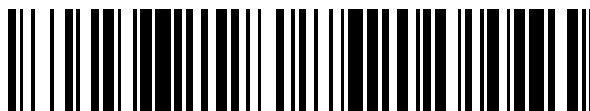


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 102**

51 Int. Cl.:

A61K 31/727 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016** **PCT/EP2016/063264**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016** **WO16198578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016** **E 16728041 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019** **EP 3307279**

54 Título: **Procedimiento de prevención de fallos de trasplante en un huésped**

30 Prioridad:

11.06.2015 EP 15171710

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

16.07.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITEIT MAASTRICHT (50.0%)

Minderbroedersberg 4-6

6211 LK Maastricht, NL y

ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT

(50.0%)

72 Inventor/es:

HEURN, VAN, LODEWIJK WILLEM ERNEST;

NICOLAES, GERARDUS ANNA FRANCISCUS;

REUTELINGSPERGER, CHRISTIAAN PETER

MARIA y

SMAALEN, VAN, TIM CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 774 102 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

Procedimiento de prevención de fallos de trasplante en un huésped

Campo de la invención

- 5 Esta invención pertenece al campo del tratamiento médico, en particular la invención proporciona un procedimiento para prevenir, mejorar o reducir el fallo del injerto después del trasplante en un receptor.

Antecedentes de la invención

- 10 El trasplante es un tratamiento médico complejo que permite el trasplante de órganos de un donante a un receptor cuyos órganos no funcionan de manera suficiente, mejorando la calidad de vida del receptor, aumentando la expectativa de vida y salvando vidas.

- 15 El fallo de trasplante es uno de los mayores desafíos para el trasplante. Después del trasplante de órganos existe una respuesta inevitable en el huésped y en el injerto. Esta respuesta se puede producir como resultado de un trauma, asociado con la obtención, perfusión, conservación y cirugía de los órganos. Esta respuesta también puede implicar el reconocimiento específico por parte del sistema inmune de diferencias antigénicas entre el donante y el receptor (1). En conjunto, estos mecanismos se pueden tornar agudos después de semanas, meses o incluso años y derivar en una respuesta destructiva que en última instancia conduce a la pérdida del injerto. Este procedimiento también se denomina rechazo del trasplante.

- 20 La pérdida del injerto es el resultado de una variedad de respuestas y comienza con los procedimientos de muerte celular, que, si no se detienen, aumentan y causan el fallo del injerto. La lesión traumática que deriva en la muerte celular y es causada por la obtención, conservación y lesión por isquemia/reperfusión no se puede prevenir por completo. Por lo tanto, las estrategias de tratamiento adecuadas para disminuir los efectos negativos son vitales. Lamentablemente, no hay muchas opciones disponibles.

- 25 El rechazo es el resultado de la respuesta natural del sistema inmune a una sustancia extraña o un antígeno. Este procedimiento complejo está mediado principalmente por los linfocitos T, aunque implica interacciones en serie entre antígenos extraños, anticuerpos, linfocitos T, macrófagos, citocinas (también denominadas linfocinas o interleucinas), moléculas de adhesión (es decir, moléculas coestimuladoras) y proteínas de membrana que potencian la unión de los linfocitos T y linfocitos B.

- 30 La terapia inmunosupresora a menudo se realiza para prevenir y tratar el rechazo del trasplante, así como para prolongar el trasplante y la supervivencia del paciente. Sin embargo, debido a la potencia de los agentes inmunosupresores y a la variabilidad inter e intraindividual en la farmacocinética, se requiere la individualización de la dosis para mantener una inmunosupresión adecuada y minimizar las reacciones adversas. La escasa solubilidad en agua y biodisponibilidad contribuyen a la complejidad de la administración de los agentes inmunosupresores tal como ciclosporina y sirolimus. El rechazo del trasplante puede ser hiperagudo (dentro de las primeras horas después del trasplante o durante los primeros días) causado por anticuerpos preformados, agudo (durante los primeros días o meses) causado por linfocitos T o crónico (meses o incluso años después) causado principalmente por anticuerpos.

Hay una escasez continua de órganos de donantes. Esto causa problemas de salud importantes, porque los pacientes en lista de espera de un órgano para trasplante probablemente mueran sin un trasplante de órgano. Estos implican una pesada carga financiera para el sistema de salud debido a los altos costos de tratamiento (2-10).

Por lo tanto, se requieren con urgencia procedimientos para aumentar la tasa de éxito de los trasplantes.

Sumario de la invención

- 40 Se ha descubierto que una heparina con una actividad anticoagulante disminuida, en particular una heparina reducida en pentasacáridos se puede usar para reducir, mejorar o prevenir el fallo de trasplante de un órgano extraño en un receptor. La heparina reducida en pentasacáridos tiene una actividad anticoagulante notablemente disminuida. Además, mostró una notable capacidad para neutralizar la citotoxicidad mediada por histonas. Esta citotoxicidad mediada por histonas se considera responsable del fallo del injerto en un trasplante. Por lo tanto, la invención se refiere a una heparina reducida en pentasacáridos para uso en el tratamiento o prevención del fallo de trasplante en el cuerpo de un ser humano o animal.

Descripción detallada de la invención

- 50 La heparina es una mezcla de cadenas de polisacáridos. (Casu, B. (1989). "Structure of heparin and heparin fragments." Ann N Y Acad Sci 556: 1-17). La composición de las cadenas de polisacáridos y su longitud son variables. Las cadenas con un denominado dominio pentasacárido se unen fuertemente a la antitrombina (AT), que es una de las principales proteínas anticoagulantes circulantes (Casu, B. *et al.* Biochem J 197 (3) (1981) 599-609).

La heparina con una actividad anticoagulante disminuida es conocida en la técnica y existen varios procedimientos conocidos para su preparación. En primer lugar, se pueden reducir los pentasacáridos de la heparina mediante cromatografía de afinidad, de este modo obteniendo heparina no anticoagulante o heparina con una actividad anticoagulante disminuida. La heparina también se puede tratar químicamente para obtener heparina con una actividad anticoagulante disminuida.

La heparina reducida en pentasacáridos se puede obtener a partir de heparina no fraccionada (UFH) por procedimientos conocidos en la técnica. En un procedimiento preferente, la heparina reducida en pentasacáridos se obtiene por cromatografía de afinidad. En ese caso, se pasa UFH a través de una columna que contiene AT inmovilizada. Las moléculas que contienen la secuencia de pentasacáridos se unen a la columna, mientras que otro material pasa. El material no unido se denomina material de baja afinidad (LAM), mientras que el material que se une se denomina material de alta afinidad (HAM). LAM está sustancialmente reducido en pentasacáridos y como consecuencia en su actividad anticoagulante, mientras que HAM tiene actividad anticoagulante completa.

LAM también se puede describir como la fracción de heparina natural reducida en pentasacárido.

El término heparina reducida pentasacárido en este contexto se usa para referir a una fracción de heparina en la que el contenido de pentasacáridos está sustancialmente reducido en comparación con la heparina disponible comercialmente.

El término sustancialmente reducido o disminuido como se usa en la presente memoria significa reducido en al menos 10%, tal como 20% o 30%, más preferentemente 40 o 50%, aún más preferentemente, más que 60% o 70% u 80% tal como 90% o más que 98%, tal como más que 99% o incluso 100%. Es más preferente cuando la fracción reducida en pentasacáridos no contiene ningún pentasacárido detectable cuando se analiza la generación de trombina como se describe en Hemker *et al.*, (2003) *infra*. Por el contrario, heparina con una actividad anticoagulante disminuida significa heparina con una actividad anticoagulante reducida, tal como reducida en al menos 10%, tal como 20% o 30%, más preferentemente 40 o 50%, aún más preferente, más que 60% o 70% u 80% tal como 90% o más que 98% tal como más que 99% o incluso 100%. Lo más preferente es cuando la heparina con una actividad anticoagulante disminuida no contiene actividad anticoagulante detectable cuando se analiza la generación de trombina como se describe en Hemker *et al.*, (2003) *infra*.

En la sección experimental se describe en detalle cómo se puede obtener una heparina reducida en pentasacárido. Se denomina allí LAM, abreviatura de material de baja afinidad.

Se ha descubierto que al eliminar de este modo la fracción de heparina anticoagulante de la UFH se obtiene una heparina reducida en pentasacáridos que neutraliza la citotoxicidad mediada por histona y que se puede usar ventajosamente para prevenir el fallo de trasplante de órganos y tejidos de donantes tal como el corazón, el pulmón, el hígado, la córnea, la piel, el útero, el riñón, el páncreas y el intestino.

El término fallo de trasplante o fallo de injerto, como se usa en la presente memoria, significa el fallo del órgano trasplantado a la hora de realizar su función normal. Esto puede significar que el órgano trasplantado no cumple su función en su totalidad o solo en parte. El fallo de trasplante también se puede referir a una condición del órgano trasplantado en la que su función se reduce o disminuye sustancialmente.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Separación de UFH en LAM y HAM. Se aplicaron 2 mg de UFH. La figura muestra la densidad óptica a 254 nm, en la que el primer pico representa el LAM recolectado, el segundo pico contiene el HAM recolectado. El segundo gráfico representa la conductividad del material eluido. LAM se eluyó con 1 ml/min y HAM con 4 ml/min.

Figura 2: Actividad anticoagulante de diversas preparaciones de heparina. Diagrama que muestra que tanto la desulfatación como la reducción de pentasacáridos producen fracciones de heparina con una actividad anticoagulante disminuida.

Figura 3: Neutralización de la citotoxicidad de la histona H3. Diagrama que muestra que la citotoxicidad de la histona H3 está reducida en la fracción de heparina desulfatada, pero está completamente intacta en la heparina reducida en pentasacárido.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de una columna AT

La columna AT se preparó de acuerdo con el prospecto de una columna HiTrap de 5 ml (GE Healthcare®). Después de lavar el isopropanol de la columna, se aplicaron a la columna ~2,5 mg de AT en 5 ml de tampón de acoplamiento. Después, se empleó el procedimiento descrito para inmovilizar la proteína en el material de la columna y lavar la columna (de acuerdo con el prospecto). Finalmente, la columna se equilibró con NaCl 140 mM, Tris 20 mM (pH 7,4).

Ejemplo 2: Separación de UFH en LAM y HAM

Se aplicaron a la columna 2 mg de heparina no fraccionada. El LAM se eluyó con NaCl 140 mM, Tris 20 mM (pH 7,4) y HAM con NaCl 2 M, Tris 20 mM (pH 7,4). El último tampón se aplicó en un gradiente de bloque. En la Fig. 1 se muestra un ejemplo del patrón de elución.

- 5 Para obtener una mayor cantidad de LAM, el procedimiento descrito en la Figura 1 se repitió varias veces.

Para determinar si el LAM estaba libre de HAM, se usaron dos pruebas. En primer lugar, el HAM recolectado se volvió a aplicar a la columna AT y se ejecutó como se describió anteriormente. No se halló pico de HAM. En segundo lugar, se midió el efecto de LAM sobre la generación de trombina. La mezcla de reacción (120 µl) contenía plasma mezclado normal en una dilución de 1,5 x, 3 µl de LAM o tampón, DOPL 4 µM (DOPC 60%, DOPC 20% y DOPE 20%), factor tisular 5 pM (Innovin), CaCl₂ 100 mM y ZGGR-AMC 417 µM. La reacción se inició con CaCl₂ + ZGGR-AMC. La generación de trombina se midió según lo descrito por Hemker, H. C., P. Giesen, *et al.* (2003). (2003). "Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma." *Pathophysiol Haemost Thromb* 33(1): 4-15. La generación de trombina no se inhibió por la adición de 3 µl de HAM.

- 15 Se recolectaron las fracciones de columna conteniendo LAM. El tampón se cambió a bicarbonato de amonio (pH 7,8) con medio Sephadex G y las fracciones se liofilizaron. El LAM seco se pesó y se disolvió en solución salina tamponada con fosfato para alcanzar la concentración deseada.

Ejemplo 3: Prevención de fallo de trasplante

Se han realizado observaciones en un modelo de trasplante de riñón en el que se trasplantaron riñones de ratón. Se determinaron las condiciones bajo las que los riñones para trasplante presentaron una mayor probabilidad de fallo, y después se realizó un experimento en el que 30 ratones recibieron entre 0,1 y 10 mg de LAM por ratón por inyección. Un grupo de control de ratón adecuado no recibió ningún tratamiento, otro grupo de control recibió cantidades comparables de HAM o heparina natural.

Se observó que el grupo que recibió LAM tenía una tasa de fallo de injerto más baja.

Ejemplo 4: Actividad anticoagulante de diversas preparaciones de heparina

- 25 Los pentasacáridos de la heparina no fraccionada (UFH) se redujeron mediante cromatografía de afinidad en una columna con antitrombina inmovilizada. El flujo de no unión contenía la heparina reducida en pentasacáridos (LAM).

La heparina no fraccionada se desulfató de acuerdo con el procedimiento descrito por Yuko Inoue and Kinzo Nagasawa, *Carbohydrate Research* (1976) 46: 87-95.

- 30 La heparina desulfatada (DS), UFH y LAM se probaron en el ensayo de potencial endógeno de trombina (ETP) para determinar su actividad anticoagulante (Figura 2). Se concluye con que la desulfatación, así como la reducción de pentasacáridos, elimina casi por completo la actividad anticoagulante de UFH, al menos en un grado por debajo de 10% de la actividad original de UFH.

Ejemplo 5: Neutralización de la citotoxicidad de la histona H3

- 35 Se probaron DS, UFH y LAM en el ensayo de citotoxicidad de la Histona H3 según lo descrito por Wildhagen *et al.* (Blood 2014; 123: 1098-1101) para determinar su actividad de protección hacia la citotoxicidad de la Histona H3 (Figura 3). Se observó que el efecto de protección frente a la citotoxicidad de la histona H3 se conservó en la fracción de LAM (100% de la actividad de la heparina no fraccionada (Figura 3)), mientras que la heparina desulfatada mostró una reducción significativa (más de 50%) en el efecto de protección en comparación con la heparina no fraccionada. Se concluye con que UFH y LAM neutralizan la actividad citotóxica de la Histona H3 en la misma medida, mientras que la desulfatación de heparina (DS) produce una pérdida de la capacidad de neutralizar la actividad citotóxica de la Histona H3.

Referencias

1. Morris PJ, Knechtle SJ. Kidney Transplanatation: principles and practice. Sixth ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
2. Foundation E. Annual report 2013. 2013.
- 5 3. Colvin-Adams M, Smith JM, Heubner BM, Skeans MA, Edwards LB, Waller CD, *et al.* OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: heart. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-28.
4. Israni AK, Zaun DA, Rosendale JD, Snyder JJ, Kasiske BL. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: deceased organ donation. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-13.
- 10 5. Kandaswamy R, Skeans MA, Gustafson SK, Carrico RJ, Tyler KH, Israni AK, *et al.* OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: pancreas. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-20.
6. Kim WR, Lake JR, Smith JM, Skeans MA, Schladt DP, Edwards EB, *et al.* OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: liver. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-28.
7. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Stewart DE, *et al.* OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: kidney. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-34.
- 15 8. Schnitzler MA, Skeans MA, Axelrod DA, Lentine KL, Tuttle-Newhall JE, Snyder JJ, *et al.* OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: economics. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-24.
9. Smith JM, Skeans MA, Horslen SP, Edwards EB, Harper AM, Snyder JJ, *et al.* OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: intestine. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-16.
- 20 10. Valapour M, Skeans MA, Heubner BM, Smith JM, Hertz MI, Edwards LB, *et al.* OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: lung. Am J Transplant. 2015;15 Suppl 2:1-28.

REIVINDICACIONES

1. Heparina reducida en pentasacáridos para uso en la prevención, mejora o reducción del fallo del injerto después del trasplante en un receptor.
- 5 2. Heparina reducida en pentasacáridos para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el injerto es un órgano o un tejido.
3. Heparina reducida en pentasacáridos para uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que el órgano es la piel, el corazón, el hígado, el pulmón, el páncreas, el intestino o el riñón.
4. Heparina reducida en pentasacáridos para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 en el que la heparina reducida en pentasacáridos se obtiene mediante cromatografía de afinidad.
- 10 5. Heparina reducida en pentasacáridos para uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que la cromatografía de afinidad se llevó a cabo usando antitrombina inmovilizada.

Figura 1

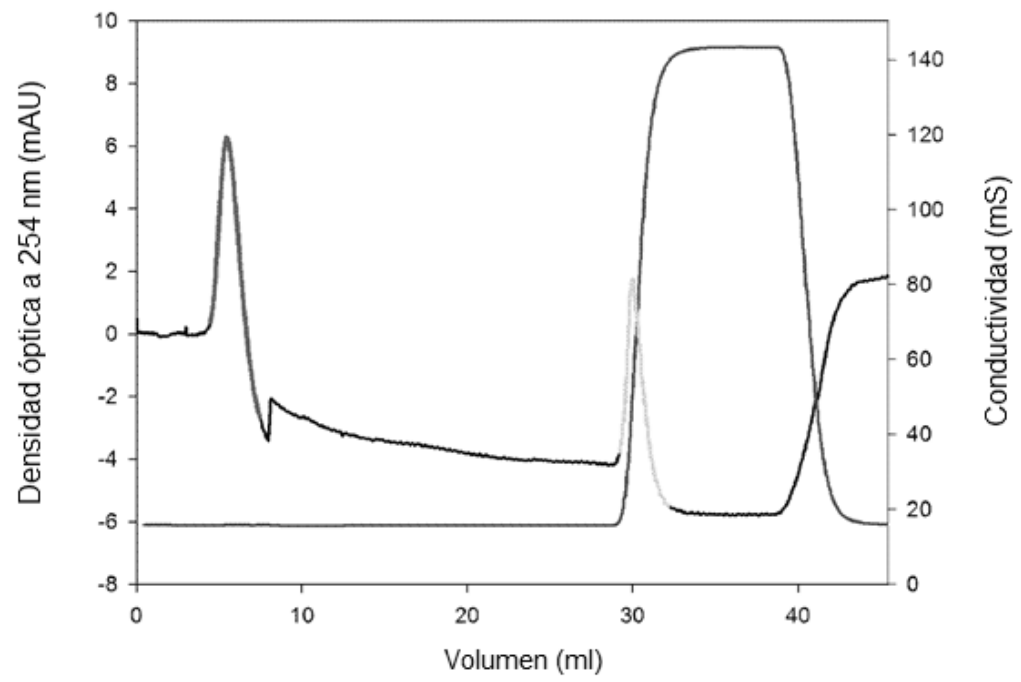


Figura 2

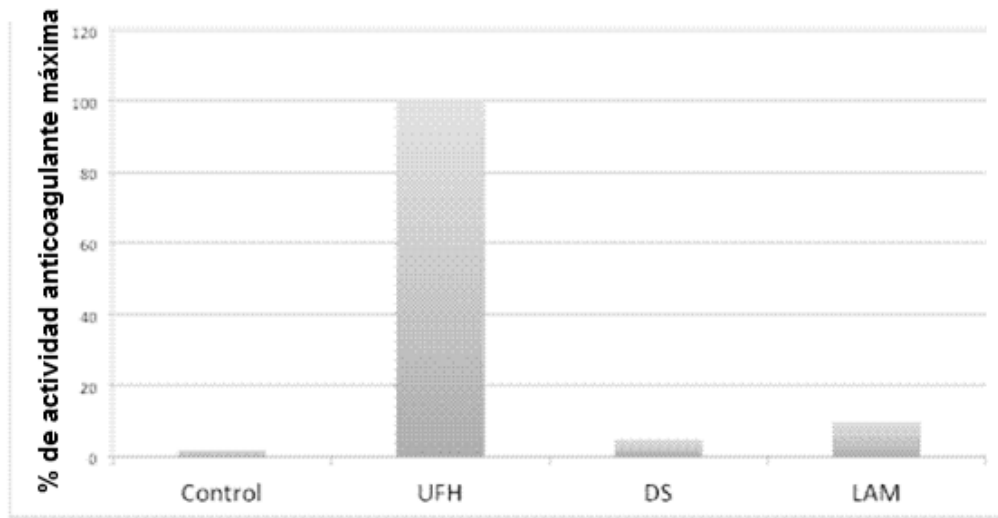


Figura 3

