

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 093**

51 Int. Cl.:

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 31/46 (2006.01)

A61P 25/30 (2006.01)

A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2014** **PCT/US2014/035093**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014** **WO14176309**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2014** **E 14788463 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 2988737**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para el tratamiento de enfermedades**

30 Prioridad:

23.04.2013 US 201361815206 P

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

16.11.2021

73 Titular/es:

NIZYME INC. (100.0%)
49 Amethyst Way
San Francisco, CA 94131, US

72 Inventor/es:

KATSNELSON, ILANA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 877 093 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

Procedimientos y composiciones para el tratamiento de enfermedades

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente patente reclama el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º de serie 61/815.206, presentada el 23 de abril de 2013.

10 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de afecciones fisiológicas asociadas con deficiencias de acetaldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2).

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La intoxicación por alcohol ocurre cuando un paciente bebe una gran cantidad de alcohol (etanol) durante un corto período de tiempo. Dosis muy grandes de alcohol causan la saturación de las enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol, lo que permite que solo una fracción del alcohol se convierta por transformación metabólica en su producto final no tóxico (cinética de orden cero para el metabolismo de fármacos).

El disulfiram (Antabuse™) es un fármaco que se usa para tratar la dependencia del alcohol y la cocaína. Su mecanismo de acción es la inhibición de la enzima ALDH2, lo que da como resultado la acumulación de acetaldehído y síntomas de intoxicación por acetaldehído (o reacción de alcohol-disulfiram) después del consumo de alcohol. El disulfiram fue aprobado para el tratamiento del alcoholismo hace más de 50 años e inicialmente se usó como un implante que daba como resultado un 100 % de sobriedad. También causó múltiples muertes por reacción de alcohol-disulfiram (intoxicación por acetaldehído). Para evitar muertes y toxicidad por disulfiram, el disulfiram ahora se administra por vía oral y la dosis del fármaco disminuyó de 3.000 mg al día a 250 mg al día. Sin embargo, este nuevo régimen de dosificación da como resultado una reducción del cumplimiento general, ya que un paciente puede suspender la medicación y recaer sin efectos graves. Por tanto, aunque el estándar de tratamiento actual que usa disulfiram oral disminuye el número de días de bebida, no asegura la abstinencia tan eficazmente como un implante (Hughes JC y Cook CC, *Addiction* abr. de 1997; 92 (4):381-95). El tratamiento para revertir la reacción alcohol-disulfiram permitiría el desarrollo de una nueva generación de opciones de suministro de disulfiram a largo plazo sin temor a las muertes actualmente asociadas con dicho suministro. Los presentes procedimientos y composiciones abordan esta necesidad.

El documento US 5 855 881 A divulga un procedimiento para producir ALDH de mamíferos en plantas. El documento US 5 855 881 A divulga además que la ALDH se recupera de plantas y se empaqueta con NAD y un tampón adecuado como una píldora, pasta o refrigerio. La composición se toma por vía oral antes de participar en el consumo social para prevenir o mejorar los efectos del consumo de alcohol.

Una publicación de H. Ma *et al.* (*Eur. Heart J.* 32 (8):1025-1038, 2010) se relaciona con el mecanismo implicado en la cardioprotección inducida por aldehído deshidrogenasa mitocondrial contra la lesión por isquemia/reperfusión (I/R) con un enfoque en la autofagia.

Una publicación de H. Ma *et al.* (*J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (23):2187-2196, 2009) se relaciona con el papel de la desintoxicación facilitada del acetaldehído, el principal producto metabólico del etanol, a través de la sobreexpresión sistémica de aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial (ALDH2) en el daño miocárdico inducido por exposición aguda al etanol.

Una publicación de J. Ren *et al.* (*Toxicol. Lett.* 187:149-156, 2009) se relaciona con el impacto de la degradación facilitada del acetaldehído a través de la sobreexpresión transgénica de aldehído deshidrogenasa-2 mitocondrial (ALDH2) sobre la lesión cortical cerebral inducida por alcohol.

Harry (1998; *Toxicol. Lett.* 95:84) sugiere el tratamiento de la reacción de disulfiram-etanol usando 4-metilpirazol.

Chen (2008; *Ciencia* 321:1493-1495) enseña que Alda-1, un compuesto que induce ALDH2, puede usarse para prevenir problemas antes de un evento isquémico.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En esencia, la presente invención proporciona una composición que comprende aldehído deshidrogenasa 2 para uso en el tratamiento de la toxicidad del aldehído resultante del metabolismo del etanol después de que un sujeto haya consumido etanol, en la que la composición ha de administrarse por vía intravenosa en una dosificación terapéuticamente eficaz, en la que la dosificación da como resultado una reducción de al menos un 25 % del nivel sistémico de aldehído tóxico en el sujeto.

La presente invención proporciona además una composición que comprende aldehído deshidrogenasa 2 para uso en el tratamiento de la toxicidad por aldehído resultante de una lesión isquémica en un sujeto que ha sufrido un evento isquémico, en la que la composición ha de administrarse por vía intravenosa en una dosificación terapéuticamente eficaz, en la que la dosificación da como resultado una reducción de al menos un 25 % del nivel sistémico de uno o más aldehídos tóxicos seleccionados de 4-hidroxinonenal y malondialdehído en el sujeto.

SUMARIO DE LA INFORMACIÓN TÉCNICA

La información técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención *per se*, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para colocar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Tal información técnica adicional, que no entra dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no es parte de la invención.

En el presente documento se enseñan composiciones que comprenden ALDH2 para uso en el tratamiento de un paciente con toxicidad resultante de la deficiencia de ALDH2. Los estados fisiológicos que pueden tratarse usando la presente invención incluyen la deficiencia temporal de ALDH2, tal como la que se observa por intoxicación por alcohol, o la deficiencia genética de ALDH2, como es común en ciertas poblaciones étnicas.

La administración de una composición que comprende ALDH2 en una dosificación terapéuticamente eficaz debería dar como resultado una reducción de al menos un 25 % del nivel sistémico de productos químicos tóxicos en el sujeto. Más preferentemente, la dosificación da como resultado una reducción de al menos un 35 % del nivel sistémico de productos químicos tóxicos en el sujeto, e incluso más preferentemente, la dosificación da como resultado una reducción de al menos un 50 % del nivel sistémico de productos químicos tóxicos en el sujeto.

Con los fines de la invención, el producto químico es un aldehído tóxico resultante del metabolismo del alcohol; o es 4-hidroxinonenal y/o malondialdehído, que son aldehídos tóxicos resultantes de una lesión isquémica.

El sujeto tratado puede tener una deficiencia temporal de ALDH2, p. ej., la causada por una sustancia farmacológicamente activa o una lesión. El sujeto también puede tener una deficiencia genética permanente de ALDH2.

Se puede administrar ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 a un paciente que presente toxicidad debido a una deficiencia temporal aguda de ALDH2. Por lo general, esto se debe a la ingestión de una cantidad de una sustancia farmacológicamente activa (p. ej., alcohol) que supera los niveles naturales de ALDH2 disponibles para el metabolismo de esa sustancia. Para tales pacientes, este estado fisiológico es temporal y, por lo tanto, abordar la deficiencia temporal puede prevenir la toxicidad que de otro modo se observaría y evitar daños graves en los órganos o incluso la muerte.

Por tanto, la toxicidad asociada con una deficiencia de ALDH2 en un sujeto bajo la influencia del alcohol puede tratarse administrando ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 en una cantidad suficiente para restaurar la cinética de primer orden de la sustancia farmacológicamente activa. En algunos casos, a los sujetos tratados se les ha administrado disulfiram y, por tanto, son más propensos a los efectos tóxicos de la sustancia farmacológicamente activa debido a los niveles reducidos de ALDH2.

Los pacientes que se someten a un tratamiento por adicción (p. ej., adicción al alcohol) que implica la administración de disulfiram pueden beneficiarse particularmente de tales procedimientos. Los procedimientos se pueden usar como terapia complementaria a la administración de disulfiram, para prevenir los efectos potencialmente letales que pueden observarse durante una recaída. En este contexto, el disulfiram se puede suministrar usando un formato de dosificación de liberación controlada, p. ej., un dispositivo implantable.

La deficiencia temporal de ALDH2 también puede ocurrir durante la lesión por isquemia-reperfusión, lo que da como resultado una acumulación de aldehídos tóxicos y un aumento del tamaño del daño orgánico. La administración de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 después de tal lesión, y preferentemente inmediatamente después de tal lesión, puede neutralizar los aldehídos tóxicos y reducir sus efectos dañinos.

Por tanto, una composición que comprende ALDH2 también se puede administrar para tratar la toxicidad asociada con una deficiencia de ALDH2 en un sujeto que ha sufrido un evento isquémico, o para tratar individuos con deficiencia permanente de ALDH2 después del consumo de alcohol.

En los procedimientos descritos anteriormente, preferentemente, la ALDH2 o la composición que comprende ALDH2 se administra a un sujeto a una dosificación terapéuticamente eficaz de 0,001 g por kg de peso corporal a 5 g por kg de peso corporal. Más preferentemente, se administra ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 a un sujeto a una dosificación terapéuticamente eficaz de 0,1 g por kg de peso corporal a 2 g por kg de peso corporal. La dosificación terapéuticamente eficaz reducirá el nivel sistémico de sustancias químicas tóxicas (p. ej., una sustancia farmacológicamente activa o un subproducto metabólico tóxico de una sustancia) en al menos un 25 % después de la

administración, más preferentemente en al menos un 35 % de reducción después de la administración, y más preferentemente en al menos un 50 % de reducción medible dentro de las 2-24 horas siguientes a la administración de 12 h.

Se puede administrar ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 a un paciente que presente toxicidad debido a una deficiencia temporal aguda de ALDH2. Por lo general, esto se debe a la ingestión de una cantidad de una sustancia farmacológicamente activa (p. ej., alcohol) que supera los niveles naturales de ALDH2 disponibles para el metabolismo de esa sustancia. Para tales pacientes, este estado fisiológico es temporal y, por lo tanto, abordar la deficiencia temporal puede prevenir la toxicidad que de otro modo se observaría y evitar daños graves en los órganos o incluso la muerte.

El paciente puede estar sometido a tratamiento por adicción después de una deficiencia de ALDH2 causada por una interacción del fármaco disulfiram con alcohol. La administración de ALDH2 se puede usar para prevenir o reducir los efectos del disulfiram después de una recaída.

Por tanto, la administración de ALDH2 se puede incluir como parte de un tratamiento integral de adicción que aumentaría la abstinencia pero no se asociaría con muertes, tal como en un régimen de tratamiento para la adicción al alcohol, como complemento de la terapia con disulfiram o para tratar la intoxicación alcohólica aguda.

Para que sea adecuada para la administración, la composición comprenderá típicamente ALDH2 y un vehículo farmacéuticamente adecuado. La composición preferentemente comprende ALDH2 humana recombinante y opcionalmente comprende un agente activo distinto de ALDH2 que es útil para tratar la afección asociada con la deficiencia de ALDH2.

Una ventaja es que la administración de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 reduce o elimina la toxicidad asociada con la deficiencia de ALDH2 en un paciente que padece una deficiencia temporal aguda de ALDH2.

Una ventaja adicional es que la administración de ALDH2 puede restablecer el suministro de disulfiram a largo plazo como una opción de tratamiento muy eficaz para los pacientes con alcoholismo.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 es un gráfico que muestra el efecto de la dosis de fármaco sobre la tasa metabólica.

La FIG. 2 es una ilustración de las reacciones del metabolismo del etanol en el hígado.

La FIG. 3 es una ilustración que muestra la ruta para la formación de aldehídos tóxicos durante la lesión por isquemia-reperusión.

La FIG. 4 es un gráfico que ilustra los efectos de la administración intraperitoneal de ALDH después de la administración de etanol en un modelo de rata.

DEFINICIONES

Se pretende que los términos usados en el presente documento tengan su significado simple y ordinario tal como lo entienden los expertos en la técnica. Las siguientes definiciones pretenden ayudar al lector a comprender la presente invención, pero no pretenden variar o limitar de otro modo el significado de tales términos a menos que se indique específicamente.

Los términos "aldehído deshidrogenasa" o "ALDH", como se usan indistintamente en el presente documento, hacen referencia a toda o una forma o fragmento farmacológicamente activo de cualquier molécula de ALDH, incluyendo ALDH1 y ALDH2.

Los términos "aldehído deshidrogenasa 2" o "ALDH2", como se usan indistintamente en el presente documento, hacen referencia a toda o una forma o fragmento farmacológicamente activo de la molécula de ALDH2. La ALDH2 puede aislarse de una fuente biológica, sintetizarse o preferentemente se elabora usando medios recombinantes. Más preferentemente, la ALDH2 comprende la secuencia y estructura de la ALDH2 humana. La ALDH2 para uso en la presente invención puede modificarse, p. ej., para permitir el seguimiento de la molécula después de la administración o para afectar a la estabilidad de la molécula antes o después de la administración. La secuencia también puede modificarse para contener ciertos cambios conservados en la secuencia de la proteína que permiten que la molécula retenga su estructura y función.

El término "aislado" significará separado de su entorno natural. Una proteína aislada no está necesariamente separada de todos los materiales con los que normalmente está presente y puede permanecer asociada con ciertos elementos.

Los términos "modificar", "modificación" o "modificado" en referencia a una proteína tal como ALDH2 hacen referencia a una proteína que está alterada o derivatizada, por ejemplo, por unión, ligamiento, conjugación o complejación con otros restos químicos, por técnicas de modificación postraduccionales, o por sustitución de aminoácidos.

Los términos "ALDH2 PEGilada" o "PEG-ALDH2", como se usan en el presente documento, hacen referencia a una molécula de ALDH2 que comprende una o más moléculas de PEG ligadas.

Los términos "tratamiento", "tratando" y "tratar" y similares se usan en el presente documento para indicar en general la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente la toxicidad asociada con una deficiencia de ALDH2 o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de reducir parcial o completamente los efectos adversos atribuibles a la deficiencia de ALDH2. El "tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano.

DIVULGACIÓN DETALLADA

La información técnica que se expone a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá de la divulgación de la invención *per se*, que se define exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para colocar la invención real en un contexto técnico más amplio y para ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Tal información técnica adicional, que no entra dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, no es parte de la invención.

Propósito

El propósito del presente trabajo es proporcionar opciones para el tratamiento de afecciones fisiológicas asociadas con deficiencias enzimáticas y, en particular, deficiencias enzimáticas temporales. El uso de ALDH2 para combatir los efectos de una deficiencia, ya sea temporal o permanente, permite el tratamiento de diversas afecciones fisiológicas y la toxicidad asociada resultante de tal deficiencia.

En el caso de intoxicación por alcohol y reacción de alcohol-disulfiram, la administración de ALDH2 o una composición que comprenda ALDH2 sería un tratamiento muy eficaz para superar la deficiencia enzimática temporal. El tratamiento exitoso de la reacción alcohol-disulfiram permitiría el desarrollo de una combinación de disulfiram-dispositivo. El desarrollo de este tipo de dispositivo no es posible sin abordar los problemas de seguridad asociados con una reacción de alcohol-disulfiram posiblemente fatal.

La deficiencia temporal de la enzima ALDH2 también puede ocurrir como resultado de una lesión por isquemia-reperfusión, y la administración de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 también puede ser beneficiosa en esta población de pacientes. La presente invención es eficaz en el tratamiento de eventos asociados con el uso y/o adicción de fármacos, ya que la administración de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 disminuye el nivel tóxico del fármaco y el daño en los órganos terminales asociado con él.

El tratamiento con enzima ALDH2 es un tratamiento eficaz para la reacción de alcohol-disulfiram. Esta reacción ocurre cuando un paciente que toma disulfiram consume alcohol. El disulfiram es un inhibidor no competitivo de ALDH2, por lo que crea una deficiencia "artificial" de esta enzima. El tratamiento de la reacción grave de alcohol-disulfiram aumentaría significativamente la seguridad del disulfiram. Algunos otros fármacos (sulfonilureas, quinacrina, griseofulvina, cloranfenicol y otros) también pueden inhibir esta enzima dando como resultado una reacción similar al disulfiram cuando los pacientes beben alcohol. La ALDH2 recombinante humana también podría ser un tratamiento eficaz para la reacción similar al disulfiram.

Modificación de ALDH2

Un desafío importante para el uso terapéutico de muchos péptidos y proteínas es su corta vida media circulatoria. Por tanto, en determinados modos de realización de la invención, es deseable modificar la molécula de ALDH para mejorar sus propiedades terapéuticas. Por ejemplo, la conjugación de una secuencia de proteína o péptido terapéutico con un polímero biodegradable puede prolongar el mantenimiento de los niveles de fármaco terapéutico con respecto a la administración del fármaco en sí. La liberación sostenida puede extenderse hasta varias semanas dependiendo de la formulación y el ingrediente activo conjugado. Se apreciará que la modificación como se describe en el presente documento ocurre preferentemente sin una pérdida sustancial de función o actividad biológica en comparación con la función o actividad biológica de la proteína ALDH2 no modificada.

Un resto químico preferente para la modificación de ALDH2 es polietilenglicol (PEG). La PEGilación puede mejorar significativamente las propiedades fisicoquímicas (solubilidad y estabilidad) de productos biofarmacéuticos tales como ALDH2 al mismo tiempo que aumenta la semivida de circulación *in vivo*, p. ej., mediante la disminución de la degradación enzimática y/o la disminución del aclaramiento renal. El PEG transmite a moléculas tales como las proteínas sus propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, modifica también la biodistribución y la solubilidad de los productos biofarmacéuticos basados en proteínas. Más particularmente, la conjugación de PEG puede enmascarar la superficie de una proteína y aumentar el tamaño molecular de la proteína, reduciendo así su ultrafiltración renal, previniendo el acercamiento de anticuerpos o células procesadoras de antígenos y reduciendo la degradación por enzimas proteolíticas.

La modificación por PEGilación puede ocurrir en posiciones aleatorias o en una posición predeterminada dentro de ALDH2, y puede incluir una, dos, tres o más moléculas de PEG unidas como se describe en el presente documento. Hay varias metodologías disponibles para la PEGilación de proteínas y las químicas de conjugación. Se hace referencia a Roberts *et al.* (2002) *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:459-476 y Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16:157-182, y la publicación de EE. UU. n.º 2011/0196134, que proporcionan ejemplos no limitantes de varias metodologías disponibles para PEGilación de proteínas y químicas de conjugación.

Con el fin de evitar productos heterogéneos resultantes de la PEGilación aleatoria, se han desarrollado diferentes estrategias para la PEGilación específica de sitio de proteínas, mediante una combinación de mutagénesis específica de sitio y reacción química específica de residuo. Un procedimiento es la PEGilación selectiva de tiol orientada a residuos de cisteína libres. Esta estrategia se ha usado con éxito para sitios dirigidos.

El PEG puede tener una estructura ramificada o no ramificada. Se proporcionan ejemplos no limitantes de PEG ramificados adecuados para la conjugación con ALDH2 en la patente de EE. UU. 5.643.575. En modos de realización particularmente preferentes, el PEG es una estructura ramificada.

La molécula de PEG adecuada para uso en la presente invención puede tener cualquier peso molecular entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa, según se desee en la práctica. Típicamente, aunque no exclusivamente, las preparaciones de PEG existen como una mezcla heterogénea de moléculas de PEG por encima o por debajo del peso molecular indicado. A modo de ejemplo, el PEG puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 o 100000 Da. Preferentemente, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente entre aproximadamente 4500 Da y aproximadamente 70000 Da. Más preferentemente, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5500 Da.

En otro ejemplo, se puede usar ácido hialurónico conjugado para potenciar la liberación de ALDH2. El HA es un polisacárido lineal natural compuesto de unidades de disacárido alternas de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina con ligamiento interglucosídico β (1-4). El HA es el único glicosaminoglicano (GAG) no sulfatado que abunda en el líquido sinovial y la matriz extracelular (MEC). Se usó HA con un peso molecular elevado superior a 2 millones de Da para la formulación de liberación sostenida de la hormona del crecimiento humana (Kim *et al.*, J. Control. Rel. 104, 323-335, 2005) y se usaron hidrogeles de HA selectivamente reticulados para la encapsulación de eritropoyetina (Motokawa *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 78A, 459-465, 2006). También se usó HA para la conjugación con agentes citotóxicos activos, tales como paclitaxel (Luo *et al.*, Biomacromolecules 1, 208-218, 2000) y doxorubicina (Luo *et al.*, Pharm. Res. 19, 396-402, 2002).

En otro ejemplo, la ALDH2 puede modificarse para asociarse con proteínas más grandes para potenciar su vida media y/o actividad. Por ejemplo, tanto la IgG como la albúmina tienen semividas prolongadas de 19 días en comparación con unos pocos días o menos para otras proteínas circulantes.

En otro ejemplo más, la estructura de ALDH2 se puede modificar, p. ej., mediante acoplamiento a través de un enlace amida con al menos un sustituyente conformacionalmente rígido, ya sea en el extremo N-terminal del péptido, C-terminal del péptido, en un grupo amino o carboxilo libre a lo largo de la cadena peptídica, o en una pluralidad de estos sitios (véase la publicación de EE. UU. n.º 2003/0204063) o mediante la sustitución de L-aminoácidos análogos dentro de ALDH2 por D-aminoácidos.

Tratamiento de la intoxicación aguda por alcohol

La intoxicación por etanol es una afección tóxica aguda y potencialmente mortal resultante de la exposición a cantidades excesivas de etanol en un período corto de tiempo. La administración de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 puede usarse para el tratamiento de la intoxicación por alcohol, ya que ayudaría a superar la saturación enzimática y cambiaría el metabolismo del fármaco de una cinética de orden cero a una cinética de primer orden. En la cinética de primer orden, la cantidad de un fármaco que se metaboliza es proporcional al nivel del fármaco en lugar de constante. Este concepto se explica con más detalle a continuación.

La mayoría de las transformaciones metabólicas en el cuerpo son catalizadas por enzimas y siguen la cinética de Michaelis-Menten. En condiciones normales, el metabolismo de la mayoría de los fármacos sigue la cinética de Michaelis-Menten de primer orden y es directamente proporcional a la concentración del fármaco libre en sangre. Sin embargo, en el caso de una sobredosis, el metabolismo cambia de una cinética de primer orden a una cinética de orden cero. La cinética de orden cero ocurre porque las enzimas están saturadas y no hay suficientes enzimas para aumentar el metabolismo del fármaco. Como resultado, la cantidad de fármaco que se metaboliza durante un período de tiempo permanece constante e independiente de su concentración en sangre. Véase la Fig. 1, un gráfico de una dosis de etanol, donde V es la tasa de metabolismo del fármaco y K_m es la constante de Michaelis-Menten. A dosis bajas, el metabolismo del alcohol es de primer orden, es decir, proporcional a la dosis del fármaco. En dosis altas, el metabolismo del alcohol es de orden cero, constante e independiente de la concentración.

El etanol se metaboliza en el hígado a una tasa de aproximadamente una bebida por hora y grandes cantidades de alcohol pueden sobrecargar la capacidad metabólica del hígado, causando que la concentración de alcohol en sangre (CAS) suba rápidamente. Los efectos del etanol sobre el sistema nervioso central (SNC) son directamente proporcionales a su concentración en sangre. Con una CAS alta, ocurre una depresión del SNC y el corazón y los pulmones se anestesian parcialmente, lo que puede conducir a un coma o la muerte. A CAS de 0,25 a 0,40 g/decilitro, la intoxicación por alcohol puede provocar dificultad para hablar, ataxia, estupor, coma y, eventualmente, la muerte (Poikolainen K. y Vuori E. *Alcohol and Alcoholism* 20 (3):329-332. 1985).

En la población general, el estupor ocurre con una CAS de 0,25 a 0,40 %. El coma habitualmente se diagnostica con una CAS de 0,35 a 0,50 %. Todos los síntomas, tales como una intensificación de la pérdida de conocimiento, reflejos deprimidos, depresión respiratoria potencialmente mortal y bradicardia, se vuelven más pronunciados en esta etapa. La muerte por consumo de etanol es posible cuando la CAS alcanza el 0,4 %. Una CAS de 0,5 % o más es habitualmente mortal.

La intoxicación por etanol ocurre como resultado de la saturación de enzimas durante el metabolismo. Se propone el tratamiento con aldehído deshidrogenasa 2 humana recombinante (rhALDH2) para aumentar el metabolismo tanto del acetaldehído (un producto intermedio tóxico) como del etanol.

La mayor parte del metabolismo del etanol ocurre en las células del hígado, ya que el hígado tiene la mayor concentración de enzimas implicadas en el metabolismo. En la primera reacción del metabolismo del etanol, el etanol se oxida a acetaldehído a través de la enzima alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1). Esta primera reacción es reversible, y con niveles elevados de acetaldehído, los niveles de etanol y acetaldehído alcanzan el equilibrio (**Fig. 2**). La misma enzima ADH metaboliza la reacción en ambas direcciones. La actividad de ADH es significativamente mayor en la reacción inversa, para evitar la acumulación de acetaldehído tóxico (Umulis DM *et al.*, *Alcohol. en. de* 2005; 35 (1):3-12.

En condiciones normales, durante la segunda reacción, el acetaldehído, un metabolito altamente tóxico, es rápidamente metabolizado por ALDH2 para formar acetato. El acetato tiene propiedades significativamente menos tóxicas en comparación con el acetaldehído. Luego, el acetato se metaboliza en el hígado y el tejido adiposo para formar acetil-CoA. La conversión de acetato en acetil-CoA no es una reacción limitante de la velocidad. Con una alta dosis de consumo de etanol, ambas enzimas ADH1 y ALDH2 se saturan, conduciendo a un aumento significativo de los niveles de acetaldehído y etanol en la sangre y en el hígado.

Cuando la ALDH2 se satura, la segunda reacción metabólica (conversión de acetaldehído en acetato) se vuelve limitante de la velocidad. Después de la administración de rhALDH2, se eleva la saturación de ALDH2 y se restablece la cinética de primer orden, desplazando la reacción hacia la derecha. La retirada de acetaldehído movería el equilibrio de la primera reacción hacia la formación de acetaldehído, y como tanto la reacción directa como la inversa usan la misma enzima, habría un aumento significativo de la cantidad de enzima disponible para la reacción directa. Como resultado, habrá un aumento del metabolismo tanto del etanol como del acetaldehído. Ambas reacciones implican un portador intermedio de electrones, dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺), que se reduce en dos electrones para formar NADH. La concentración de NAD en la sangre es suficiente para soportar el aumento de la segunda reacción en el torrente sanguíneo. Mover la segunda reacción del hígado al torrente sanguíneo haría que hubiera más NAD disponible para la primera reacción.

Por ello, el metabolismo de los niveles tóxicos de alcohol y acetaldehído se aclararía más rápidamente para aliviar los síntomas potencialmente mortales (coma y muerte) de la depresión del SNC debido a la intoxicación. La administración de ALDH2 o una composición que comprenda ALDH2 permitiría el cambio del metabolismo del etanol de orden cero a primer orden y aumentaría significativamente el metabolismo del alcohol hasta su producto final y no tóxico.

Uso de ALDH2 para el tratamiento de la reacción de fármaco-disulfiram.

Los pacientes que toman disulfiram tienen una deficiencia de ALDH2, ya que es el mecanismo de acción de este fármaco. Si un paciente toma disulfiram y consume alcohol, acumula acetaldehído y desarrolla síntomas de intoxicación por acetaldehído (o reacción de alcohol-disulfiram). El miedo a esta reacción generalmente impide que las personas beban. Sin embargo, el acetaldehído es significativamente más tóxico que el etanol y puede ocurrir una intoxicación fatal por acetaldehído con dosis relativamente pequeñas de etanol.

La administración de ALDH2 o una composición que comprenda ALDH2 ayudaría a superar la deficiencia enzimática y permitiría que el metabolismo del acetaldehído ocurriera en el torrente sanguíneo en lugar de en las células hepáticas. La administración exógena de ALDH2 o una composición que comprenda ALDH2 sería un tratamiento muy eficaz para la reacción de alcohol-disulfiram. El tratamiento con disulfiram se vuelve mucho más seguro, ya que los posibles efectos secundarios ya no son inevitables ni es probable que sean letales.

El disulfiram también se puede usar para tratar la dependencia de la cocaína porque el disulfiram interfiere con el metabolismo de la cocaína al bloquear la enzima dopamina β-hidroxilasa (DBH), y también muestra eficacia para esta

indicación. El uso de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 también puede limitar la toxicidad cuando una persona que toma disulfiram ingiere cocaína.

Uso de ALDH2 con disulfiram de liberación controlada

La capacidad de limitar la toxicidad observada con las reacciones de un fármaco-disulfiram permite el uso de disulfiram con formatos de dosificación de liberación controlada, tales como los dispositivos implantables. Esto permite nuevos regímenes de tratamiento y el desarrollo de una nueva generación de combinaciones de disulfiram-dispositivo que suministran dosis que son bioequivalentes a las dosis administradas por vía oral usadas para tratar el alcoholismo.

Uso de ALDH2 en la lesión por isquemia-reperusión

Una cantidad significativa de datos científicos muestra que la enzima ALDH2 mitocondrial desempeña un papel fundamental en la cardioprotección. También se puede usar ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 para limitar un daño continuo adicional (p. ej., remodelación) que tiene lugar en eventos isquémicos limitando la toxicidad asociada con aldehídos tóxicos en el momento del evento isquémico.

Sin estar limitado por ninguna teoría en particular, el efecto cardioprotector de ALDH2 puede explicarse, al menos en parte, por el hecho de que esta enzima está implicada en la desintoxicación de aldehídos reactivos que se crean durante la lesión por isquemia-reperusión causada por IM (Budas, G. *et al.*, Trends in Cardiovascular Medicine, Vol. 19, Número 5, jul. de 2009 p 158-164; Chen CH *et al.* Science Vol 321 12 de sept. de 2008 p. 1493-5.) (Fig. 3). La isquemia-reperusión crea estrés oxidativo en las células del miocardio y da como resultado una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno (ERO) y H₂O₂. Las ERO se producen durante ambas etapas de la lesión por isquemia-reperusión. Durante la fase isquémica inicial, la producción de ERO ocurre debido a un desajuste metabólico a pesar de los bajos niveles de oxígeno (Ferrari R. *et al.*, Am. J. Of Clinical Nutrition, 1991; 53:21S-22S.). Sin embargo, cuando el oxígeno se vuelve abundante durante la reperusión, el proceso de formación de ERO se intensifica significativamente. (*Id.*). Aunque las ERO tienen una vida corta, son moléculas altamente tóxicas y reactivas y están causando cambios secundarios en las células del miocardio. Los niveles elevados de estrés inducido por ERO conducen a la peroxidación de lípidos (degradación oxidativa de los lípidos). El ERO crea radicales libres que "toman" electrones de los lípidos de las membranas celulares dando como resultado daño celular. La peroxidación de lípidos da como resultado la producción y acumulación de aldehídos tóxicos, los más importantes 4-hidroxinonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). En virtud de su mayor estabilidad química, estos aldehídos derivados de la peroxidación de lípidos se difunden mayores distancias en comparación con sus ERO precursores y se comportan como mensajeros tóxicos secundarios que pueden propagar y amplificar la lesión oxidativa (Srivastava S. *et al.*, Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol. 283:2612-2619, 2002. Publicado por primera vez el 22 de agt. de 2002).

La ALDH2 es una de las enzimas más importantes implicadas en el metabolismo de diferentes aldehídos tales como acetaldehído, 4-HNE y otros. La ALDH2 metaboliza los aldehídos en ácidos no tóxicos y no reactivos, que se retiran del cuerpo con relativa rapidez o entran en otras rutas metabólicas. El 4-HNE se usa como marcador de la peroxidación lipídica inducida por radicales (POL) (Blasig I. *et al.*, Am. J. Physiol., 269 (Heart Circ. Physiol. 38 H1-H22)). Un estudio realizado en el corazón aislado de ratas Wistar-Kyoto mostraba aumentos estadísticamente significativos en los niveles de 4-HNE (P < 0,05) 2 min después del inicio de la reperusión (después de 30 minutos de isquemia total y global) (*Id.*). El 4-HNE tiene muchos efectos negativos sobre las células del miocardio y, como cardiotoxina, el 4-HNE inhibe directamente la contractilidad e induce efectos proarrítmicos en miocitos cardíacos aislados, lo que causa daño adicional después de la isquemia cardíaca (Chen CH *et al.* *Id.*) El uso de ALDH2 después de un evento isquémico puede ser útil para metabolizar el 4-HNE y otros aldehídos dañinos para prevenir daño tisular adicional.

La inactivación de ALDH2 también reduce la eficacia de la nitroglicerina (NTG), el fármaco que se usa con frecuencia para tratar la angina de pecho y el IM. El principal mecanismo de acción de la NTG es la dilatación de los vasos cardíacos. La ALDH2 media la biodisponibilidad de NTG convirtiéndola en dinitrato de 1,2-glicerol, el metabolito activo del fármaco. La disminución de la actividad de ALDH2 puede estar implicada en un aumento de la tolerancia (disminución de la respuesta) a la NTG tanto en animales como en seres humanos. La disminución de la respuesta a la NTG puede contribuir a un aumento del tamaño del IM. La propia NTG contribuye a la disminución de la actividad de ALDH2, lo que da como resultado un aumento adicional de la "carga aldehídica" y el tamaño del IM (Chen CH *et al.* *Id.*).

El efecto tóxico de los aldehídos endógenos no solo afecta a las células donde se producen, sino también a las células miocárdicas adyacentes. Los aldehídos se mueven fácilmente a través de las membranas celulares y pueden causar la formación de aductos en otras células del miocardio que no se están afectadas directamente por la isquemia grave. El efecto negativo de los aldehídos sobre las células del miocardio está bien documentado. Los niveles elevados de aldehído por el consumo excesivo de alcohol desempeñan un papel importante en el desarrollo de la miocardiopatía cardíaca relacionada con el alcohol. Los aldehídos ambientales y dietéticos también pueden contribuir al daño durante el IM (Chen CH *et al.* *Id.*).

Todos estos factores implican que los aldehídos tóxicos reactivos desempeñan un papel significativo en la fisiopatología del daño causado por la isquemia cardíaca aguda-reperusión. La ALDH2 mitocondrial desempeña un

papel significativo en la cardioprotección al disminuir el estrés oxidativo y al reducir la "carga aldehídica" de las células del miocardio (Chen, 2008).

La administración de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 durante o inmediatamente después del evento isquémico puede limitar el daño adicional causado por estos aldehídos. La administración de ALDH2 disminuirá la "carga aldehídica" en el líquido intersticial, lo que dará como resultado la difusión de aldehídos tóxicos desde las células del miocardio hacia el líquido intersticial, basada en el gradiente de concentración. También disminuirá la carga de aldehído de las células miocárdicas moribundas a las células miocárdicas adyacentes y mejorará la supervivencia de las células afectadas solo parcialmente por la isquemia.

Administración

La administración de un compuesto de la invención se realiza mediante administración intravenosa. La ALDH2 se puede incorporar en una variedad de formulaciones para administración terapéutica, incluyendo combinando ALDH2 con vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados. Las formas de dosificación unitaria para administración intravenosa pueden comprender ALDH2 en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable. También se puede formular en una composición con otros agentes activos.

Los implantes para formulaciones de liberación sostenida son bien conocidos en la técnica. Los implantes se formulan como microesferas, placas, etc. con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el hospedador.

Dosificación

Dependiendo del paciente y de la afección que se esté tratando y de la vía de administración, las composiciones de la invención se administrarán generalmente como una dosificación terapéuticamente eficaz de 0,001 g por kg de peso corporal a 5 g por kg de peso corporal. Más preferentemente, las composiciones de la invención se administrarán generalmente como una dosificación terapéuticamente eficaz de 0,1 g por kg de peso corporal a 2 g por kg de peso corporal. Pueden usarse dosis más altas para vías de suministro localizadas.

En un sujeto bajo la influencia de una sustancia farmacológicamente activa, la cantidad de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 que se administra es suficiente para dar como resultado una disminución medible en los niveles sistémicos de al menos un aldehído tóxico en el torrente sanguíneo del sujeto, y preferentemente una disminución medible de dos o más aldehídos tóxicos en el torrente sanguíneo del sujeto. La disminución medible de los aldehídos tóxicos puede ser del 5-99 %, más preferentemente una disminución de al menos un 10 % en los niveles sistémicos de aldehídos tóxicos en el torrente sanguíneo del sujeto, más preferentemente una disminución de al menos un 20 % en los niveles sistémicos de aldehídos tóxicos en el torrente sanguíneo, más preferentemente una disminución de al menos un 30 % en los niveles sistémicos de aldehídos tóxicos en el torrente sanguíneo, más preferentemente una disminución de al menos un 40 % en los niveles sistémicos de aldehídos tóxicos en el torrente sanguíneo, y más preferentemente una disminución de al menos un 50 % en los niveles sistémicos de aldehídos tóxicos en el torrente sanguíneo.

Preferentemente, en un sujeto bajo la influencia de una sustancia farmacológicamente activa, la cantidad de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 que se administra es suficiente para restaurar la cinética de primer orden de la sustancia farmacológicamente activa.

En un sujeto que está sufriendo o ha sufrido un evento isquémico, la cantidad de ALDH2 o una composición que comprende ALDH2 que se administra también es suficiente para dar como resultado una disminución medible del tamaño del IM o daño isquémico a otros órganos.

Una dosificación típica puede ser: una solución adecuada para administración intravenosa. Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar según la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Preferentemente, la ALDH2 o la composición que comprende ALDH2 se administra en un nivel que devolverá el nivel de toxicidad a un nivel no asociado con la patología. Como esta cantidad variará según la cantidad de fármaco ingerido o el nivel de lesión sufrida, el facultativo médico debe ajustarla.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos han de considerarse ilustrativos y no restrictivos.

Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o casi la atmosférica.

Ejemplo 1: Administración intraperitoneal de ALDH

Se dividieron 16 ratas macho Sprague Dawley (peso 275-330 g) en un grupo de tratamiento activo y un grupo de placebo, cada grupo compuesto por ocho animales. Tanto el grupo activo como el de placebo recibieron una solución de etanol al 20 %, que se administró mediante inyección intraperitoneal. Después de la administración de etanol, se recogieron los niveles de etanol en tres puntos temporales: Punto 0 a los 30 minutos después de la administración de etanol, Punto 1 a la 1 hora después de la administración de etanol y Punto 3 a las 2 horas después de la administración de etanol (Fig. 4). El grupo de tratamiento recibía 200 µl de solución de enzima ALDH a 300 U/solución salina en el Punto 0 o 30 minutos después de la administración de etanol. El grupo de control recibía una cantidad igual de solución salina normal por vía intravenosa en los puntos temporales. Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de NAD en NADH a pH 8,0 cuando está a temperatura ambiente. Para cada animal, la dosis de la enzima ALDH se calculó basándose en su peso corporal más reciente. Como se muestra en la Fig. 4, antes de la administración de la enzima, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de control y de tratamiento. Los niveles eran $533 \pm 25,5$ y $525 \mu\text{mol/l} \pm 31$ en los grupos de tratamiento y control, respectivamente. 30 minutos después de la administración de la enzima y etanol (o 1 hora después de la administración de etanol), los niveles de etanol en sangre eran $363 \pm 23,4$ en el grupo de tratamiento y $595 \mu\text{mol/l} \pm 16,9$ en el grupo de control, lo cual es estadísticamente significativo ($P < 0,005$). 120 minutos después de la administración de etanol (punto 3) los niveles de etanol eran $366,4 \pm 30,5$ y $605 \mu\text{mol/l} \pm 28,4$ también estadísticamente significativos. ($P < 0,05$)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende aldehído deshidrogenasa 2 para uso en el tratamiento de la toxicidad del aldehído resultante del metabolismo del etanol después de que un sujeto haya consumido etanol, en la que la composición ha de administrarse por vía intravenosa en una dosificación terapéuticamente eficaz, en la que la dosificación da como resultado una reducción de al menos un 25 % del nivel sistémico de aldehído tóxico en el sujeto.
- 10 2. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el sujeto tratado tiene una deficiencia genética de aldehído deshidrogenasa 2.
3. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el sujeto tratado tiene una deficiencia temporal de aldehído deshidrogenasa 2.
- 15 4. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada por que al sujeto se le ha administrado disulfiram.
5. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizada por que el sujeto tiene una reacción alcohol-disulfiram.
- 20 6. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizada por que al sujeto se le ha administrado una o más seleccionadas de sulfonilureas, quinacrina, griseofulvina y cloranfenicol.
7. Composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada por que el sujeto tiene una reacción de tipo disulfiram.
- 25 8. Una composición que comprende aldehído deshidrogenasa 2 para uso en el tratamiento de la toxicidad por aldehído resultante de una lesión isquémica en un sujeto que ha sufrido un evento isquémico, en la que la composición ha de administrarse por vía intravenosa en una dosificación terapéuticamente eficaz, en la que la dosificación da como resultado una reducción de al menos un 25 % del nivel sistémico de uno o más aldehídos tóxicos seleccionados de 30 4-hidroxinonenal y malondialdehído en el sujeto.
9. Composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la dosificación terapéuticamente eficaz es de 0,001 g por kg de peso corporal a 5 g por kg de peso corporal.
- 35 10. Composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la aldehído deshidrogenasa 2 es una aldehído deshidrogenasa PEGilada.
11. Composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición comprende aldehído deshidrogenasa 2 y un vehículo farmacéuticamente adecuado.
- 40 12. Composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la composición contiene además un agente activo adicional.







