

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 852**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 41/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2011 PCT/US2011/053399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2012 WO12047629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2011 E 11776932 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2621534**

54 Título: **Eliminación selectiva de células modificadas por AGE para el tratamiento de la aterosclerosis**

30 Prioridad:

27.09.2010 US 386932 P

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

27.09.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GRUBER, LEWIS

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 725 852 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

Eliminación selectiva de células modificadas por AGE para el tratamiento de la aterosclerosis

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional n.º 61/386.932 titulado "Eliminación selectiva de células modificadas por AGE para el tratamiento de la aterosclerosis", presentada el 27 de septiembre de 2010.

10 ANTECEDENTES

[0002] Las células en envejecimiento sufren varias modificaciones asociadas a enfermedades. La hiperglucemia, causada por la diabetes mellitus (DM) y el estrés oxidativo promueven modificaciones postraduccionales de las proteínas de la membrana de las células por los productos finales de la glicación avanzada (AGE). Lindsey JB, et al., "Receptor For Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications," *Diabetes Vascular Disease Research*, Vol. 6(1), 7-14, (2009) en la p. 8. Los AGE surgen de una reacción no enzimática de los azúcares con cadenas laterales de proteínas en las células que envejecen y están involucrados en la patogénesis de varios procesos de enfermedades relacionadas con la edad, incluidas las complicaciones adversas de la diabetes. Ando K, et al., "Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products During Aging in the Circulation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 258, 123-27 (1999) en la p. 123.

[0003] Los eritrocitos modificados con AGE tienen menos flexibilidad que los eritrocitos no modificados, y se han implicado en la patogénesis de la aterosclerosis, mientras que la ausencia de eritrocitos modificados con AGE se ha correlacionado con una reducción de la aterosclerosis. Jandeleit-Dahm K, et al., "The AGE/RAGE Axis in Diabetes-Accelerated Atherosclerosis," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Vol. 35, 329-334 (2008) en 330. Peppas et al., "The Role of Advanced Glycation End Products in the Development of Atherosclerosis," *Current Diabetes Reports*, Vol. 4, 31-36, (2004) afirma que una gran cantidad de evidencia vincula los AGE con el desarrollo o la progresión de la aterosclerosis. Se ha informado la localización de AGE en lesiones ateroscleróticas de la aorta en pacientes no diabéticos en células de la íntima, células endoteliales, células del músculo liso, macrófagos y células espumosas. Sakata N. et al., "Immunohistochemical Localization of Different Epitopes of Advanced Glycation End Products in Human Atherosclerotic Lesions," *Atherosclerosis*, 141, 61-75 (1998) en la p. 71. El daño causado por las células modificadas con AGE también puede dar lugar a nefropatía, retinopatía, neuropatía, enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica. Karachalias N. et al., "Accumulation of Fructosyl-Lysine and Advanced Glycation End Products in the Kidney, Retina and Peripheral Nerve of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *Biochemical Society Transactions*, 31, 1423-25 (2003) en 1423.

RESUMEN

[0004] La invención se define de acuerdo con las reivindicaciones.

[0005] Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-producto de la glicación avanzada (anti-AGE) para usar en el tratamiento de la aterosclerosis en un paciente; en el que el anticuerpo monoclonal anti-AGE se une y elimina los eritrocitos modificados con AGE. En una realización de la invención, el paciente es un mamífero, opcionalmente un ser humano. En una realización de la invención, el paciente tiene Síndrome-X. En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal anti-AGE es un anticuerpo monoclonal humanizado. En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal anti-AGE es un anticuerpo monoclonal fluorescente. En una realización de la invención, los eritrocitos modificados con AGE se eliminan mediante la unión con el anticuerpo monoclonal anti-AGE.

50

[0006] La invención también proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-AGE, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el anticuerpo monoclonal anti-AGE se une y elimina eritrocitos modificados con AGE. En una realización de la invención, el excipiente comprende un diluyente, adyuvante o vehículo. En una realización de la invención, el anticuerpo monoclonal anti-AGE es un anticuerpo monoclonal humanizado.

55

Definiciones

[0007] Las siguientes definiciones se incluyen para proporcionar una comprensión clara y coherente de la memoria descriptiva y las reivindicaciones.

[0008] El término "productos finales de la glicación avanzada" se refiere al agregado de proteínas glicadas en la membrana celular que se forman como resultado de la reacción de los azúcares con las cadenas laterales de la proteína, y también se denominan proteínas modificadas con AGE y células modificadas con AGE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0009] La presente invención hace uso del descubrimiento de que la eliminación mejorada de las células modificadas con AGE, como los eritrocitos, es beneficiosa para reducir la enfermedad cardiovascular, especialmente cuando está presente como una complicación de la diabetes, o la condición prediabética denominada "Síndrome-X". Las concentraciones elevadas de glucosa en la sangre dan lugar a modificaciones de las cadenas laterales de proteínas en las células, incluidos los eritrocitos circulantes y otros tipos de células. La glicación no enzimática de las proteínas de la membrana da como resultado la formación de células modificadas con AGE, que provocan una reducción de la deformabilidad celular que se asocia con la formación de lesiones ateroscleróticas.

[0010] La técnica para eliminar los eritrocitos modificados con AGE de un paciente se selecciona por su capacidad para detectar y eliminar o destruir selectivamente las células modificadas con AGE, evitando la eliminación o destrucción de las células que no están modificadas con AGE. Como se describe en el presente documento, los eritrocitos modificados con AGE pueden detectarse debido a su mayor rigidez y su deformabilidad reducida por ultrasonidos. En este documento se describe un método para eliminar los eritrocitos modificados con AGE de la sangre, que comprende dañar o destruir un eritrocito modificado con AGE con ultrasonidos. En un ejemplo, el tratamiento con ultrasonidos se puede aplicar a frecuencias de conducción que van desde 1,0 Mhz a 5,0 Mhz, preferiblemente desde 3,0 Mhz a 4,0 Mhz. El tiempo de exposición puede oscilar entre tres y sesenta minutos diarios durante hasta 20 días. Las divulgaciones en el presente documento relacionadas con el tratamiento de la aterosclerosis usando solo ultrasonidos no forman parte de la invención reivindicada y son solo para fines informativos.

[0011] Los anticuerpos monoclonales anti-AGE para su uso de acuerdo con la invención se unen y eliminan selectivamente los eritrocitos modificados con AGE de un paciente. La sangre del paciente puede pasar a través de la circulación extracorpórea y los eritrocitos modificados con AGE luego se unen mediante anticuerpos monoclonales anti-AGE unidos a un sustrato sólido a través de su región Fc.

[0012] Además, se pueden usar anticuerpos monoclonales anti-AGE conjugados covalentemente a un marcador fluorescente para marcar eritrocitos modificados con AGE que luego se eliminan de la sangre del paciente a través de la clasificación celular. De acuerdo con la descripción, se inyecta un anticuerpo monoclonal anti-AGE en el paciente para marcar los eritrocitos modificados con AGE y, posteriormente, la sangre del paciente se conecta a un clasificador de células mediante un sistema de tubos de circulación extracorpórea. Los eritrocitos modificados con AGE unidos a un anticuerpo monoclonal anti-AGE fluorescente se clasifican a partir de los eritrocitos normales y otros tipos de células sanguíneas.

[0013] Los anticuerpos monoclonales anti-AGE se pueden conjugar con un agente que provoca la destrucción de las células modificadas con AGE. Dicho agente puede ser, pero no se limita a, una toxina, un agente citotóxico, nanopartículas, magnéticas y discos magnéticos de giro-vórtice. Dichos conjugados se mencionan solo con fines informativos, pero no forman parte de la presente invención.

[0014] En el presente documento se describe un método para eliminar las células modificadas con AGE de las lesiones ateroscleróticas, que comprende unir las células modificadas con AGE con un anticuerpo monoclonal anti-AGE. Además, los tipos de células modificadas con AGE localizadas en lesiones ateroscleróticas de la aorta en pacientes no diabéticos, como las células de la íntima, las células endoteliales, las células del músculo liso, los macrófagos y las células espumosas, pueden eliminarse selectivamente mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-AGE conjugados a un agente que provoca la destrucción de células modificadas con AGE. Dicho agente puede ser, pero no se limita a, una toxina, un agente citotóxico, nanopartículas, magnéticas y discos magnéticos de giro-vórtice.

[0015] Una toxina, como las toxinas formadoras de poros (PFT) (Aroian R. et al., "Pore-Forming Toxins and Cellular Non-Immune Defenses (CNIDs)," Current Opinion in Microbiology, 10:57-61 (2007)), conjugada con un anticuerpo monoclonal anti-AGE puede inyectarse en un paciente para seleccionar y eliminar selectivamente las

células modificadas con AGE. El anticuerpo monoclonal anti-AGE reconoce y se une a los eritrocitos modificados con AGE o a las células modificadas con AGE presentes en las lesiones ateroscleróticas. Luego, la toxina causa la formación de poros en la superficie celular y la posterior eliminación de las células a través de la lisis osmótica (Id. en la p.58).

5

[0016] Las nanopartículas magnéticas conjugadas con anticuerpos monoclonales anti-AGE se pueden inyectar en un paciente para atacar y eliminar eritrocitos modificados con AGE o células modificadas con AGE presentes en lesiones ateroscleróticas. De acuerdo con la descripción, las nanopartículas magnéticas pueden calentarse aplicando un campo magnético para eliminar selectivamente los eritrocitos modificados con AGE o las

10

[0017] Como alternativa, los discos magnéticos de giro-vórtice, que se magnetizan solo cuando se aplica un campo magnético para evitar la autoagregación que puede bloquear los vasos sanguíneos, comienzan a girar cuando se aplica un campo magnético, provocando la ruptura de la membrana de las células diana. Los discos

15

EJEMPLOS Y EJEMPLOS DE REFERENCIA

20 *Ejemplo de referencia 1 Eliminación (profética) por ultrasonidos de eritrocitos modificados con AGE en ratas ZDF (grasas diabéticas de Zucker)*

[0018] En este ejemplo, las ratas ZDF, un modelo de rata diabética tipo II que demuestra obesidad, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, nefropatía,

25

cicatrización de heridas, hipertensión leve y neuropatía, están expuestas a ultrasonidos para determinar (1) el nivel de fondo de hemoglobina A1c glicada en esta cepa; (2) si la exposición a ultrasonidos a niveles clínicos de imagen es tolerable al evaluar la observación clínica en los animales; (3) si hay un efecto en el nivel de hemoglobina A1c glicada debido a la exposición a ultrasonidos. El nivel de hemoglobina A1c glicada se utiliza como marcador para la eliminación de eritrocitos modificados con AGE.

30

[0019] Diez ratas ZDF, de aproximadamente ocho semanas de edad al momento de recibir las, suministradas por Charles River Laboratories (Wilmington, MA) se asignan al azar en dos grupos, etiquetados como I y II. Los animales se pesan antes de la exposición a ultrasonidos. Las ratas se afeitan dorsalmente y se aplica el gel de ultrasonidos presionando y frotando el aplicador sobre la cara dorsal de la rata, desde el tórax hasta la cola.

35

Mientras un técnico sostiene al animal, otro usa el aplicador. La máquina de ultrasonidos se ajusta a 3,3 Mhz y el aplicador se presiona contra la parte dorsal del animal y se mueve lentamente desde el tórax hasta la cola durante el tiempo adecuado de exposición. Las ratas del grupo I se exponen a cinco minutos de ultrasonidos a 3,3 Mhz/día durante diez días y las ratas del grupo II se exponen a diez minutos de ultrasonidos a 3,3 Mhz/día durante diez días.

40

Tras la exposición, el animal se limpia para eliminar el gel de ultrasonidos y se coloca de nuevo en su jaula. Los animales permanecen bajo observación durante cuatro horas en las cuatro horas posteriores a la exposición para cualquier evaluación clínica. Se toman muestras de sangre de cada animal a través de un sangrado retro-orbital antes de la exposición a ultrasonidos, luego el día cinco y después de la última exposición, el día diez. Para analizar las muestras de sangre, se utiliza un kit ELISA (GhbA1c) (Cusabio Biotech Co., Ltd, Japón). Todos los datos que documentan los detalles experimentales y los procedimientos del estudio se registran y analizan para evaluar el

45

Ejemplo 2 Eliminación (profética) de eritrocitos modificados con AGE por anticuerpos monoclonales

[0020] En este ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-AGE 6D12 (Ando K. et al., supra) o el anticuerpo monoclonal humanizado anti-AGE se conjuga con una toxina, como toxinas formadoras de poros o PTF (Aroian R. et al., Pore-Forming Toxins and Cellular Non-Immune Defenses (CNIDs), Current Opinion in Microbiology, 10:57-61 (2007)), magnetic nanoparticles, magnetic spin-vortex discs (Dobson J., "A Twist on Tumour Targeting," Nature Materials," 9, 95-96 (2010)), o un agente citotóxico, como la selenocistamina e IP inyectados en ratas ZDF para unir y eliminar selectivamente los eritrocitos modificados con AGE.

55

[0021] A las ratas ZDF se les inyecta IP en el volumen de 200 µl para la dosis de carga inicial de 10 mg/kg del anticuerpo monoclonal anti-AGE o con 200 µl de control PBS 1x. Cada rata recibe una inyección de IP por semana durante un total de seis semanas. Los animales se pesan semanalmente y se observan diariamente para cualquier evaluación clínica. Se toman muestras de sangre de cada animal a través del sangrado retro-orbital cada

semana. El nivel de hemoglobina A1c glicada se utiliza como marcador para la eliminación de eritrocitos modificados con AGE. Todos los datos que documentan los detalles experimentales y los procedimientos del estudio se registran y analizan para evaluar el efecto sobre los niveles de hemoglobina A1c glicada.

5 *Ejemplo 3 Eliminación (profética) de eritrocitos modificados con AGE mediante selección de paneo*

[0022] En este ejemplo, los eritrocitos modificados con AGE se aíslan de un paciente mediante selección de paneo, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-AGE. La purificación de sangre extracorpórea se utiliza para eliminar las células modificadas con AGE de un paciente.

10

[0023] La sangre del paciente se pasa a través de un sistema de tubos extracorpóreos que contiene un agente sorbente, es decir, un anticuerpo monoclonal anti-AGE para eliminar selectivamente eritrocitos modificados con AGE de la sangre. Los anticuerpos monoclonales anti-AGE unidos a un sustrato sólido a través de su región Fc, se unen a los eritrocitos modificados con AGE y los eliminan de la sangre del paciente. La sangre se recircula a través de la circulación extracorpórea para eliminar la mayoría de los eritrocitos modificados con AGE y la duración del procedimiento se realiza siguiendo los estándares conocidos en la técnica para eliminar otros elementos corpusculares de la sangre, por ejemplo, plaquetas. Gutensohn K. et al., "Extracorporeal Plateletpheresis Induces the Interaction of Activated Platelets with White Blood Cells," *Vox Sanguinis*, Vol. 78(2), 101-05 (2000). Al final del procedimiento, se restaura la circulación intracorpórea del paciente.

20

[0024] Alternativamente y descrito como ejemplo de referencia, se inyecta un anticuerpo monoclonal anti-AGE conjugado a un marcador, por ejemplo, un marcador fluorescente, en un paciente. La sangre del paciente pasa a través de un sistema de tubo extracorpóreo conectado a un clasificador de células. Los eritrocitos modificados con AGE unidos a anticuerpos monoclonales anti-AGE se clasifican seleccionando los eritrocitos fluorescentes y, por lo tanto, se eliminan de la sangre del paciente. Al final del procedimiento, se restaura la circulación intracorpórea del paciente.

25

Ejemplo de referencia 4 Eliminación (profética) de eritrocitos modificados con AGE por toxinas formadoras de poros (PFT)

30

[0025] En este ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-AGE conjugados a una toxina formadora de poros se dirigen a eritrocitos modificados con AGE. Las toxinas formadoras de poros provocan la lisis osmótica en los eritrocitos. Las toxinas formadoras de poros pueden conjugarse con anticuerpos monoclonales para dirigirse específicamente a un tipo de célula particular. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.817.771, "Cell Targeted Lytic Pore-Forming Agents."

35

[0026] Los anticuerpos monoclonales anti-AGE conjugados con una toxina formadora de poros se inyectan en un paciente. Los anticuerpos monoclonales anti-AGE se unen selectivamente y provocan la lisis de eritrocitos modificados con AGE a través de la toxina formadora de poros conjugados.

40

Ejemplo de referencia 5 Eliminación (profética) de células modificadas con AGE en lesiones ateroscleróticas por toxinas formadoras de poros (PFT)

[0027] En este ejemplo, las células modificadas con AGE en las lesiones ateroscleróticas se dirigen al anticuerpo monoclonal anti-AGE 6D12 (Ando K. et al., supra) o al anticuerpo monoclonal humanizado anti-AGE conjugado con una toxina, como toxinas formadoras de poros o PTF (Aroian R. et al., supra). Las toxinas formadoras de poros provocan la lisis osmótica en células modificadas con AGE. Las toxinas formadoras de poros pueden conjugarse con anticuerpos monoclonales para dirigirse específicamente a un tipo de célula particular. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.817.771, "Cell Targeted Lytic Pore-Forming Agents."

50

[0028] Los anticuerpos monoclonales anti-AGE conjugados con una toxina formadora de poros se inyectan en un paciente. Los anticuerpos monoclonales anti-AGE se unen selectivamente y provocan la lisis de células modificadas con AGE en lesiones ateroscleróticas, tales como células de la íntima, células endoteliales, células de músculo liso, macrófagos y células espumosas, a través de la toxina conjugada que forma los poros.

55

REFERENCIAS

[0029]

1. Lindsey JB, et al., "Receptor for Advanced Glycation End-Products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): Cardiovascular Implications," *Diabetes Vascular Disease Research*, Vol. 6(1), 7-14, (2009).
2. Ando K, et al., "Membrane Proteins of Human Erythrocytes Are Modified by Advanced Glycation End Products During Aging in the Circulation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 258, 123-27 (1999).
3. Jandeleit-Dahm K, et al., "The AGE/RAGE Axis in Diabetes-Accelerated Atherosclerosis," *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Vol. 35, 329-334 (2008).
- 10 4. Sakata N. et al., "Immunohistochemical Localization of Different Epitopes of Advanced Glycation End Products in Human Atherosclerotic Lesions," *Atherosclerosis*, 141, 61-75 (1998).
5. Karachalias N. et al., "Accumulation of Fructosyl-Lysine and Advanced Glycation End Products in the Kidney, Retina and Peripheral Nerve of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *Biochemical Society Transactions*, 31, 1423-15 25 (2003).
6. Aroian R. et al., "Pore-Forming Toxins and Cellular Non-Immune Defenses (CNIDs)," *Current Opinion in Microbiology*, 10:57-61 (2007).
- 20 7. Dobson J., "A Twist on Tumour Targeting," *Nature Materials*, 9, 95-96 (2010).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal de anti-producto final de la glicación avanzada (anti-AGE) para usar en el tratamiento de la aterosclerosis en un paciente; en el que el anticuerpo monoclonal anti-AGE se une y elimina los 5 eritrocitos modificados con AGE.
2. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paciente es un mamífero.
- 10 3. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el mamífero es un ser humano.
4. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el paciente tiene Síndrome-X.
- 15 5. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo monoclonal anti-AGE es un anticuerpo monoclonal humanizado.
6. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en 20 el que el anticuerpo monoclonal anti-AGE es un anticuerpo monoclonal fluorescente.
7. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los eritrocitos modificados con AGE se eliminan mediante la unión con el anticuerpo monoclonal anti-AGE.
- 25 8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la aterosclerosis que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-AGE, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el anticuerpo monoclonal anti-AGE se une y elimina los eritrocitos modificados con AGE.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el excipiente comprende un 30 diluyente, adyuvante o vehículo.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en la que el anticuerpo monoclonal anti-AGE es un anticuerpo monoclonal humanizado.