



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 693 602

(51) Int. Cl.:

A61P 9/10 (2006.01) A61K 31/426 A61K 38/40 (2006.01) A61K 31/472 (2006.01) (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 39/04

(2006.01)

A61K 31/16 (2006.01) A61K 31/198 A61K 31/4196 A61K 31/4412 A61P 25/28 (2006.01) A61K 31/4704 (2006.01) A61K 31/223

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 08.06.2015 E 15171056 (3) (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 12.09.2018 EP 2977056

- (54) Título: Transferrina para su utilización en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos asociados al factor inducible por hipoxia (HIF)
- (30) Prioridad:

11.07.2014 US 201462023446 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 12.12.2018

(73) Titular/es:

GRIFOLS WORLDWIDE OPERATIONS LIMITED Grange Castle Business Park Grange Castle Clondalkin Dublin 22, IE

(72) Inventor/es:

ROSS, DAVID A. y CRUMRINE, RALPH CHRISTIAN

(74) Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

DESCRIPCIÓN

Transferrina para su utilización en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos asociados al factor inducible por hipoxia (HIF).

SECTOR DE LA INVENCIÓN

5

10

20

25

30

35

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una mezcla de apotransferrina y holotransferrina para su utilización en el tratamiento de trastornos relacionados con el factor inducible por hipoxia (HIF) seleccionados entre la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Proteger las células, y especialmente las neuronas, frente al daño causado por diversos factores, entre los que se incluyen apoplejía, enfermedad neurodegenerativa, lesión traumática, etc., es importante para la recuperación a largo plazo de la función celular o neuronal. El tratamiento terapéutico de células o neuronas lesionadas por agentes individuales tiene ventajas, pero a menudo no es suficiente para movilizar la complejidad de las moléculas necesarias para ayudar a restaurar la función completa.

La respuesta fisiológica para proteger a las neuronas u otras células de eventos hipóxicos o isquémicos, o de la oxidación, habitualmente se considera mediada por la expresión de genes que se regulan positivamente mediante la vía de señalización del factor inducible por hipoxia (HIF), una vía reguladora clave que es sensible a las agresiones celulares. En el cerebro, se cree que la regulación positiva de las moléculas neuroprotectoras es un factor crítico para proteger las células frente al daño irreparable. Sin embargo, pocos medicamentos disponibles son lo suficientemente capaces de prevenir, restaurar o reducir el daño a las neuronas y otros tejidos. Además, habitualmente son tóxicos, tienen vidas medias cortas, o las dos cosas. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO2006/20727 propone la utilización de deferoxamina como agente neuroprotector contra los efectos nocivos de la reperfusión; sin embargo, la administración de deferoxamina plantea problemas debido a su vida media reducida en plasma.

Las transferrinas son glicoproteínas del plasma sanguíneo que se unen al hierro y que controlan el nivel de hierro libre en los fluidos biológicos. Las transferrinas funcionan como el transportador principal de hierro en la circulación, en la que existen en una forma de apotransferrina sin hierro (ApoTf), como transferrina monoférrica, o como holotransferrina diférrica (HoloTf). Típicamente, el hierro se une al 30% de todos los sitios de unión a transferrina en circulación. La función de neuroprotección de ApoTf pero no de HoloTf se ha dado a conocer por Chen-Roetling y otros (Chen-Roetling J., Chen L., y Regan R.F. Neuropharmacology, 2011; 60 (2-3): 423-431.), lo que sugiere que ApoTf puede mitigar la neurotoxicidad de la hemoglobina después de una hemorragia intracerebral.

40 Los presentes inventores han descubierto que es posible potenciar las propiedades neuroprotectoras de la administración de transferrina en pacientes, combinándola con otros agentes quelantes de hierro o con otra proteína plasmática de unión a hierro, tal como apolactoferrina, que se ha demostrado que aumenta los niveles de proteína HIF-1α en algunos tejidos y tienen efectos en los niveles de EPO en plasma (Zakharova ET y otros, Biometals (2012) 25: 1247-1259). Se ha sugerido que las moléculas con capacidad de quelación de hierro son activadores de la vía HIF bloqueando la actividad de prolilhidroxilasas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden una mezcla de apotransferrina y holotransferrina para su utilización tal como se reivindica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "transferrina" y su plural se refiere a una mezcla de ApoTf y HoloTf.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

55 La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

La figura 1 muestra que las composiciones de ApoTf mayoritaria y HoloTf mayoritaria inducen la proteína HIF-1 α en condiciones de normoxicidad e hipoxia 6 horas después del tratamiento.

60 La figura 2 muestra que las composiciones de ApoTf mayoritaria y HoloTf mayoritaria inducen la proteína HIF-1α en condiciones normóxicas 24 horas después del tratamiento.

La figura 3 muestra que las mezclas de ApoTf y HoloTf inducen la proteína HIF- 1α 6 horas después del tratamiento.

65 La figura 4A muestra los niveles de expresión de ARNm de Glut1 en condiciones de normoxicidad e hipoxia en presencia de HSA, apotransferrina o holotransferrina.

ES 2 693 602 T3

La figura 4B muestra los niveles de expresión de ARNm de VEGF en condiciones de normoxicidad e hipoxia en presencia de HSA, apotransferrina o holotransferrina.

- 5 La figura 5A muestra la toxicidad in vitro o in vivo de composiciones que comprenden HoloTf mayoritaria o ApoTf mayoritaria.
 - La figura 5B muestra las puntuaciones de Bederson modificado y de Comportamiento general para ratas tratadas por vía intravenosa con un fármaco que comprende la ApoTf mayoritaria o HoloTf.
 - La figura 6A muestra un gráfico de dispersión del volumen de infarto de tratamiento con ApoTf (385 mg/kg, IV) o con solución salina en un modelo de rata de oclusión transitoria de la arteria cerebral media (MCAo).
- La figura 6B muestra secciones coronales teñidas con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) de un control representativo y una rata tratada con ApoTf.
 - La figura 7 muestra la protección de las células neuronales de los efectos tóxicos de Abeta (1-42) mediante mezclas que comprenden principalmente ApoTf y HoloTf.
- La figura 8A muestra el tratamiento de células neuronales SH-SY5Y con 4 mg/ml de ApoTf mayoritaria y con una combinación de ApoTf mayoritaria y DFO o IOX2.
 - La figura 8B muestra el tratamiento de células neuronales SH-SY5Y con 4 mg/ml de la proteína indicada y con una combinación de la proteína indicada y M30 plus 10 μ M.
 - La figura 8C muestra el tratamiento de células neuronales SH-SY5Y con 4 mg/ml de la proteína indicada y con una combinación de la proteína indicada y DFO 200 μM.
- La figura 9A muestra los niveles de expresión de ARNm de Glut1 en respuesta a las combinaciones de apotransferrina mayoritaria y DFO o IOX2.
 - La figura 9B muestra los niveles de expresión de ARNm de VEGF en respuesta a las combinaciones de apotransferrina mayoritaria y DFO o IOX2.
- 35 La figura 10A muestra los niveles de HIF-1α después del tratamiento de las células epiteliales primarias de los túbulos proximales renales humanos (RPTEC) con 4 mg/ml de apotransferrina mayoritaria, holotransferrina mayoritaria o varias mezclas de cada una durante 6 horas bajo niveles normales de oxígeno.
- La figura 10B muestra los niveles de HIF-1α después del tratamiento de células del epitelio cortical primario (HRCE) con 4 mg/ml de apotransferrina mayoritaria, holotransferrina mayoritaria o diversas mezclas de cada uno durante 6 horas bajo niveles normales de oxígeno.
 - La figura 11A muestra la viabilidad de las células epiteliales del túbulo proximal renal humano primario (RPTEC) o del epitelio cortical (HRCE) cuando se tratan con ApoTf mayoritaria o DFO durante 48 horas.
 - La figura 11B muestra la viabilidad de células RPTEC o HRCE cuando se tratan durante 72 horas con 4 mg/ml de la ApoTf mayoritaria, HoloTf mayoritaria, mezclas de transferrina.
- La figura 12 muestra la activación de caspasa 3/7 dentro de células de riñón primarias humanas en presencia de 50 ApoTf mayoritaria o DFO.
 - La figura 13A muestra los niveles de HIF-1 α después del tratamiento de la línea celular de pulmón NCI-H1650 con 4 mg/ml de apotransferrina mayoritaria, holotransferrina mayoritaria o pd-transferrina durante 6 horas en niveles normales de oxígeno.
 - La figura 13B muestra los niveles de HIF- 1α después del tratamiento de células de hepatocitos primarios con 4 mg/ml de apotransferrina mayoritaria, holotransferrina mayoritaria o pd-transferrina durante 6 horas en niveles normales de oxígeno.
- La figura 14A muestra la viabilidad de la línea celular de pulmón humano, NCI-H1650, cuando se trata durante 72 horas con 4 mg/ml de ApoTf mayoritaria, HoloTf mayoritaria o pd-transferrina.
 - La figura 14B muestra la viabilidad de los hepatocitos humanos primarios cuando se tratan durante 72 horas con 4 mg/ml de ApoTf mayoritaria, HoloTf mayoritaria o pd-transferrina.

65

10

25

45

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCIÓN

10

15

20

25

30

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una mezcla de apotransferrina y holotransferrina para su utilización tal como se reivindica. Preferentemente, la transferrina es recombinante, derivada del plasma (pd) o transferrina químicamente sintetizada.

Cuando la transferrina es recombinante, se puede obtener de acuerdo con cualquier técnica conocida en la técnica de expresión, producción y purificación de proteínas. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de la transferrina se puede insertar en cualquier vector adecuado para la expresión en la célula huésped elegida, por ejemplo, bacterias (*Escherichia coli, Bacilus subtilis, Salmonella typhimurium, Pseudomonas, Streptomyces y Staphylococcus*), levadura (*Saccharomyces, Pichia* o *Kuyveromyces genus*), células de insectos (*Bombyx mori, Mamestra brassicae, Spodoptera frugiperda, Trichoplusia* ni o *Drosophila melanogaster*) o células de mamífero (células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS-1), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células 293 transformadas con adenovirus humano, células L-929 de ratón, líneas celulares de hámster HaK, células 3T3 murinas derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, línea celular CV-1, cepas celulares derivadas de cultivo in vitro de tejido primario o explantes primarios).

Se contempla que la transferrina derivada de plasma se aísle de una fracción adecuada de plasma. En una realización preferente, la transferrina se aísla de la fracción IV, y más preferentemente, de la fracción IV-I o fracción IV-IV, del procedimiento de fraccionamiento de Cohn. En otra realización preferente, la transferrina deriva de una fracción residual a partir de un procedimiento para purificar el inhibidor de alfa₁-proteinasa (A1PI). Preferentemente, dicho procedimiento de purificación es el siguiente:

- (a) eliminar una parte de proteínas contaminantes de la solución acuosa mediante precipitación para obtener una solución purificada que contiene A1PI;
- (b) pasar la solución purificada a través de una resina de intercambio aniónico de modo que A1PI se una a la resina de intercambio aniónico:
- (c) eluir A1PI a partir de la resina de intercambio aniónico para obtener una solución eluida que contiene A1PI;
- (d) pasar la solución eluida a través de una resina de intercambio catiónico;
- (e) recoger un flujo a través de la resina de intercambio catiónico que contiene A1PI; y
- (f) poner en contacto la solución eluida de la etapa (c) o el flujo de la etapa (e) con un adsorbente hidrófobo de, como mínimo, un medio HIC.

En la realización más preferente, la solución acuosa utilizada en el procedimiento de purificación (A1PI) mencionado anteriormente es sangre, plasma o una fracción derivada de plasma.

En una realización adicional, la transferrina comprende, como mínimo, una modificación postraduccional, preferentemente pegilación, glicosilación, polisialilación o una combinación de las mismas.

- 40 En una realización, la transferrina utilizada en el procedimiento de tratamiento de la presente invención es una transferrina de longitud completa con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID No. 1. Las realizaciones adicionales abarcan la utilización en el procedimiento de tratamiento de la presente invención de derivados de transferrina con, como mínimo, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de homología o similitud con la SEQ ID No. 1 siempre que se conserve el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%,
- el 98%, el 99% o 100% de la actividad quelante de hierro de la transferrina de tipo salvaje. Una persona experta en la técnica reconocerá fácilmente que las diferencias en la homología entre la transferrina y la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1 pueden deberse a sustituciones de aminoácidos conservativas y/o no conservativas que no afectan la función quelante del hierro.
- 50 En otra realización, se contempla que se utilice un fragmento de la transferrina de tipo salvaje (SEQ ID No. 1) en el procedimiento de tratamiento de la presente invención. Una persona experta en la técnica seleccionará fácilmente un fragmento adecuado de la transferrina de tipo salvaje, de modo que conserve la actividad quelante de hierro de la transferrina de tipo salvaje.
- En una realización adicional, la transferrina se modifica para aumentar su afinidad de unión al hierro. Una persona experta en la técnica consideraría que los residuos o las zonas que se van a modificar pueden determinarse mediante diversas técnicas conocidas en la técnica como, por ejemplo, mutagénesis dirigida, cribado de alanina, cristalografía o análisis de deleciones y/o inserciones.
- Se contempla que la transferrina utilizada en el procedimiento de tratamiento de la presente invención esté en forma de un conjugado de proteína o una proteína de fusión para, por ejemplo, extender su vida media en sangre, en la que la transferrina está conjugada o fusionada a cualquier otra proteína, fragmento de proteína, dominio de proteína o péptido. En una realización preferente, la transferrina se conjuga o fusiona a un fragmento, dominio o péptido de longitud completa de albúminas de suero (como por ejemplo, bovino, de conejos o de humanos), hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina (incluido el dominio Fc de inmunoglobulinas), tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico o un toxoide de otras bacterias patógenas, tales como difteria, E. coli, cólera o H.

pylori, o un derivado atenuado de toxina, citocinas, quimiocinas, péptido 1 de tipo glucagón, exendina-4 o XTEN.

La transferrina utilizada en el procedimiento de la presente invención es una mezcla de ApoTf y HoloTf y, preferentemente, dicha mezcla tiene una relación porcentual entre 99:1 y 30:70 (ApoTf: HoloTf), aún más preferentemente, dicha mezcla tiene una proporción o relación porcentual que es comparable a la de una fracción obtenida o purificada a partir de fluidos biológicos. En la realización más preferente, la mezcla de ApoTf y HoloTf utilizada en el procedimiento de la presente invención tiene una relación en proporción o porcentaje de ApoTf y HoloTf como la proporción o relación porcentual de ApoTf y HoloTf presente en sangre o plasma humanos.

En el procedimiento de la presente invención, la composición puede comprender además un quelante de hierro o un inhibidor de la enzima PHD2. En una realización preferente, el quelante de hierro se selecciona entre el grupo que comprende M30, deferoxamina (DFO), deferasirox, deferiprona, deferitrina, L1NAII, CP363, CP502, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) IOX2 o combinaciones de los mismos. En la realización más preferente, el quelante de hierro es deferoxamina (DFO). En una realización preferente, el inhibidor de la enzima PHD2 es IOX2, IOX3, dimetiloxialil glicina u otras moléculas de sitio de unión a 2-oxoglutarato.

Aunque la presente invención se describirá a continuación en conexión con ciertas realizaciones preferentes en los siguientes ejemplos, para que los aspectos de la misma puedan comprenderse y apreciarse más completamente, no se pretende que la presente invención quede limitada a estas realizaciones particulares. Por el contrario, se pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir dentro del alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. De este modo, los siguientes ejemplos que incluyen realizaciones preferentes servirán para ilustrar la práctica de la presente invención, entendiéndose que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y solamente para propósitos de discusión ilustrativa de las realizaciones preferentes de la presente invención y se presentan con el objetivo de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y comprensible de los procedimientos de formulación, así como de los principios y aspectos conceptuales de la presente invención.

EJEMPLOS

5

20

25

35

50

60

Los experimentos realizados en los siguientes ejemplos se trataron con transferrina que comprende las formas Apo u Holo. Se evaluó una amplia variedad de mezclas de transferrina; los porcentajes relativos de ApoTf y HoloTf, que comprenden la ApoTf mayoritaria, la HoloTf mayoritaria, pdTf y mezclas de transferrina específicamente definidas se destacan en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1:

	<u>Mayoría</u>	<u>Mayoría</u>			•	
	Apo	Holo	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	pdTf
% de ApoTf	98	30	95	64	33	68
%de HoloTf	2	70	5	36	67	32

Ejemplo 1. Las composiciones que comprenden la ApoTf mayoritaria y la HoloTf mayoritaria inducen la proteína HIF-1α en condiciones de normoxicidad e hipoxia después de 6 horas de tratamiento.

40 Se trataron células de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y cultivadas en medio sin suero con ApoTf y HoloTf derivadas de plasma (en ambos casos a una concentración de 1 mg/ml y 4 mg/ml) durante 6 horas en condiciones de normoxia (21% de oxígeno) e hipoxia (1% de oxígeno). Como controles, se utilizan células no tratadas o células tratadas con albúmina sérica humana (HSA) a una concentración de 1 mg/ml o 4 mg/ml. Después de 6 horas, se recogieron las proteínas intracelulares y se analizaron para determinar los niveles de proteína HIF-1α mediante ELISA.

Tal como se muestra en la figura 1, se produjo un aumento significativo en los niveles de proteína celular de HIF- 1α en condiciones tanto normóxicas como hipóxicas y en las dos concentraciones analizadas para ApoTf. Con respecto a HoloTf, se observó un aumento significativo en los niveles de proteína celular de HIF- 1α tanto para las condiciones hipóxicas como las normoxícas cuando las células se trataron con la concentración de 1 mg/ml y para las condiciones normóxicas cuando las células se trataron con la concentración de 4 mg/ml. Cuando las células se trataron con la concentración de 4 mg/ml de HoloTf, se observó una tendencia hacia un aumento en los niveles de proteína celular de HIF- 1α .

55 **Ejemplo 2.** Las composiciones que comprenden la ApoTf mayoritaria y la HoloTf mayoritaria inducen la proteína HIF-1α en condiciones normóxicas después de 24 horas de tratamiento.

Se repitió el experimento realizado en el ejemplo 1, pero realizando tratamientos durante 24 horas y solo bajo condiciones normóxicas. Después de 24 horas, se recogieron las proteínas intracelulares y se analizaron para determinar los niveles de proteína HIF-1 α mediante ELISA. La figura 2 muestra los resultados obtenidos para este experimento. Tal como puede verse en dicha figura, ApoTf aumentó los niveles de proteína celular de HIF-1 α en las

dos concentraciones probadas. Para HoloTf se observó un aumento significativo de los niveles de proteína celular de HIF-1α cuando se realizó el tratamiento utilizando una concentración de 4 mg/ml y se observó una tendencia hacia un aumento de dicha proteína cuando se utilizó la concentración de 1 mg/ml.

5 **Ejemplo 3.** Las mezclas de ApoTf y HoloTf inducen la proteína HIF-1α después de 6 horas de tratamiento.

Después de 6 horas, se recogieron proteínas intracelulares y se analizaron los niveles de proteína HIF- 1α mediante ELISA. Tal como se muestra en la figura 3, se observó un aumento de los niveles de proteína celular de HIF- 1α después de 6 horas de tratamiento con ApoTf mayoritaria derivada de plasma, HoloTf mayoritaria o mezclas de las mismas en condiciones normóxicas. Tal como se puede observar también en dicha figura, todas las mezclas de ApoTf y HoloTf regulan positivamente la proteína HIF- 1α en células neuronales SH-SY5Y.

Ejemplo 4. Niveles de expresión de ARNm de Glut1 y VEGF en condiciones de normoxicidad e hipoxia en presencia de HSA, apotransferrina u holotransferrina.

La estabilización de la proteína HIF-1α y el aumento de la misma conduce normalmente a una regulación positiva de los genes relacionados con HIF (aumento en la transcripción de genes dirigidos por HIF), es decir, genes que tienen sitios de unión a HIF en sus elementos reguladores de la transcripción. Dos genes bien caracterizados que se activan por la proteína HIF-1α son el receptor Glut1 y el VEGF. Por lo tanto, para analizar los cambios de expresión de ARNm en cada uno de estos genes diana de HIF, se cultivaron células de línea celular SH-SY5Y y se trataron con ApoTf mayoritaria o HoloTf mayoritaria a una concentración de 1 mg/ml y 4 mg/ml en condiciones normóxicas (21% de oxígeno) o hipóxicas (1% de oxígeno) durante 6 horas. Como controles negativos, las células se trataron con HSA (1 mg/ml o 4 mg/ml) o no se trataron. Después de 6 horas, se recogió el ARNm intracelular y se analizaron los niveles de expresión de Glut1 y VEGF mediante qPCR. Los resultados de expresión se calcularon con relación a la expresión del transcrito correspondiente observado en células no tratadas. Las figuras 4A y 4B muestran los resultados de expresión obtenidos para el receptor de Glut1 y VEGF, respectivamente. Los valores en las figuras se muestran como expresión génica relativa, con el gen diana (Glut1 o VEGF) normalizado para la expresión constitutiva (beta-actina). Tal como puede derivarse directamente de dichas figuras, en condiciones hipóxicas, la expresión de Glut1 (figura 4A) y VEGF (figura 4B) aumentó significativamente cuando se trataron con apotransferrina con respecto a los controles de HSA. Curiosamente, en condiciones normóxicas, la holotransferrina, pero no apotransferrina, aumentó la expresión de solo el Glut1.

Ejemplo 5. Las mezclas de ApoTf y HoloTf no muestran toxicidad *in vitro* o *in vivo*.

Dado que se ha descrito de que la HoloTf es tóxica para las células *in vivo* e *in vitro*, se evaluó la toxicidad de diversas composiciones que contienen ApoTf mayoritaria, HoloTf mayoritaria o mezclas de ApoTf + HoloTf en células SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y se trataron con las concentraciones indicadas de 4 mg/ml de Tf (tal como se indica en la figura 5A), M30 o DFO durante 72 horas. Después de 72 horas, las células se sometieron a un ensayo de viabilidad de Cell Titer Glow. Se establecieron las células de control y las células no tratadas en un valor de 100% viable. La viabilidad promedio y las desviaciones estándar se muestran para cada condición de tratamiento. No se observaron efectos tóxicos con ninguna composición que contuviera mayoritariamente ApoTf y, sorprendentemente, no se observaron toxicidades ni efectos perjudiciales en las de HoloTf mayoritaria.

Curiosamente, ni las composiciones de ApoTf mayoritaria ni HoloTf mayoritaria mostraron diferencias significativas en estos criterios de comportamiento, lo que sugiere que no hubo efectos perjudiciales de HoloTf *in vivo*. La figura 5B muestra las puntuaciones Bederson modificado y comportamiento general para ratas tratadas por vía intravenosa con fármaco que comprende ApoTf o HoloTf mayoritarios. Se evaluó la función neurológica in vivo mediante una puntuación de Bederson modificada (Bederson y otros, 1986b; Crumrine y otros, 2011) utilizando las siguientes definiciones:

50 Puntuación 0: Sin déficits neurológicos aparentes;

Puntuación 1: Presencia de torsión corporal;

Puntuación 2: Torsión corporal con debilidad en el lado derecho;

Puntuación 3: Torsión corporal, debilidad del lado derecho con comportamiento circular; y

Puntuación 4: Actividad convulsiva.

55

10

15

20

25

30

Las puntuaciones de comportamiento general de las ratas fueron desarrolladas por el personal de CALS con el fin de controlar la recuperación de los animales después de los procedimientos quirúrgicos (atención postoperatoria CALS estándar). Se asignó un valor numérico a las observaciones de comportamiento predeterminadas.

60 Puntuación 0: Comportamiento consistente con una rata normal e ingenua (es decir, sin déficit ipsilateral);

Puntuación 1: Brillante/activa/receptiva; la rata se mueve y explora espontáneamente su jaula, responde a estímulos externos, explora la parte superior de la jaula;

Puntuación 2: Silenciosa/alerta/receptiva; comportamiento reservado, pero responderá a estímulos externos, tiende a no alejarse ni explorar la parte superior de la jaula;

Puntuación 3: Comportamiento deprimido: tiende a no moverse a menos que se la toque, rápidamente regresa a un

ES 2 693 602 T3

estado somnoliento, poco o ningún interés a los estímulos externos;

Puntuación 4: Insensible: permanece en una posición postrada incluso cuando se le pincha; y

Puntuación 5: Actividad convulsiva que requiere eutanasia.

5 **Ejemplo 6.** Protección celular *in vivo* mediante transferrina.

El modelo de rata de infarto cerebral MCAo (oclusión de la arteria cerebral media) se utilizó para evaluar la protección celular mediante transferrina. El infarto fue inducido quirúrgicamente a 16 ratas mediante la utilización de la técnica MCAo. Se trataron 8 ratas por inyección de solución salina en el cerebro y las otras 8 por inyección de ApoTf en el cerebro. Las figuras 6A y 6B muestran que se observó una disminución significativa en el volumen del área infringida en las ratas tratadas con una mezcla que comprende una ApoTf mayoritaria en comparación con las ratas de control (tratadas con solución salina). La figura 6A muestra un gráfico de dispersión del volumen de infarto de ApoTf (385 mg/kg, IV) o tratamiento con solución salina en MCAo transitoria; y la figura 6B muestra secciones coronales teñidas con TTC de un control representativo y una rata tratada con ApoTf.

Ejemplo 7. ApoTf y HoloTf protegen SH-SY5Y de la toxicidad de Abeta1-42.

Se sabe que la regulación positiva de la vía HIF desempeña un papel protector en varias enfermedades neurodegenerativas, incluidas patologías que provocan la destrucción de células nerviosas y neuronas. Dado que el tratamiento de SH-SY5Y regula positivamente el HIF, el tratamiento de las células con apotransferrina u holotransferrina debería proporcionar un efecto protector sobre las células sujetas a sustancias que se sabe que inducen la neurodegeneración. La figura 7 resalta datos que evalúan si la apotransferrina mayoritaria y de holotransferrina podrían proteger a las células SH-SY5Y de los efectos tóxicos del péptido Abeta1-42 oligomerizado, toxina neurodegenerativa conocida (figura 7). Las células neuronales SH-SY5Y cultivadas en medio de crecimiento se trataron con 4 mg/ml de apotransferrina o holotransferrina durante 24 horas en niveles normales de oxígeno. Después de 24 horas, las células se trataron con péptido Abeta1-42 oligomerizado durante 72 horas adicionales. Después del tratamiento con Abeta1-42 oligomerizado, las células se sometieron a un ensayo de activación de caspasa 3/7 ApoGlo. Se establecieron las células de control, las células no tratadas, a un valor normalizado de 1. La inducción promedio de caspasa, en relación con las células de control, y las desviaciones estándar se muestran para cada condición de tratamiento. Curiosamente, estos datos muestran que tanto la ApoTf como la HoloTf mayoritarias protegen las células SH-SY5Y de la toxicidad inducida por Abeta. Estos datos también confirman la falta de toxicidad inherente con ApoTf o con HoloTf.

Ejemplo 8. Efecto sinérgico con activadores de HIF de moléculas pequeñas y mezclas ApoTf/HoloTf.

La transferrina puede actuar de forma sinérgica con otras moléculas pequeñas que activan HIF, tales como otros quelantes de hierro o inhibidores de enzimas. Esto podría permitir que se administren niveles más bajos de estas moléculas pequeñas, provocando menos efectos secundarios pero conservando altos niveles terapéuticos. Para determinar si la apotransferrina aumenta la potencia del quelante de hierro, DFO y el inhibidor de phd2 IOX2, se trataron células neuronales SH-SY5Y cultivadas en medio sin suero con 4 mg/ml de las proteínas indicadas en presencia o ausencia del fármaco de molécula pequeña en niveles de oxígeno normales. Los resultados del experimento se muestran en las figuras 8A, 8B y 8C. Los datos mostrados en la figura 8A se refieren al tratamiento de células con una combinación de DFO o IOX2, a las concentraciones indicadas, más 4 mg/ml de proteína. Se utilizó CoCl₂ como control positivo experimental. Los datos que se muestran en la figura 8B se refieren al tratamiento de células con una combinación de M30 10 μM más/menos 4 mg/ml de proteína. Los datos mostrados en la figura 8C se refieren al tratamiento de células con una combinación de DFO 200 μM más/menos 4 mg/ml de proteína. Después de 6 horas, las proteínas intracelulares se recogieron y se analizaron para determinar los niveles de proteína HIF-1α mediante ELISA. Los datos se muestran en pg/ml con desviación estándar.

50 **Ejemplo 9.** Niveles de expresión de ARNm de Glut1 y VEGF en respuesta a las combinaciones de mayoría de Apotransferrina y DFO o IOX2.

Además, se determinaron los niveles de expresión de ARNm de Glut1 y VEGF en respuesta a las combinaciones de mayoría de Apotransferrina y DFO o IOX2. Se trataron células neuronales SH-SY5Y cultivadas en medio sin suero con 4 mg/ml de albúmina de suero humano o mayoría de Apotransferrina en niveles normales de oxígeno. Donde se indica, se trataron conjuntamente tanto DFO 200 μM como IOX2 1 μM con HSA y apotransferrina mayoritaria. Después de 6 horas de tratamiento, se recogió el ARNm intracelular y se analizaron los niveles de expresión de Glut1 y VEGF mediante qPCR. Los valores se muestran como expresión génica relativa, con el gen diana (Glut1 o VEGF) normalizado para la expresión constitutiva (beta-actina). Se muestran las desviaciones estándar. Las figuras 9A y 9B muestran que los niveles de mRNA de Glut1 y VEGF aumentan de forma sinérgica y aditiva con la adición tanto de Apotransferrina como de los activadores de molécula pequeña de la ruta de HIF.

Ejemplo 10. Las composiciones de ApoTf mayoritaria y HoloTf mayoritaria inducen la proteína HIF-1 α en células de riñón primarias humanas.

65

10

15

20

25

30

35

40

45

55

Es conocido en la técnica que muchas moléculas pequeñas utilizadas para el tratamiento de afecciones relacionadas o provocadas por la hipoxia son tóxicas y tienen numerosos efectos secundarios, por ejemplo, DFO. Uno de los efectos secundarios más evidentes de dichas moléculas pequeñas es la toxicidad renal. Por lo tanto, para evaluar si la transferrina y/o las mezclas aumentan los niveles de HIF- 1α en las células renales primarias; se obtuvieron células de riñón primarias humanas, tanto renales primarias humanas epiteliales del túbulo proximal (RPTEC) como células epiteliales corticales (HRCE). Se trataron células renales primarias humanas epiteliales del túbulo proximal (RPTEC) o epiteliales corticales primarias (HRCE) cultivadas en medios libres de suero con apotransferrina mayoritaria 4 mg/ml, apotransferrina mayoritaria o varias mezclas de cada una durante 6 horas en niveles normales de oxígeno. Después de 6 horas, las proteínas intracelulares se recogieron y se analizaron para determinar los niveles de proteína HIF- 1α mediante ELISA. Las figuras 10A y 10B revelan que se inducen niveles de HIF- 1α con transferrina compuesta de mezclas de apotransferrina y holotransferrina en RPTEC y HRCE, respectivamente.

Ejemplo 11. Viabilidad de las células de riñón primarias humanas en presencia de transferrinas o DFO, incluida la activación de caspasa 3/7 en células de riñón primarias humanas en presencia de ApoTf mayoritaria o DFO.

Teniendo en cuenta el perfil de seguridad anticipado de una proteína plasmática humana, se evaluó la toxicidad de DFO y transferrinas (mayoría de apo, mayoría de holo y mezclas) en células renales humanas primarias. Las células renales del epitelio del túbulo proximal (RPTEC) o del epitelio cortical (HRCE) se trataron con las concentraciones indicadas de ApoTf mayoritaria o DFO durante 48 horas (figura 11A); y las células RPTEC o HRCE se trataron durante 72 horas con 4 mg/ml de ApoTf mayoritaria, HoloTf mayoritaria, mezclas de transferrina (figura 11B). Después de 48 o 72 horas, las células se sometieron a un ensayo de viabilidad de Cell Titer Glow. Se establecieron las células de control, las células no tratadas, en un valor de 100% viables. La viabilidad promedio y las desviaciones estándar se muestran para cada condición de tratamiento. Las figuras 11A y 11B muestran que mientras el DFO tenía toxicidad significativa, ninguna de las moléculas de transferrina mostraba ningún efecto perjudicial sobre estas células renales primarias.

Con el fin de evaluar la activación de la caspasa 3/7 en células renales primarias humanas en presencia de ApoTf o DFO; Las células RPTE o HRC se trataron con las concentraciones indicadas de ApoTf o DFO durante 48 horas. Después de 48 horas, las células se sometieron a un ensayo de activación de caspasa 3/7 ApoGlo. Las células de control, las células no tratadas, se ajustaron a un valor normalizado de 1. La actividad de caspasa promedio, en relación con las células de control, y las desviaciones estándar se muestran en la figura 12 para cada condición de tratamiento.

35 **Ejemplo 12.** No se observó regulación positiva de HIF en hepatocitos humanos primarios o NCI-H1650, una línea celular de pulmón.

Tal como se ha detallado anteriormente, tanto la apotransferrina derivada de plasma como la holotransferrina aumentan los niveles celulares de HIF- 1α , en la línea celular neuronal humana SH-SY5Y. Además de las células neuronales, los trasplantes de órganos hepáticos y pulmonares también pueden beneficiarse de la inducción de la señalización de HIF. Por lo tanto, para evaluar la misma, se determinó el efecto de las transferrinas en los niveles de HIF- 1α en hepatocitos primarios y una línea celular pulmonar (NCI-H1650). Se trató la línea celular de pulmón NCI-H1650 o las células de hepatocitos primarios cultivadas en medio sin suero con 4 mg/ml de apotransferrina mayoritaria, apotransferrina mayoritaria o pd-transferrina durante 6 horas en niveles normales de oxígeno. Después de 6 horas, se recogieron las proteínas intracelulares y se analizaron para determinar los niveles de proteína HIF- 1α mediante ELISA. Los datos, tal como se destaca en las figuras 13A y 13B, muestran que no se inducen niveles de HIF- 1α con transferrina o mezclas de apotransferrina y holotransferrina en NCIH1650 o hepatocitos primarios.

Ejemplo 13. Viabilidad de NCI-H1650 y hepatocitos primarios humanos en presencia de transferrinas.

Dado el perfil de seguridad anticipado de una proteína plasmática humana, se evaluó la toxicidad de las transferrinas (mayoría de apo, mayoría de holo y pd-transferrina) en NCI-H1650 y células de hepatocitos primarios humanos. Se trató la línea celular de pulmón humano, NCI-H1650 y hepatocitos humanos primarios durante 72 horas con 4 mg/ml de ApoTf mayoritaria, HoloTf mayoritaria o pd-transferrina. Después de 72 horas, las células se sometieron a un ensayo de viabilidad de Cell Titer Glow. Se establecieron las células de control, las células no tratadas, en un valor de 100% viables. La viabilidad promedio y las desviaciones estándar se muestran en las figuras 14A y 14B para cada condición de tratamiento. Los datos muestran que no se observó toxicidad con composiciones que contienen HoloTf mayoritaria o ApoTf mayoritaria en células de pulmón, NCI-H1650 o hepatocitos primarios.

CONCLUSIONES:

5

10

15

20

25

30

40

45

50

55

60

65

Los experimentos realizados en la línea celular neuronal humana SH-SY5Y mostraron que tanto la apotransferrina derivada del plasma como la holotransferrina aumentaban los niveles celulares de HIF-1 α . El aumento en los niveles de HIF-1 α se produjo en condiciones tanto normóxicas como hipóxicas. La administración de apotransferrina a células en condiciones normales de oxígeno elevó los niveles de HIF-1 α a un nivel similar al observado cuando las

ES 2 693 602 T3

células se expusieron a un ambiente hipóxico. La exposición de las células SH-SY5Y a apotransferrina en condiciones normóxicas durante períodos más largos aumentó el nivel de HIF- 1α en mayor medida que en el tiempo más corto. Los controles negativos de albúmina sérica humana no tuvieron efecto sobre los niveles de HIF- 1α .

5 Todas las diferentes mezclas de ApoTf y HoloTf regularon positivamente la proteína HIF-1α en células neuronales SH-SY5Y y células renales primarias.

No se observó regulación positiva de HIF-1 α en hepatocitos humanos primarios, o NCI-H1650, una línea celular de pulmón.

Todas las diferentes mezclas de ApoTf y HoloTf regularon positivamente los genes diana HIF-1 α en células neuronales SH-SY5Y.

No se observó toxicidad con composiciones que contienen HoloTf mayoritaria o ApoTf mayoritaria en cualquier tipo de célula (neuronal, pulmonar, renal o hepatocítica) o *in vivo*.

En el tratamiento *in vivo* de ratas, en un modelo de estrés neurológico de isquemia-reperfusión, mostró que la transferrina (compuesta principalmente de ApoTf) protege a las células de rata del infarto.

20 Mezclas que comprenden principalmente ApoTf o HoloTf protegieron células neuronales contra los efectos tóxicos del oligómero Abeta (1-42).

Solo las mezclas compuestas de ApoTf mayoritaria tuvieron efectos sinérgicos con M30 o DFO, y estas actividades sinérgicas solo ocurrieron en células neuronales SH-SY5Y.

Transferrina humana \ 226698 aminoácidos

1 MRLAVGALLV CAVLGLCLAV PDKTVRWCAV SEHEATKCQS FRDHMKSVIP SDGPSVACVK
61 KASYLDCIRA IAANEADAVT LDAGLVYDAY LAPNNLKPVV AEFYGSKEDP QTFYYAVAVV
121 KKDSGFQMNQ LRGKKSCHTG LGRSAGWNIP IGLLYCDLPE PRKPLEKAVA NFFSGSCAPC
181 ADGTDFPQLC QLCPGCGCST LNQYFGYSGA FKCLKDGAGD VAFVKHSTIF ENLANKADRD
241 QYELLCLDNT RKPVDEYKDC HLAQVPSHTV VARSMGGKED LIWELLNQAQ EHFGKDKSKE
301 FQLFSSPHGK DLLFKDSAHG FLKVPPRMDA KMYLGYEYVT AIRNLREGTC PEAPTDECKP
361 VKWCALSHHE RLKCDEWSVN SVGKIECVSA ETTEDCIAKI MNGEADAMSL DGGFVYIAGK
421 CGLVPVLAEN YNKSDNCEDT PEAGYFAVAV VKKSASDLTW DNLKGKKSCH TAVGRTAGWN
481 IPMGLLYNKI NHCRFDEFFS EGCAPGSKKD SSLCKLCMGS GLNLCEPNNK EGYYGYTGAF
541 RCLVEKGDVA FVKHQTVPQN TGGKNPDPWA KNLNEKDYEL LCLDGTRKPV EEYANCHLAR
601 APNHAVVTRK DKEACVHKIL RQQQHLFGSN VTDCSGNFCL FRSETKDLLF RDDTVCLAKL

30 Referencia de secuencia:

10

25

ACCESO GENBANK AAB22049

AUTORES Hershberger, C.L., Larson, J.L., Arnold, B., Rosteck, P.R. Jr., Williams, P., DeHoff, B., Dunn, P., O'Neal, K.L., Riemen, M.W., Tice, P.A. y otros

35 TÍTULO A cloned gene for human transferrin

REVISTA Ann. N. Y. Acad. Sci. 646, 140-154 (1991)

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una mezcla de apotransferrina (ApoTf) y holotransferrina (HoloTf) para su utilización en el tratamiento de un trastorno patológico relacionado con el factor inducible por hipoxia (HIF), en el que el trastorno es una enfermedad neurodegenerativa seleccionada entre el grupo que comprende la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica.

5

10

- 2. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, que comprende además un quelante de hierro o un inhibidor de la enzima PHD2.
- 3. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, en la que dichas Apo-Tf y Holo-Tf son recombinantes.
- 4. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, en la que dichas Apo-Tf y Holo-Tf se modifican por pegilación, glicosilación, polisialilación u otras modificaciones físicas para extender la vida media plasmática de la proteína, incluyendo la fusión covalente a dominios que extienden vida media en la sangre, tal como el dominio Fc de inmunoglobulina, albúmina, péptido-1 de tipo glucagón, exendina-4, XTEN.
- 5. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, en la que dichas Apo-Tf y Holo-Tf son conjugados de proteínas entre Apo-Tf y Holo-Tf de longitud completa o fragmentos de Apo-Tf y Holo-Tf con cualquier otra proteína,
 20 fragmento de proteína o péptido.
 - 6. Composición para su utilización, según la reivindicación 1, en la que dichas Apo-Tf y Holo-Tf son derivados de transferrina que comprenden más del 50% de similitud con la SEQ ID No. 1.
- 7. Composición para su utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición es una mezcla de apotransferrina (Apo-Tf) y holotransferrina (Holo-Tf), en una proporción del 99% de Apo-Tf: 1% de Holo-Tf al 30% de Apo-Tf: 70% de Holo-Tf, o la proporción que es más comparable a una fracción obtenida o purificada a partir de fluidos biológicos.
- 8. Composición para su utilización, según la reivindicación 2, en la que dicho quelante de hierro es M30, deferoxamina (DFO), Deferasirox, deferiprona, deferitrina, L1NAII, CP363, CP502, o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- 9. Composición para su utilización, según la reivindicación 2, en la que dicho inhibidor de la enzima PHD2 es IOX2, 35 IOX3, dimetiloxialilglicina u otras moléculas del sitio de unión de 2-oxoglutarato.

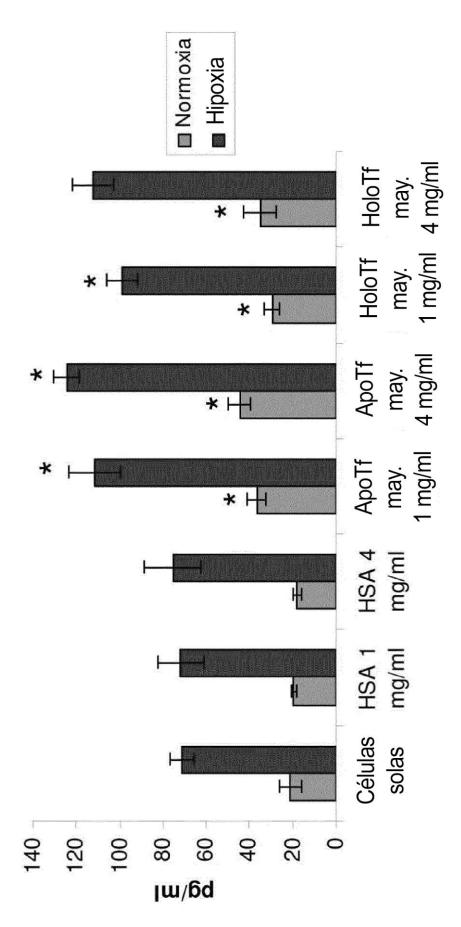


FIGURA 1

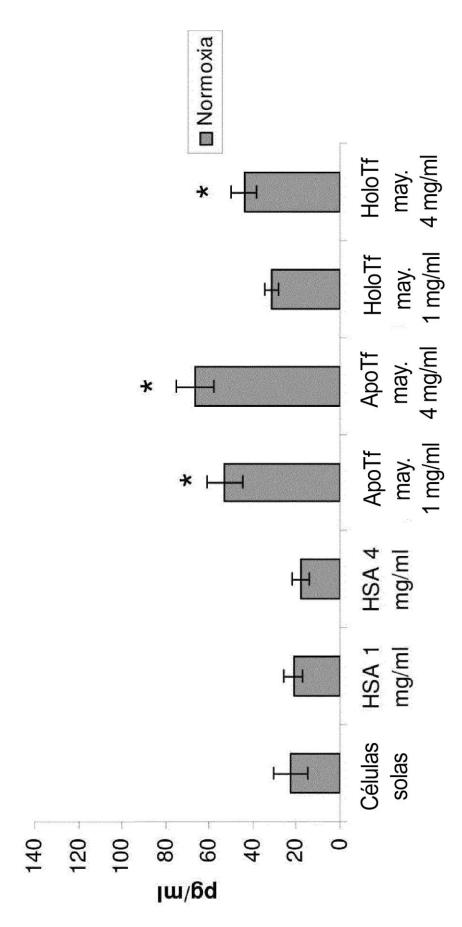


FIGURA 2

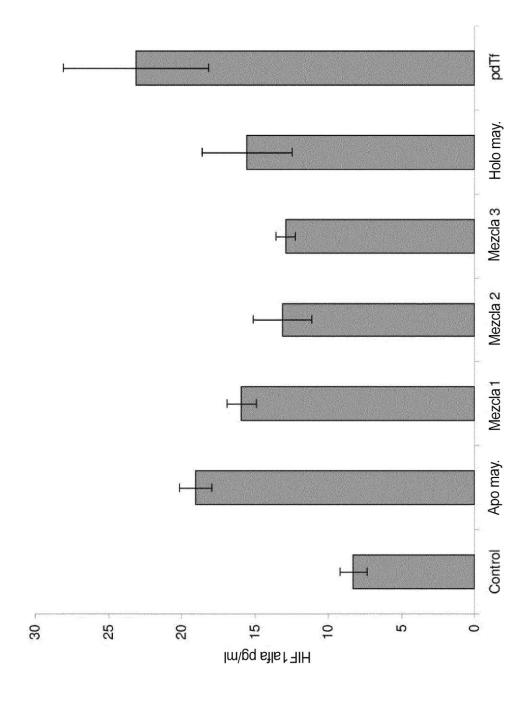
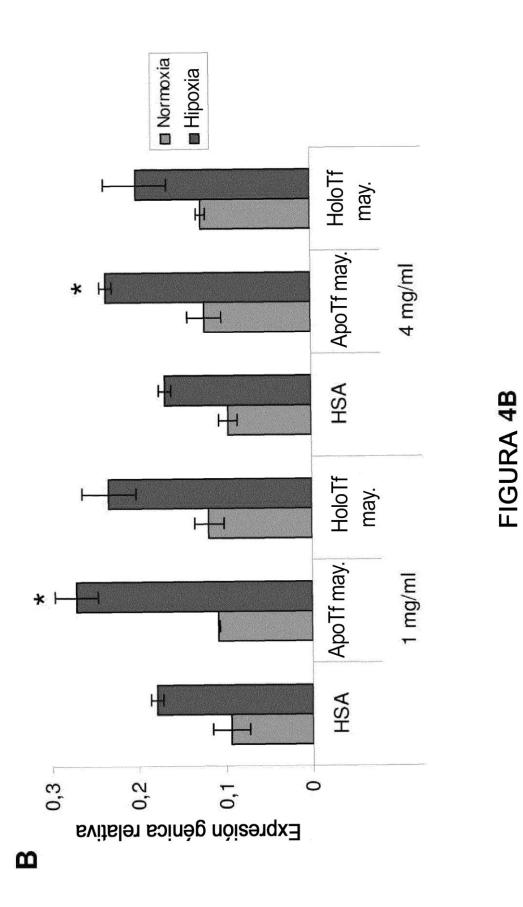
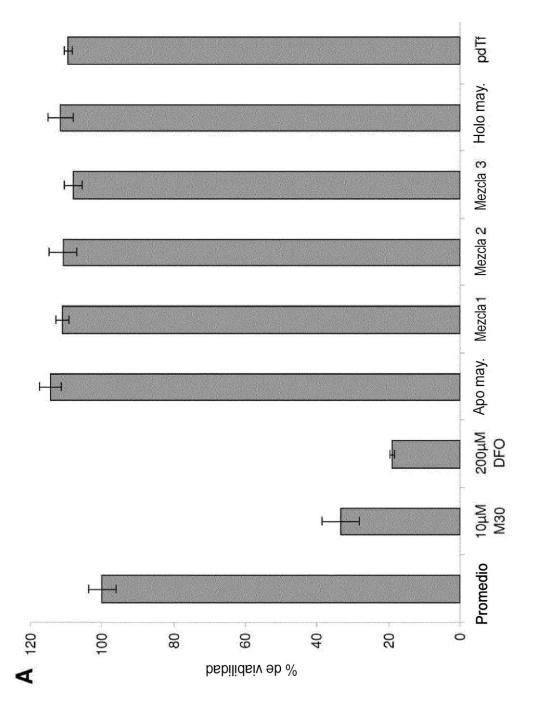


FIGURA 4A



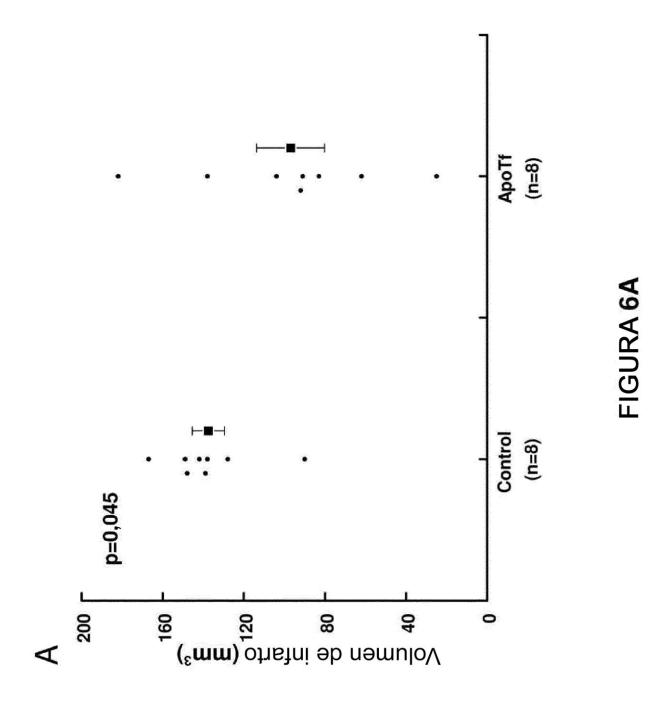
15



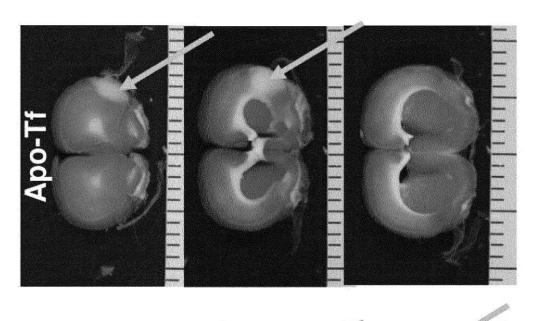
Puntuación de Bederson modificado

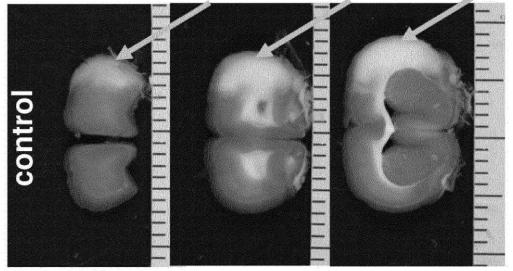
רשווממטטו	r diffuación de Dederson Modificado			
	SalinaApo	ApoTf	Salina _{Holo}	HoloTf
Media	2,0	2,0	2,0	2,0
percentil 5	1,3	1,3	2,0	2,0
percentil 95	2,0	2,0	2,85	2,0

Puntuación o	de Comportamiento general	iento genera	اها	
	SalinaApo	ApoTf	SalinaHolo	HoloTf
Media	1,0	2,0	2,0	1,0
percentil 5	1,0	1,0	1,0	1,0
percentil 95	3,25	2,7	3,5	2,0

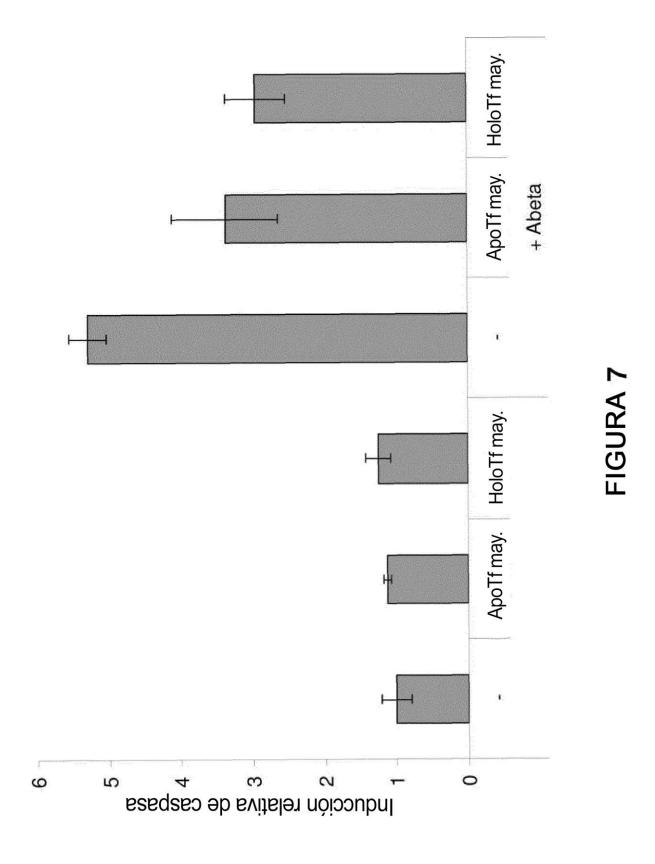


18





Ш



20

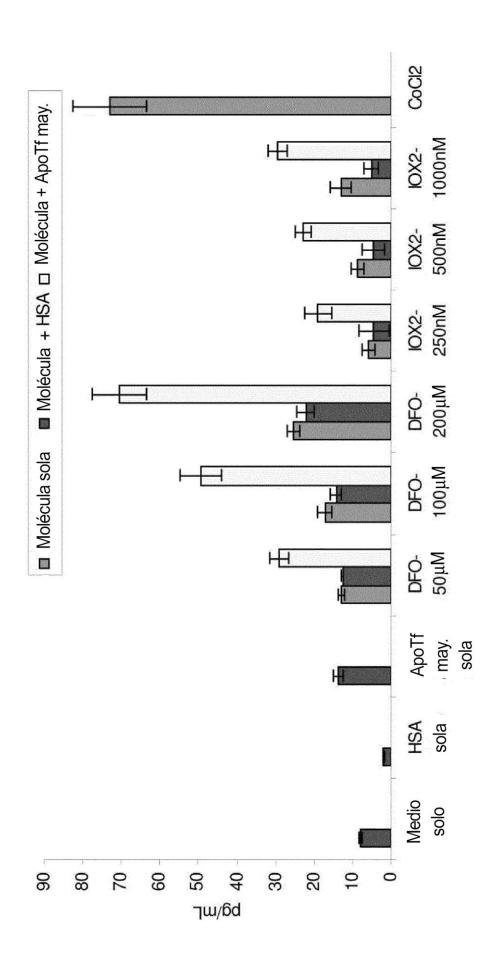


FIGURA 8A

