticuerpos o fragmentos de los mismos que pueden unirse específicamente a varios epítomos de hemopexina, y que pueden bloquear la interacción de la hemopexina con su receptor situado en la retina. Todos estos anticuerpos previenen la alteración del EPR, o permiten la restitución del EPR alterado que forma parte de la barrera sangre-retina externa.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La FIG. 1 es una imagen de inmunofluorescencia que muestra la proteína ZO-1 de unión estrecha (líneas grises entre las células) tomada por microscopía confocal de una monocapa de células ARPE-19. Los núcleos (tinción DAPI; mostrados como agregados principalmente esféricos) se aprecian como aglomerados de color gris claro (originalmente azul cuando se visualizan en el microscopio). C significa control; HPX significa monocapa de células después del tratamiento con hemopexina; HPX+Ab D17 significa tratamiento con hemopexina y anticuerpo de cabra anti-hemopexina humana adicional; HX+Ab H-300 significa tratamiento con hemopexina y anticuerpo de conejo anti-hemopexina humana adicional; y HX+Ab 013 significa tratamiento con hemopexina y anticuerpo de ratón anti-hemopexina humana adicional.

La FIG. 2 es un diagrama de barras que muestra la permeabilidad al dextrano de células ARPE-19 con diferentes condiciones externas. Las abreviaturas significan lo mismo que en la FIG. 1. 3M y 180M significa 3 minutos y 180 minutos, respectivamente.

#### EXPLICACIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 Las siguientes definiciones se incluyen para facilitar la comprensión de la invención.

En el contexto de la presente invención, se entiende que “epítomo” la parte de una macromolécula de tipo peptídico (o de un antígeno), cuya secuencia y/o configuración espacial es reconocida por el sistema inmune (anticuerpos, células T, células B).

30 Un “fragmento de un anticuerpo” se refiere a una parte del anticuerpo que tiene un tamaño suficiente y una estructura apropiada para unirse a un epítomo presente en la hemopexina. Los ejemplos de fragmentos incluyen F(ab), F(ab’) y Fv.

35 La expresión “enfermedad de la retina” significa cualquier enfermedad en la que está afectada la retina debido a etiologías múltiples y variables.

Una enfermedad de la retina “que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa” o “en la que hay una disfunción de la barrera sangre-retina externa” incluye todas las enfermedades de la retina en las que la barrera sangre-retina externa está alterada o afectada por cualquier etiología (Cunha-Vaz et al. “Blood-retinal barrier” Eur J Ophthalmol-2010, Vol. N° 21(S6), pág.:3-9). Estas enfermedades de la retina pueden ser debidas a una afectación de la barrera sangre-retina externa y por tanto resultar en un edema retiniano. De hecho, la disfunción (alteración o afectación) de la barrera sangre-retina externa conduce a un incremento de la permeabilidad de esta barrera. En una realización preferida, la enfermedad de la retina que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa, o lo que es lo mismo, la enfermedad de la retina debida a una afectación de la barrera sangre-retina externa que resulta en edema retiniano, se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, retinitis pigmentosa y retinopatía diabética. Todas estas enfermedades comparten como característica común que la barrera sangre-retina externa, particularmente la capa constituida por el EPR, está alterada por varias causas. Esta situación patológica conduce a anomalías en la visión, que se perciben como manchas oscuras, ausencia de claridad, visión afectada o ausencia de visión.

Por tanto, la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina para uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades de la retina.

55 Se produce edema macular cuando se recogen depósitos de líquido y proteínas encima o debajo de la mácula del ojo (un área central amarilla de la retina) y hace que se espese y se hinche. Esto generalmente se debe a la alteración de la BHR. La inflamación puede distorsionar la visión central de una persona, ya que la mácula está cerca del centro de la retina en la parte posterior del globo ocular. Esta área contiene conos fuertemente empaquetados que proporcionan una visión central aguda y clara para permitir que una persona vea detalles, formas y colores que están directamente en la dirección de la mirada. El edema macular se clasifica como edema macular cistoideo (EMC) o edema macular difuso.

La retinopatía diabética (RD) sigue siendo la causa principal de ceguera entre los individuos en edad laboral en los países desarrollados. Aunque la retinopatía diabética proliferativa (RDP) es la lesión amenazadora de la vista más común en la diabetes de tipo 1, el edema macular diabético (EMD) es la causa principal de pérdida de agudeza visual en la diabetes de tipo 2. Debido a la alta prevalencia de diabetes de tipo 2, el EMD es la causa principal de deterioro visual en pacientes diabéticos. En un estudio basado en una gran población, la incidencia de EMD durante un periodo de 10 años fue del 20 % en pacientes con diabetes de tipo 1, mientras que esta tasa fue del casi el 40 % en pacientes con diabetes de tipo 2 (Tong et al., "Association of macular involvement with proliferative retinopathy in Type 2 diabetes", Diabet Med-2001, Vol. N° 18, pag.:388-94). Además, el EMD está presente casi invariablemente cuando se detecta RDP en los pacientes diabéticos de tipo 2. La neovascularización debida a hipoxia severa es rasgo característico de la RDP, mientras que la fuga vascular debida a la ruptura de la BHR es el acontecimiento principal implicado en la patogénesis de la EMD.

La degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) es una situación médica que normalmente afecta a los adultos de edad avanzada y produce una pérdida de visión en el centro del campo visual (la mácula) debido a las lesiones de la retina. La degeneración macular puede hacer que sea difícil o imposible leer o reconocer caras, aunque se conserva una visión periférica suficiente para permitir otras actividades de la vida diaria. La causa principal de pérdida visual entre las personas de edad avanzada es la degeneración macular, de la que aparecen signos después de los 50 años. Como se documenta en el mundo occidental, es la causa principal de pérdida visual permanente con una prevalencia del 8,5% en personas de menos de 54 años edad y del 37% en personas de más de 75 años de edad. La DMRE se produce con degeneración de la mácula, que es la parte de la retina responsable de la visión central aguda necesaria para leer o conducir. Se diagnostica como seca (no neovascular) o húmeda (neovascular). Neovascular se refiere al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la mácula, donde se supone que no deberían estar. La forma seca es más común que la húmeda, con aproximadamente un 85-90 % de los pacientes diagnosticados. La forma húmeda de la enfermedad normalmente conduce a una pérdida de visión más grave.

La retinitis pigmentosa (RP) designa un grupo de enfermedades hereditarias que afectan a la retina y se caracterizan por una destrucción gradual de los bastones y los conos, dando como resultado una pérdida progresiva de visión y, posiblemente, ceguera. Normalmente, los bastones son los primeros en degenerar, causando ceguera nocturna y visión de "túnel". En algunos casos puede aparecer una pérdida de visión central posterior en el transcurso de la enfermedad. La velocidad de progresión varía. Hasta la fecha, no se conoce ninguna forma para detener la degeneración de la retina o curar la enfermedad.

El anticuerpo o fragmento del mismo, mencionado en los aspectos de la invención, es útil en el tratamiento de todas estas enfermedades porque puede impedir o minimizar la alteración del epitelio pigmentario retiniano que forma parte de la barrera sangre-retina externa.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo, mencionado en los aspectos de la invención, se une específicamente a hemopexina de mamífero, más preferiblemente a hemopexina humana. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a hemopexina humana de la SEC ID N°: 1. En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo se une específicamente a la SEC ID N°: 2, que es un epítipo de hemopexina humana definido por los aminoácidos 50 a 100 de la SEC ID N°: 1. En otra realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo, mencionado en el primer y segundo aspectos, se une específicamente a la SEC ID N°: 3, que es un epítipo de hemopexina humana definido por los aminoácidos 163 a 462 de la SEC ID N°: 1.

En otra realización preferida adicional, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

Además, en otra realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo o un fragmento del mismo, que se une específicamente a hemopexina, para uso como se ha definido anteriormente, puede formar parte o ser un ingrediente de una composición farmacéutica y/o veterinaria.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento del mismo, que se une específicamente a hemopexina, para uso como se ha definido anteriormente, forma parte o es un ingrediente de una composición farmacéutica y/o veterinaria tópica. Más preferiblemente, el anticuerpo o fragmento del mismo forma parte o es un ingrediente de una composición tópica para administración ocular, tal como una preparación líquida (gotas oftálmicas), o una pomada.

Como alternativa, el anticuerpo o fragmento del mismo, que se une específicamente a hemopexina, para uso como se ha definido anteriormente, puede formar parte o ser un ingrediente de una solución o suspensión inyectable, preferiblemente un líquido inyectable intravítreo (suspensión o solución). También como alternativa, el anticuerpo o fragmento del mismo puede formar parte de una composición farmacéutica y/o veterinaria administrable por vía oral en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, microcápsulas, gránulos, suspensiones, jarabes, polvos liofilizados, preparaciones líquidas, etc. La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para la formulación en

vista de los objetivos particulares de la composición (administración tópica, inyectable u oral) está dentro del alcance de los expertos en la materia de la tecnología farmacéutica.

Por ejemplo, cuando tienen que formularse gotas oftálmicas, tienen que ser isotónicas con las gotas y las soluciones, suspensiones o pomadas incluyen concentraciones de sales del 0,7 % al 0,9 % p/p, por ejemplo, de cloruro sódico o fosfato disódico como agentes tamponantes, conservantes tales como alcohol polivinílico y agentes de viscosidad para asegurar la permanencia en el ojo. Los ejemplos de agentes de viscosidad incluyen, entre otros, derivados de metilcelulosa (es decir metilcelulosa). Por otra parte, cuando los anticuerpos o fragmentos de los mismos forman parte de composiciones inyectables, por ejemplo para inyecciones intravítreas, incluyen agua para inyectables, Tween 20, trihidrato de trehalosa y agentes tamponantes, tales como fosfato disódico o sales de aminoácidos (por ejemplo, sales de histidina).

Otro aspecto de la invención incluye una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende más de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina. La composición farmacéutica y/o veterinaria preferiblemente comprende más de un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina, uniéndose dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos específicamente a diferentes epítomos de hemopexina, o al mismo epítomo con diferentes sensibilidades y especificidades. Esto también puede formularse como una composición farmacéutica y/o veterinaria que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad de la retina que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa, donde la enfermedad de la retina se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, retinitis pigmentosa y retinopatía diabética, junto con cualquier excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la invención proporciona una composición farmacéutica y/o veterinaria que contiene al menos una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina humana de la SEC ID N°: 1, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad de la retina que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa, junto con cantidades adecuadas de excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables.

En una realización más preferida, la composición farmacéutica y/o veterinaria comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 2, y/o un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 3, y/o cualquier otro anticuerpo o fragmento de mismo que se une específicamente a cualquier epítomo de hemopexina humana de la SEC ID N°: 1.

La SEC ID N°: 2 corresponde a la de la hemopexina humana definida por los aminoácidos 50 a 100 de la SEC ID N°: 1.

La SEC ID N°: 3 corresponde al epítomo de hemopexina humana definido por los aminoácidos 163 a 462 de la SEC ID N°: 1.

También se prefiere una composición farmacéutica y/o veterinaria que consiste en un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 2, y cantidades adecuadas de excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables. Otra composición farmacéutica y/o veterinaria preferida consiste en un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 3, y cantidades adecuadas de excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables. Otra realización preferida también es una composición farmacéutica y/o

veterinaria que consiste en un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 2, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 3, y cantidades adecuadas de excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables. Otra realización preferida es una composición farmacéutica y/o veterinaria que consiste en un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 2, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la SEC ID N°: 3, un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una secuencia de hemopexina humana de la SEC ID N°: 1, siendo dicha secuencia diferente de la SEC ID N°: 2 y la SEC ID N°: 3, y cantidades adecuadas de excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables.

A este respecto, la composición farmacéutica y/o veterinaria para uso de acuerdo con la invención puede prepararse para administrarse por varios medios, especialmente se incluyen la administración tópica, más preferiblemente la administración tópica ocular en forma de preparaciones líquidas (soluciones, o suspensiones) que deberán aplicarse como gotas oftálmicas, o en forma de pomadas o cremas también aplicables a los ojos.

De esta manera, en una realización preferida de la invención, las composiciones farmacéuticas y veterinarias son composiciones tópicas. En una realización más preferida, la composición tópica es una composición tópica para administración ocular, tal como una preparación líquida (gotas oftálmicas) o una pomada.

- Aunque se prefiere la administración tópica, son posibles otras formas, tales como la administración inyectable u oral. Por lo tanto, la composición que contiene la cantidad eficaz del o de los anticuerpos o fragmentos de los mismos puede administrarse como una solución o suspensión inyectable, preferiblemente un líquido inyectable intravítreo (suspensión o solución). También como alternativa, la composición puede administrarse por vía oral en
- 5 forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, microcápsulas, gránulos, suspensiones, jarabes, polvos liofilizados, preparaciones líquidas, etc. La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para la formulación en vista del objetivo particular de la composición (administración tópica, inyectable u oral) está dentro del alcance de los expertos en la materia de la tecnología farmacéutica.
- 10 La expresión “farmacéuticamente aceptable” como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un criterio médico razonable, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, en proporción a una relación razonable de beneficios/riesgos. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con
- 15 los demás ingredientes de la formulación. Pueden encontrarse vehículos, excipiente, etc. adecuados en textos farmacéuticos convencionales e incluyen, a modo de ejemplo, conservantes, aglutinantes, humectantes, emolientes y antioxidantes. De forma similar, la expresión “veterinariamente aceptable” significa adecuado para uso en contacto con los tejidos de un animal no humano.
- 20 La expresión “cantidad eficaz”, como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un agente activo (anticuerpo o fragmento del mismo) suficientemente elevada para proporcionar el efecto beneficioso deseado (el tratamiento o prevención de la enfermedad), pero suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del criterio médico.
- 25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra “comprende” y variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprende” y sus variaciones incluye la expresión “que consiste en”. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser
- 30 limitantes de la presente invención. Además, la presente invención incluye todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

#### EJEMPLOS

- 35 Ejemplo 1. La hemopexina altera la barrera sangre-retina externa

Para ilustrar el efecto de los anticuerpos o fragmentos de los mismos para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad de la retina que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa, particularmente con alteración del epitelio pigmentario retiniano, los inventores desarrollaron un ensayo de permeabilidad con la línea

40 celular ARPE-19 (ATCC, Manassas, VA), que es una línea de células inmortalizadas espontánea del EPR. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con CO<sub>2</sub> (5%) en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y medio convencional (F-12 de Ham DMEN) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (SBF, Hyclone, Cultek, Barcelona, España). Se añadieron estreptomomicina (100 mg/ml) y penicilina (100 U/ml) como conservantes. La concentración de glucosa se ajustó a 25 mM. El medio se reemplazó cada tres días. Se usaron células ARPE-19 desde el pase 20 para los estudios de

45 permeabilidad.

La permeabilidad de la BHR externa que es la que incluye el EPR se analizó siguiendo la metodología descrita por García-Ramírez M et al., “Measuring Permeability in Human Retinal Epithelial Cells (ARPE-19): implications for the Study of Diabetic Retinopathy”, *Methods Mol Biol*- 2011; Vol. No. 763, pág.: 179-94.

- 50 En resumen, se sembraron células ARPE-19 a una densidad de 400.000 células/ml que representaban 80.000 células de EPR/pocillo en insertos de poliestireno que tenían una superficie de 0,33 cm<sup>2</sup> (HTS-Transwells; Costar; Corning Inc, NY, Estados Unidos). A esta densidad, las células formaron una monocapa, que se cultivó durante 15 días, reemplazando el medio cada 3 días. El día 15 se aplicaron diferentes tratamientos (4 réplicas/tratamiento) a
- 55 través de la parte apical de los pocillos:

#### Tratamiento con hemopexina

- El medio apical del inserto en la parte apical se reemplazó por medio de suero privado (suero bovino fetal, BFS al 1
- 60 %), y se añadió hemopexina plasmática (50 µg/ml, SIGMA, Madrid, España). 15 horas después, se añadió dextrano fluorescente (10 kDa; SIGMA, Madrid, España) a 100 µg/ml. Posteriormente, se retiraron 200 µl de medio en la parte basal del inserto a intervalos de 30 min, y se reemplazaron por medio nuevo. Las absorbancias se leyeron a una longitud de onda de excitación de 485 nm, y a una longitud de onda de emisión de 528 nm en el espectrofotómetro

SpectraMax Gemini (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La concentración de dextrano se determinó por extrapolación de fluorescencia en una curva patrón.

Tratamiento con anticuerpos anti-hemopexina humana de la SEC ID N°: 1.

5 Para el tratamiento con anticuerpos, se preparó medio con hemopexina (50 mg/ml) en los recipientes y se añadió la concentración exacta de anticuerpo requerido (0,75 µg/ml) a la solución. Después, las soluciones se agitaron con vórtice brevemente y se incubaron durante 1 hora a 37 °C.

10 Los anticuerpos eran: anticuerpo de cabra anti-hemopexina humana Ab D17 (tratamiento HPX+ Ab D17) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, Estados Unidos); anticuerpo de conejo anti-hemopexina humana Ab H-300 (tratamiento HPX+ Ab H-300) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, Estados Unidos); y anticuerpo de ratón anti-hemopexina humana Ab 013 (tratamiento HPX+ Ab 013) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, Estados Unidos).

15 El anticuerpo de cabra anti-hemopexina humana Ab D17 es un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la SEC ID N°: 2, que es el epítipo de la hemopexina humana definido por los aminoácidos 50 a 100 de la SEC ID N°: 1.

20 El anticuerpo de conejo anti-hemopexina humana Ab H-300 es un anticuerpo policlonal que se une específicamente a la SEC ID N°: 3, que es el epítipo de la hemopexina humana definido por los aminoácidos 163 a 462 de la SEC ID N°: 1.

25 El anticuerpo de ratón anti-hemopexina humana Ab 013 es un anticuerpo monoclonal inducido contra la hemopexina nativa de longitud completa de origen humano.

30 La FIG. 2 muestra la permeabilidad al dextrano de células ARPE-19, medida como el dextrano fluorescente detectable en los 200 µl de medio, retirado de la parte basal de los insertos (a los 3 minutos de la adición del tratamiento o a los 180 minutos), del tratamiento con hemopexina y anticuerpos. El tratamiento con hemopexina produce un aumento de permeabilidad significativo, como se deduce por la alta barra de HPX, impidiéndose dicho aumento si la hemopexina se neutralizaba con los diferentes anticuerpos.

35 Por otra parte, se realizó un análisis inmunohistoquímico de la monocapa de ARPE-19. Células que se sometieron a la acción de HPX, o HPX y uno de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Para el tratamiento con anticuerpos, se preparó una solución de 50 µg/ml de hemopexina en Eppendorf en medio privado (F-12 de Ham DMEN, SBF al 1%). Además, también se añadió una solución con el anticuerpo. La solución se agitó con vórtice y se incubó durante 1 h a 37 °C.

40 Para este ensayo, monocapas de células ARPE-19 cultivadas en cristal durante 15 días (Thermo scientific, Menzel-Gläser; Braunschweig, GE), se trataron con hemopexina y los anticuerpos y después se fijaron con metanol frío (-20 °C) durante 10 minutos, se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se bloquearon y permeabilizaron durante una noche (a 4 °C) con albúmina de suero bovino (a 2%) en PBS y Tween al 0,05 %. Además, se incubaron con anticuerpo primario de ratón anti-humano ZO-1 (zona occludens-1; 1:200, Zymed  
45 Laboratories Inc., San Francisco, CA,) durante 1 h. Como anticuerpo secundario se usó anticuerpo anti-ratón Alexa 594 (1:200, Invitrogen, San Diego, CA) durante 1 h.

50 Las preparaciones se montaron con un medio de montaje de fluorescencia que contenía 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos (Vector Laboratories; Burlingame, CA), y después se visualizaron en un microscopio confocal espectral FV1000 (Olympus, Hamburg, Alemania). Originalmente, las imágenes se capturaron en la lente objetivo del microscopio de inmersión (a 60 aumentos).

55 El resultado de este ensayo puede verse en la FIG. 1. El control (C, sin tratamiento) muestra células organizadas, mientras que en el tratamiento con hemopexina (HPX) puede verse una monocapa desorganizada. La prevención de la desorganización se consigue con anticuerpos anti-hemopexina humana.

60 Todos estos datos considerados conjuntamente permiten concluir que, sorprendentemente, los anticuerpos inducidos contra hemopexina evitan la alteración de un modelo de epitelio pigmentario retiniano, pudiendo tratar de esta manera enfermedades de la retina que cursan con alteración del epitelio pigmentario retiniano, y más generalmente que cursan con disfunción de la barrera sangre-retina externa.

Además, y con el objetivo de investigar con más profundidad los mecanismos de acción implicados en este proceso, los inventores han proporcionado en el presente documento pruebas del papel de la hemopexina como agente

capaz de alterar el epitelio pigmentario retiniano, causando de esta manera la desorganización de las uniones intercelulares (uniones estrechas). Esta desorganización de uno de los componentes de la barrera sangre-retina externa afecta funcionalmente a la barrera entera, por ejemplo, causando un aumento de la permeabilidad. Al aumentar la permeabilidad de la barrera se producen problemas serios derivados de la alteración del control del transporte de líquidos y compuestos solubles a través de la barrera sangre-retina, tales como nutrientes. Además, el deterioro de la barrera hace que la retina sea accesible a compuestos tóxicos.

Las realizaciones propuestas en la presente invención, solas o consideradas conjuntamente, así como con los ejemplos descritos anteriormente, permiten concluir que los anticuerpos o fragmentos de los mismos que puede unirse específicamente a varios epítomos de hemopexina, pueden bloquear eficazmente la interacción de la hemopexina con su receptor situado en la retina, impidiendo de esta manera la alteración del EPR, o permitiendo la restricción del EPR alterado. Esto representa incluso una estrategia interesante y también eficaz para tratar y/o prevenir una enfermedad de la retina que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa, entre las que se incluyen enfermedades que evolucionan hasta altas limitaciones funcionales debido al efecto de una visión comprometida.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> Fundació Hospital Universitari Vall d'Hebron- Institut de Recerca

<120> Anticuerpos o fragmentos de los mismos para uso en el tratamiento de enfermedades oculares.

25 <130> P2195PC00

<150> EP12382161  
<151> 2012-04-30

30 <160> 3

<170> PatentIn version 3.5

35 <210> 1  
<211> 462  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40 <400> 1

Met Ala Arg Val Leu Gly Ala Pro Val Ala Leu Gly Leu Trp Ser Leu  
1 5 10 15

45 Cys Trp Ser Leu Ala Ile Ala Thr Pro Leu Pro Pro Thr Ser Ala His  
20 25 30

50 Gly Asn Val Ala Glu Gly Glu Thr Lys Pro Asp Pro Asp Val Thr Glu  
35 40 45

55 Arg Cys Ser Asp Gly Trp Ser Phe Asp Ala Thr Thr Leu Asp Asp Asn  
50 55 60

60 Gly Thr Met Leu Phe Phe Lys Gly Glu Phe Val Trp Lys Ser His Lys  
65 70 75 80

Trp Asp Arg Glu Leu Ile Ser Glu Arg Trp Lys Asn Phe Pro Ser Pro  
85 90 95

# ES 2 663 876 T3

Val Asp Ala Ala Phe Arg Gln Gly His Asn Ser Val Phe Leu Ile Lys  
 100 105 110

**5**  
 Gly Asp Lys Val Trp Val Tyr Pro Pro Glu Lys Lys Glu Lys Gly Tyr  
 115 120 125

**10** Pro Lys Leu Leu Gln Asp Glu Phe Pro Gly Ile Pro Ser Pro Leu Asp  
 130 135 140

**15** Ala Ala Val Glu Cys His Arg Gly Glu Cys Gln Ala Glu Gly Val Leu  
 145 150 155 160

**20** Phe Phe Gln Gly Asp Arg Glu Trp Phe Trp Asp Leu Ala Thr Gly Thr  
 165 170 175

**25** Met Lys Glu Arg Ser Trp Pro Ala Val Gly Asn Cys Ser Ser Ala Leu  
 180 185 190

**30** Arg Trp Leu Gly Arg Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Asn Gln Phe Leu Arg  
 195 200 205

**35** Phe Asp Pro Val Arg Gly Glu Val Pro Pro Arg Tyr Pro Arg Asp Val  
 210 215 220

**40** Arg Asp Tyr Phe Met Pro Cys Pro Gly Arg Gly His Gly His Arg Asn  
 225 230 235 240

**45** Gly Thr Gly His Gly Asn Ser Thr His His Gly Pro Glu Tyr Met Arg  
 245 250 255

**50** Cys Ser Pro His Leu Val Leu Ser Ala Leu Thr Ser Asp Asn His Gly  
 260 265 270

**55** Ala Thr Tyr Ala Phe Ser Gly Thr His Tyr Trp Arg Leu Asp Thr Ser  
 275 280 285

**60** Arg Asp Gly Trp His Ser Trp Pro Ile Ala His Gln Trp Pro Gln Gly  
 290 295 300

**65** Pro Ser Ala Val Asp Ala Ala Phe Ser Trp Glu Glu Lys Leu Tyr Leu  
 305 310 315 320

**70** Val Gln Gly Thr Gln Val Tyr Val Phe Leu Thr Lys Gly Gly Tyr Thr  
 325 330 335

**75** Leu Val Ser Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Glu Lys Glu Val Gly Thr Pro  
 340 345 350

ES 2 663 876 T3

His Gly Ile Ile Leu Asp Ser Val Asp Ala Ala Phe Ile Cys Pro Gly  
 355 360 365

5

Ser Ser Arg Leu His Ile Met Ala Gly Arg Arg Leu Trp Trp Leu Asp  
 370 375 380

10 Leu Lys Ser Gly Ala Gln Ala Thr Trp Thr Glu Leu Pro Trp Pro His  
 385 390 395 400

15 Glu Lys Val Asp Gly Ala Leu Cys Met Glu Lys Ser Leu Gly Pro Asn  
 405 410 415

Ser Cys Ser Ala Asn Gly Pro Gly Leu Tyr Leu Ile His Gly Pro Asn  
 420 425 430

20

Leu Tyr Cys Tyr Ser Asp Val Glu Lys Leu Asn Ala Ala Lys Ala Leu  
 435 440 445

25

Pro Gln Pro Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Gly Cys Thr His  
 450 455 460

30

<210> 2  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35

<400> 2

Cys Ser Asp Gly Trp Ser Phe Asp Ala Thr Thr Leu Asp Asp Asn Gly  
 1 5 10 15

40

Thr Met Leu Phe Phe Lys Gly Glu Phe Val Trp Lys Ser His Lys Trp  
 20 25 30

45

Asp Arg Glu Leu Ile Ser Glu Arg Trp Lys Asn Phe Pro Ser Pro Val  
 35 40 45

50

Asp Ala Ala  
 50

55

<210> 3  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

60

<400> 3

Gln Gly Asp Arg Glu Trp Phe Trp Asp Leu Ala Thr Gly Thr Met Lys  
 1 5 10 15

# ES 2 663 876 T3

Glu Arg Ser Trp Pro Ala Val Gly Asn Cys Ser Ser Ala Leu Arg Trp  
 20 25 30

**5** Leu Gly Arg Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Asn Gln Phe Leu Arg Phe Asp  
 35 40 45

**10** Pro Val Arg Gly Glu Val Pro Pro Arg Tyr Pro Arg Asp Val Arg Asp  
 50 55 60

**15** Tyr Phe Met Pro Cys Pro Gly Arg Gly His Gly His Arg Asn Gly Thr  
 65 70 75 80

Gly His Gly Asn Ser Thr His His Gly Pro Glu Tyr Met Arg Cys Ser  
 85 90 95

**20** Pro His Leu Val Leu Ser Ala Leu Thr Ser Asp Asn His Gly Ala Thr  
 100 105 110

**25** Tyr Ala Phe Ser Gly Thr His Tyr Trp Arg Leu Asp Thr Ser Arg Asp  
 115 120 125

**30** Gly Trp His Ser Trp Pro Ile Ala His Gln Trp Pro Gln Gly Pro Ser  
 130 135 140

**35** Ala Val Asp Ala Ala Phe Ser Trp Glu Glu Lys Leu Tyr Leu Val Gln  
 145 150 155 160

Gly Thr Gln Val Tyr Val Phe Leu Thr Lys Gly Gly Tyr Thr Leu Val  
 165 170 175

**40** Ser Gly Tyr Pro Lys Arg Leu Glu Lys Glu Val Gly Thr Pro His Gly  
 180 185 190

**45** Ile Ile Leu Asp Ser Val Asp Ala Ala Phe Ile Cys Pro Gly Ser Ser  
 195 200 205

**50** Arg Leu His Ile Met Ala Gly Arg Arg Leu Trp Trp Leu Asp Leu Lys  
 210 215 220

**55** Ser Gly Ala Gln Ala Thr Trp Thr Glu Leu Pro Trp Pro His Glu Lys  
 225 230 235 240

Val Asp Gly Ala Leu Cys Met Glu Lys Ser Leu Gly Pro Asn Ser Cys  
 245 250 255

**60** Ser Ala Asn Gly Pro Gly Leu Tyr Leu Ile His Gly Pro Asn Leu Tyr  
 260 265 270

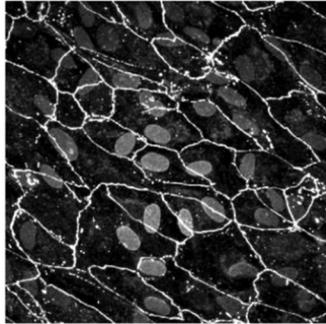
# ES 2 663 876 T3

Cys Tyr Ser Asp Val Glu Lys Leu Asn Ala Ala Lys Ala Leu Pro Gln  
275 280 285

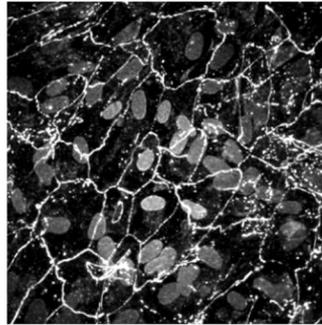
5 Pro Gln Asn Val Thr Ser Leu Leu Gly Cys Thr His  
290 295 300

**REIVINDICACIONES**

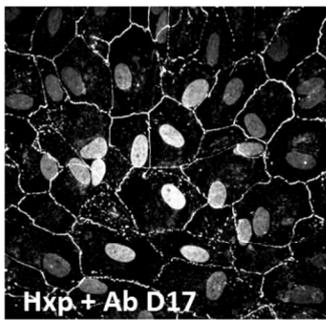
1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a hemopexina para uso en el tratamiento  
5 y/o prevención de una enfermedad de la retina que cursa con disfunción de la barrera sangre-retina externa, siendo la disfunción una alteración o afectación de la barrera sangre-retina debida a cualquier etiología, donde la enfermedad de la retina se selecciona del grupo que consiste en degeneración macular relacionada con la edad, edema macular, retinitis pigmentosa y retinopatía diabética.
- 10 2. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la hemopexina es hemopexina de mamífero.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la hemopexina de mamífero es hemopexina humana de la SEC ID N°: 1.
- 15 4. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que se une específicamente a la SEC ID N°: 2.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que se une  
20 específicamente a la SEC ID N°: 3.
6. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es un anticuerpo policlonal o un fragmento de dicho anticuerpo policlonal.
- 25 7. El anticuerpo o fragmento del mismo para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de dicho anticuerpo monoclonal.
8.  
El anticuerpo o un fragmento del mismo para uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, como  
30 ingrediente de una composición farmacéutica y/o veterinaria.
9. El anticuerpo o un fragmento del mismo para uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, como ingrediente de una composición farmacéutica y/o veterinaria tópica.
- 35 10. El anticuerpo o un fragmento del mismo para uso como se define en la reivindicación 9, que es para administración ocular.
11. El anticuerpo o un fragmento del mismo para uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, como un ingrediente de una composición farmacéutica y/o veterinaria inyectable.
- 40 12. El anticuerpo o un fragmento del mismo para uso como se define en la reivindicación 12, que es para administración intravítrea.



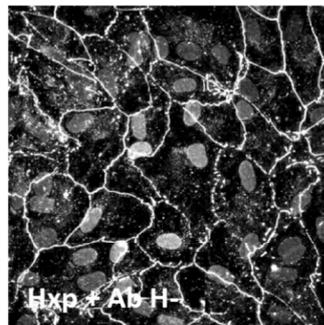
(C)



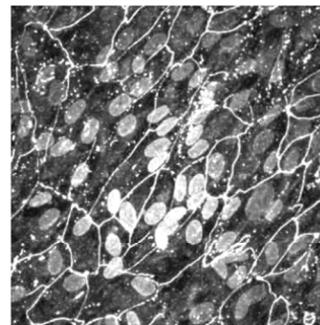
(HPX)



(HXP + Ab D17)

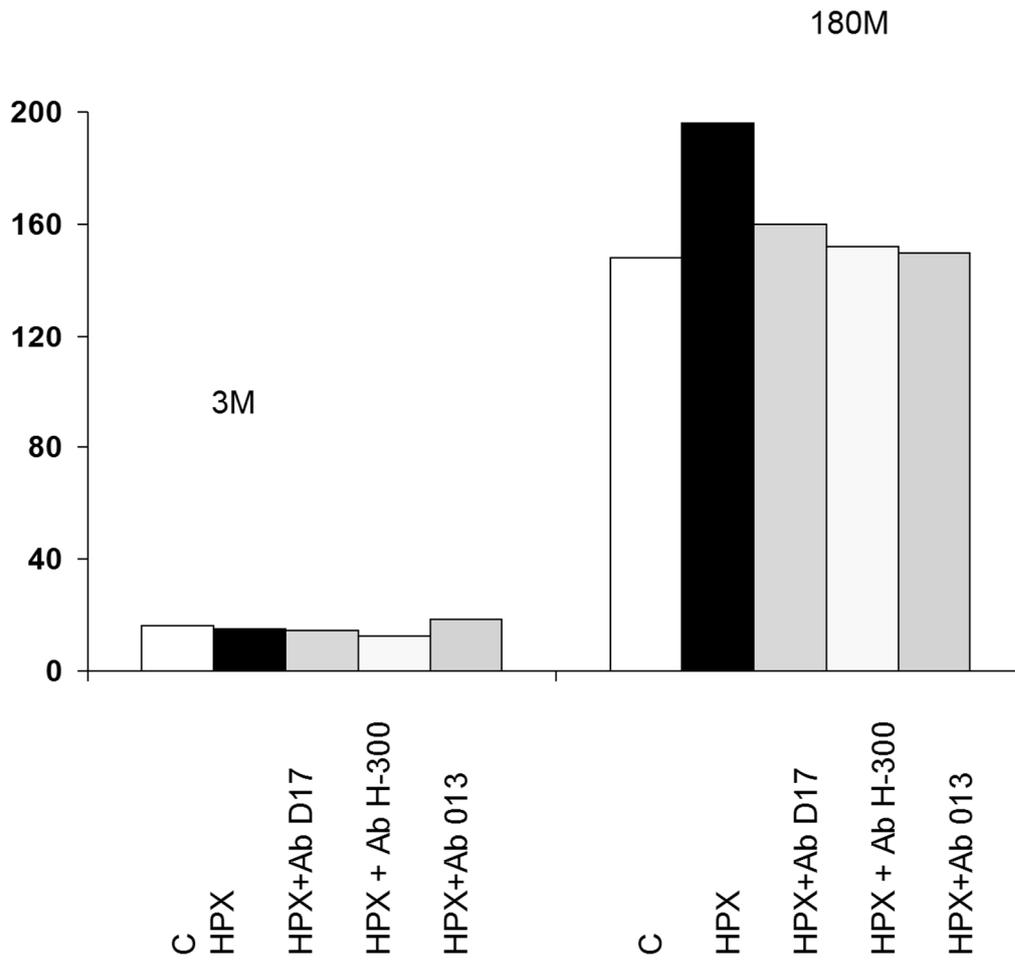


(HXP + Ab H-300)



(HXP + Ab 013)

**FIG. 1**



**FIG. 2**