



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 770**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02758547 .0**

96 Fecha de presentación : **22.08.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1456670**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2004**

54

Título: **Procedimientos relacionados con el tratamiento de la aterosclerosis.**

30

Prioridad: **22.08.2001 GB 0120428**
18.09.2001 US 323127 P
06.02.2002 GB 0202774
06.02.2002 US 355655 P
27.02.2002 GB 0204611
16.07.2002 GB 0216530
18.07.2002 GB 0216755

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2009

73

Titular/es: **Cambridge Theranostics Ltd.**
21 Cambridge Science Park Milton Road
Cambridge CB4 0TP, GB
Ivan Mikhailovich Petyaev

72

Inventor/es: **Petyaev, Ivan**

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 329 770 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 relacionados con el tratamiento de la aterosclerosis.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar y/o obtener compuestos útiles en el tratamiento de aterosclerosis y condiciones relacionadas en un individuo.

10 Auto-anticuerpos contra lípidos tales como colesterol [Swartz G.M., Jr., *et al* Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, 1902-1906, Alving C.R. y Swartz G.M., Jr. Critical Reviews in Immunology (1991), 10, 441-453.], fosfolípidos [Alving C.R. Biochem. Soc. Trans. (1984), 12, 342-344.] y lipoproteínas de baja densidad (LDL) se encuentran en plasma humano [Kabakov A.E. *et al* Clin. Immun. Immunopath. (1992), 63, 214-220, Mironova M *et al* *Ibid.* (1997), 85, 73-82.] y están implicados en el desarrollo de aterosclerosis [Lopes-Virella M.F. y Virella G. Clin. Immun. Immunopath. (1994), 73, 155-167, Kiener P.A. *et al* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (1995), 15, 990-999].

15 De manera separada, ni los anticuerpos ni las LDL son un factor patogénico, solamente el complejo inmune de los dos [Tertov V.V. *et al* Atherosclerosis (1990), 81, 183-189, Orekhov A.N. *et al* Biochem. Biophys. Res. Comm. (1989), 162, 206-211.].

20 Los complejos inmunes que comprenden lipoproteínas de plasma no modificadas se conocen que tienen una baja aterogenicidad. Sin embargo, si las lipoproteínas se modifican, en particular se oxidan, estos complejos inmunes se vuelven muy aterogénicos [Orekhov A.N. *et al* Biobhem. Biophys. Res. Comm. (1989), 162, 206-211, Orekhov A.N. *et al* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (1991), 11, 316-326.]. La oxidación de lípidos de plasma, que toma la forma de peroxidación, se considera generalmente que es la responsable del desarrollo de aterosclerosis y es una característica observada y publicada de manera consistente de esta enfermedad en la medicina [Goto Y. In: Lipid Peroxides in Biology and Medicine, Ed. Yagi K., Academic Press, New York, London, Tokyo (1982), 295-303, Halliwell B. y J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press, Oxford, 1989, Schultz D *et al* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. (2000), 20, 1412-1413.]. Sin embargo, hasta la presente descripción, la causa de esta peroxidación era oscura.

30 La presente invención se refiere al descubrimiento de que un subgrupo particular de auto-anticuerpos son capaces de unir y oxidar lípidos y lipoproteínas. Estos anticuerpos catalíticos, que son el primer ejemplo informado de abzimias anti-lípidos, reaccionan y oxidan una lipoproteína de baja densidad para generar factores muy aterogénicos. Estas abzimias, por lo tanto, representan un factor patogénico clave que es responsable del desarrollo de aterosclerosis. Los auto-anticuerpos contra la oxidación de lípidos tal como se describen aquí representan un objetivo importante para la intervención terapéutica en el tratamiento de condiciones relacionadas con la aterosclerosis.

35 Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para obtener un inhibidor de oxidación de lípidos mediado con anticuerpos, tal como se indica en la reivindicación 1.

40 Estos inhibidores pueden ser útiles para el tratamiento de aterosclerosis u otro desorden aterosclerótico.

En términos generales, un procedimiento en ensayo para obtener un inhibidor de peroxidación de lípidos mediado con anticuerpos puede comprender:

45 (a) poner el contacto un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un compuesto de prueba; y

(b) determinar la unión de dicho compuesto de prueba a dicho anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

50 La unión entre el compuesto de prueba y el anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos se puede determinar mediante cualquiera de una serie de técnicas disponibles en la técnica, cualitativas y cuantitativas, tal como se describen aquí y son indicativas del compuesto de prueba que es un modulador candidato de la oxidación de lípidos mediado con anticuerpos. La determinación de la unión puede incluir la medición o detección de la unión.

55 Un procedimiento puede utilizar una muestra de un individuo y puede comprender determinar la unión de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos con un antígeno o la actividad de oxidación de lípidos de un anticuerpo anti-clamidia en la muestra, tal como se describe anteriormente en presencia de un compuesto de prueba.

60 Un procedimiento de ensayo para obtener un inhibidor de peroxidación de lípidos mediado con anticuerpos comprende:

(a) poner en contacto un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un antígeno en presencia de un compuesto de prueba; y

65 (b) determinar la unión de dicho antígeno a dicho anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

ES 2 329 770 T3

Un procedimiento para filtrar un inhibidor de oxidación de lípidos mediado con anticuerpos puede comprender:

(a) mezclar un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un antígeno en presencia de un compuesto de prueba, siendo sospechoso dicho compuesto de prueba de ser un inhibidor de la oxidación de lípidos mediado con anticuerpos; y

(b) determinar cualquier unión de dicho antígeno con dicho anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos en presencia de dicho compuesto de prueba, con lo cual dicho compuesto de prueba es un inhibidor de oxidación de lípidos medido con antígeno cuando se detecta una falta de unión o disminución en la unión de dicho antígeno a dicho anticuerpo en presencia de dichos compuestos de prueba.

Este procedimiento se puede usar para identificar un compuesto de prueba como agente que modula la unión y/o actividad de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

Un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos adecuado puede obtenerse a partir de una muestra de un individuo tal como se describe anteriormente, por ejemplo una muestra de una lesión aterosclerótica de un individuo. Alternativamente, se puede generar un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos usando medios inmunológicos convencionales, tal como se describen posteriormente. En algunas realizaciones, un anticuerpo se puede aislar y/o purificar.

Un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos es una molécula que es un miembro de la super-familia de inmunoglobulinas que está asociado con la actividad de unión y catalítica. Después de la purificación, por ejemplo, usando proteína G, un anticuerpo de oxidación de lípidos muestra tanto unión al antígeno como actividad catalítica (es decir, oxidación de lípidos). El anticuerpo de oxidación de lípidos puede ser un anti-auto anticuerpo, es decir, el anticuerpo se puede unir específicamente a un antígeno del individuo o huésped que produjo el anticuerpo.

La unión del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos con el antígeno en presencia de un compuesto de prueba se puede comparar con la interacción del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos en el antígeno en el medio de reacción y condiciones comparables en ausencia de un compuesto de prueba.

Una diferencia (es decir, un aumento o una disminución) en la unión en presencia del compuesto de prueba respecto a la ausencia es indicativa de que el compuesto de prueba es un agente que puede modular la unión del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y el antígeno.

Los compuestos de prueba que reducen o inhiben la unión de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un antígeno se pueden identificar usando condiciones que, en ausencia de un agente de prueba positivo, permiten que se produzca esta unión. Estos compuestos se pueden usar como agentes para inhibir la función de las abzimas de oxidación de lípidos, por ejemplo en el tratamiento de desórdenes ateroscleróticos.

Una diferencia (es decir, un aumento o una disminución) en la unión en presencia de compuesto de prueba relativo a la ausencia es indicativa de que el compuesto de prueba es un agente que puede modular la unión del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y el antígeno.

Un antígeno adecuado puede ser un antígeno de lípidos, por ejemplo un lípido, una lipoproteína o un lipopolisacárido tal como se describe también a continuación.

Un procedimiento de ensayo de la invención también puede comprender la determinación de la actividad de oxidación del anticuerpo.

Un procedimiento de ensayo para obtener un inhibidor de un anticuerpo de oxidación de lípidos puede comprender:

(a) poner en contacto un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un compuesto de prueba; y

(b) determinar la actividad de oxidación de lípidos de dicho anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

El anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y el compuesto de prueba se pueden poner en contacto en presencia de un antígeno de lípidos. La actividad de oxidación de lípidos se puede determinar determinando la oxidación del antígeno de lípidos mediante el anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos, es decir, la actividad de oxidación de lípidos de dicho anticuerpo se puede deducir a partir de la medición de la oxidación del antígeno de lípidos.

La actividad de oxidación de lípidos en presencia de un compuesto de prueba se puede comparar con la actividad de oxidación de lípidos en medio y condiciones de reacción comparables en ausencia de un compuesto de prueba. Una diferencia (es decir, un aumento o disminución) en la actividad de oxidación de lípidos en presencia del compuesto de prueba respecto a la ausencia es indicativa que el compuesto de prueba es un agente que puede modular la actividad del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

ES 2 329 770 T3

Los compuestos de prueba que reducen o inhiben la actividad de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos se pueden identificar usando condiciones en las que, en ausencia de un agente de prueba positivo, el anticuerpo oxida lípidos. Estos compuestos se pueden usar como agentes para inhibir la función de las abzymas de oxidación de lípidos, por ejemplo en el tratamiento de desórdenes ateroscleróticos.

Un procedimiento para filtrar un inhibidor de oxidación de lípidos mediada con anticuerpos puede comprender:

(a) mezclar un compuesto de prueba anti-clamidia de oxidación de lípidos y un antígeno de lípidos en presencia de un compuesto de prueba, siendo sospechoso dicho compuesto de prueba de ser un inhibidor de oxidación de lípidos mediada con anticuerpos; y

(b) determinar la oxidación de dicho antígeno de lípidos en dicho anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos en presencia de dicho compuesto de prueba, con lo cual dicho compuesto de prueba es un inhibidor de la oxidación de lípidos mediada con antígenos cuando se detecta una falta de oxidación o disminución en la oxidación de dicho antígeno en presencia de dicho compuesto de prueba.

Este procedimiento se puede usar para identificar un compuesto de prueba como agente que modula la unión y/o actividad de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

La determinación de la unión o actividad puede ser cuantitativa o cualitativa y puede incluir la detección de la existencia de la unión o actividad, que puede incluir, por ejemplo, la detección de la existencia de una unión o actividad por encima de un cierto valor límite, y la medición de la cantidad o nivel de la unión o actividad.

Por ejemplo, un procedimiento puede comprender capturar un anticuerpo de una muestra de suero, por ejemplo usando un anticuerpo anti-idiotípico inmovilizado, y determinar la actividad de oxidación de lípidos del anticuerpo capturado en presencia o ausencia del compuesto de prueba.

Un antígeno puede ser un miembro de una familia de moléculas que comparten una alta identidad de secuencia (es decir, homólogas) que se encuentran en un rango de agentes infecciosos (por ejemplo, en dos o más especies de bacteria gram-ve) o el antígeno puede ser específico para un agente infeccioso particular (es decir, no tiene homólogos en otras especies). Además, el mismo epítotope puede estar presente en antígenos de diferentes agentes infecciosos que, de otra manera, no comparten altos niveles de identidad de secuencia (es decir, no homólogos). Ejemplos de antígenos que son comunes en un rango de agentes infecciosos incluyen apo-lipoproteína B, OmpA, lipopolisacárido, hsp60 MQMP, (P)OMP, p54 y lípido A.

La unión y las actividades catalíticas pueden ser intrínsecas a un anticuerpo de oxidación de lípidos. Alternativamente, la actividad de oxidación de lípidos puede ser debida a una molécula catalítica que está fuertemente unida al anticuerpo y se copurifica con el mismo (por ejemplo una columna de proteína G/proteína A o proteína L) en un complejo. Esta molécula catalítica puede ser una inmunoglobulina o una no inmunoglobulina, tal como una enzima o ión de metal. Después de la purificación, el complejo muestra la actividad de unión del anticuerpo y la actividad catalítica de la molécula catalítica. Alternativamente, un anticuerpo de oxidación de lípidos puede iniciar la oxidación de lípidos mediante otro mecanismo, por ejemplo alterando el ambiente del antígeno de lípidos (por ejemplo a través de la activación de monocitos) o alterando el lípido o la lipoproteína para facilitar la oxidación de lípidos.

Un anticuerpo catalítico puede ser específico para un epítotope particular que es llevado por una pluralidad de antígenos y puede, por lo tanto, unirse a diferentes antígenos que llevan el mismo epítotope. El anticuerpo puede no mostrar ninguna unión significativa a otros epítotopes. El anticuerpo se dice así que se “une específicamente” al epítotope o a un antígeno que comprende el epítotope. Un epítotope que es reconocido por el anticuerpo puede ser compartido mediante una molécula huésped y un antígeno de un agente infeccioso, por ejemplo, una bacteria, hongo, virus o protozoo. Un anticuerpo de oxidación de lípidos producido mediante un huésped en respuesta a un antígeno extraño, por ejemplo durante una infección patogénica, puede así reaccionar con los lípidos o las lipoproteínas del huésped u otros antígenos.

El anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos se puede unir así a un antígeno huésped (por ejemplo un anti-auto anticuerpo) y a un antígeno extraño y puede catalizar la oxidación de una o las dos de estas moléculas.

Un anticuerpo en un procedimiento tal como se describe aquí se puede aislar, purificar y/o extraer a partir de una muestra, puede estar comprendiendo en un suero, plasma, sangre u otra muestra biológica, o puede estar comprendida en el sistema vascular de un modelo animal. Preferiblemente, el anticuerpo está en una muestra de sangre, suero o plasma. Un anticuerpo o una molécula de anticuerpo tal como se describe aquí puede ser, por ejemplo, una molécula IgG de dicha muestra.

Los individuos a los cuales se les extraen las muestras y/o en los cuales se modula la actividad de las abzymas pueden incluir humanos y animales no humanos, incluyendo animales domésticos tales como perros, gatos, caballos y loros, animales de granja tales como ovejas y ganado, y animales raros o exóticos tales como elefantes y tigres. Las referencias a “humano” aquí deben entenderse que incluyen “animal no humano” excepto que el contexto específico dicte lo contrario.

ES 2 329 770 T3

Las moléculas de anticuerpo que catalizan la oxidación de lípidos se refieren aquí como moléculas de anticuerpo catalítico, abzimas anti-lípido, abzimas o anticuerpos de oxidación de lípidos. Tal como se ha descrito anteriormente, estos anticuerpos catalíticos pueden tener una actividad de oxidasa de lípidos intrínseca o inherente u otra actividad que provoca la oxidación de lípidos o se pueden asociar de manera natural (es decir, unirse o fijarse de una manera no covalente en su estado natural en el cuerpo) con una molécula que tiene actividad de oxidasa de lípidos.

Los anticuerpos de oxidación de lípidos se pueden aislar de una lesión aterosclerótica de un individuo que sufre de un desorden aterosclerótico. Alternativamente, el anti-auto anticuerpo de oxidación de lípidos se puede obtener usando técnicas inmunológicas convencionales.

Los procedimientos de producción de estos anticuerpos incluyen la inmunización de un mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, caballo, cabra, oveja o mono) con un antígeno, que puede ser, por ejemplo, un antígeno de célula de clamidea. Las moléculas de anticuerpo se pueden obtener de animales inmunizados usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, y filtrarse, por ejemplo usando ensayos de oxidación de lípidos tal como se describen aquí y/o determinando la unión del anticuerpo con el antígeno de interés. Se pueden usar técnicas Western blotting o de inmunoprecipitación (Armitage *et al.* 1992, Nature 357: 80-82). El aislamiento de anticuerpos y/o células que producen anticuerpos de un animal puede estar acompañadas de una etapa de sacrificio del animal.

Otra aproximación es identificar anticuerpos de oxidación de lípidos adecuados para filtrar librerías de visualización de fagos usando técnicas estándar (ver capítulo 18 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Revised Edition, Cold Spring Harbor Lab Press (31 Dec 2000), Dematis *et al* J. Mol. Biol. (1999) 286(2) 617-633, Harrison *et al* Methods Enzymol. (1996) 267 83-109).

Los datos experimentales muestran aquí que un subgrupo de anticuerpos que aumentan en respuesta a infección de clamidia son los auto-anticuerpos que reaccionan a través con antígeno huésped y causan la peroxidación de lípido de plasma. Los anticuerpos anti-clamidia catalíticos se muestran que están presentes en fracciones IgG de anti-lipoproteína extraídos de lesiones ateroscleróticas humanas y del suero de pacientes con complicaciones clínicas de aterosclerosis, pero sin IgG extraído a partir del suero de personas sanas. Los anticuerpos catalíticos que se unen y oxidan lípidos tal como se describen aquí, por lo tanto, puede reaccionar, es decir, unirse, con una célula de clamidia.

Aunque la aterosclerosis ha estado vinculada en el pasado con la presencia en la pared arterial de la bacteria *Chlamydia pneumoniae* [Roivainen M. *et al* Circulation (2000), 101, 252-257, Siscovick D.S. *et al.* J. Infect. Dis. (2000), 181, Suppl. 3, S417-420], una prueba serológica para detectar anticuerpos anti-clamidia específicos en el plasma o suero de pacientes [Mendall M. *et al* (1995) J. Infect. 30 121-128, Wang S-P *et al* (1970) 70 367-374] no se puede usar para identificar o distinguir un paciente con aterosclerosis. Una parte significativa de la población tienen un historial de infección de clamidia y, como resultado de esto, tienen anticuerpos anti-clamidia específicos en su suero, sin ninguna manifestación clínica de aterosclerosis [Davidson M. *et al* Circulation (1998), 98, 628-633m, Song Y.G. *et al* Yonsei Med. J. (2000), 41, 319-327.]. Por lo tanto, los anticuerpos anti-clamidia por sí mismos en el plasma o suero no son indicativos de aterosclerosis y no son objetivos potenciales para terapia.

Sin embargo, se muestra aquí que anticuerpos anti-clamidia catalíticos que reaccionan de manera cruzada con antígenos humanos y catalizan la oxidación de lipoproteínas de plasma que son útiles como objetivos para el tratamiento de desórdenes ateroscleróticos.

Así, las moléculas de anticuerpos que oxidan lípidos pueden ser abzimas anti-clamidia o moléculas de anticuerpo, es decir, se unen o son reactivas con un antígeno de célula de clamidia.

Un antígeno de clamidia tal como se describe aquí puede ser cualquier inmunogén o componente inmunogénico de una célula de clamidia, es decir, una molécula a partir de clamidia que evoca o es capaz de evocar una respuesta inmune en un mamífero contra la célula de clamidia, por ejemplo Hsp60 (Huittinen *et al* (2001)-Eur Resp. J. 17 (6) 1078-1082, Kinnunen A. *et al* (2001) Scand. J. Immunol. 54(1-2) 76-81). Preferiblemente, el antígeno es una proteína o antígeno de lípido, es decir, comprende o consiste en un grupo o fracción de lípidos. Un antígeno de lípidos puede ser, por ejemplo, un lípido, una lipoproteína u otro componente celular asociado con lípidos que se une a los anticuerpos anti-clamidia y el término "antígeno de lípido" se refiere a cualquiera de estos componentes. Este antígeno se puede purificar y/o aislar o estar comprendido en una célula de clamidia. Los anticuerpos que crecen contra apo-lipoproteína B humana se han mostrado que con reactivos con células de clamidia (ver el ejemplo 7). En algunas realizaciones, un anticuerpo de oxidación de lípidos tal como se describe aquí puede ser reactivo con apolipoproteína B humana.

Procedimientos adecuados para purificar y/o aislar esta lipoproteína son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, HPLC.

Una célula de clamidia puede ser una célula de una especie que pertenece al grupo de *clamidia psittaci*. El grupo de *clamidia psittaci* incluye *clamidia psittaci* y *clamidia pneumoniae*. En algunas realizaciones preferidas, la célula de clamidia es una célula de *clamidia psittaci* ovina. Preparaciones adecuadas de *clamidia psittaci* ovina viva en una forma liofilizada están disponibles comercialmente (Intervet).

ES 2 329 770 T3

Procedimientos de ensayo para moduladores de oxidación de lípidos mediada con anticuerpos, tal como se describe aquí, son particularmente adecuados para formatos de alta producción. Estos formatos son bien conocidos para su uso en programas de filtrado automatizados a gran escala.

5 Un compuesto de prueba que es un inhibidor candidato puede ser una pequeña entidad química, péptido, molécula de anticuerpo u otra molécula cuyo efecto sobre la actividad de oxidación de lípidos o unión entre un anticuerpo de oxidación de lípidos y un antígeno de lípidos se determina. Compuestos de prueba adecuados se pueden seleccionar entre colecciones de compuestos y compuestos diseñados, por ejemplo usando química combinatoria tal como se describe posteriormente. Compuestos de prueba particulares adecuados incluyen queladores de metal, antioxidantes,
10 imitadores de epítipo y anticuerpos anti-idiotípicos, tal como se describen aquí.

La tecnología de librería combinatoria (Schultz, JS (1996) *Biotechnol. Prog.* 12:729-743) proporciona una vía eficiente de probar un número potencialmente vasto de sustancias diferentes para su capacidad para modular la actividad de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos. Tal como se ha descrito anteriormente, antes o cuando se filtra
15 para la modulación de la actividad de oxidación de lípidos, las sustancias de prueba se pueden filtrar por su capacidad para unirse con el anticuerpo. Esto se puede usar como un filtrado en bruto antes de probar una sustancia para su capacidad real de modular la actividad del anticuerpo.

La cantidad de sustancia o compuesto de prueba que se puede añadir a un ensayo de la invención se determinará normalmente mediante prueba y error dependiendo del tipo de compuesto usado. Típicamente, se pueden usar concentraciones de entre aproximadamente 0,01 y 100 nM de compuesto inhibidor putativo, por ejemplo entre 0,1 y
20 10 nM.

Los compuestos que se pueden usar pueden ser compuestos químicos naturales o sintéticos usados en programas de filtrado de fármacos. También se pueden usar extractos de plantas que contienen varios componentes caracterizados o no caracterizados.

Otros compuestos inhibidores candidatos se pueden basar en el modelado de la estructura tridimensional del anticuerpo de oxidación de lípidos y/o el antígeno de lípidos al cual se une y usando un diseño de fármacos racional para proporcionar compuestos inhibidores potenciales con una forma molecular particular, tamaño y características de
30 carga.

La reactividad y actividad catalítica de una molécula de anticuerpo se puede determinar mediante cualesquiera medios apropiados. En algunas realizaciones, una molécula de anticuerpo, un anticuerpo anti-idiotípico que se une a la molécula del anticuerpo, o una célula o antígeno de clamidia se pueden marcar con una molécula reportera individual.
35 En otras realizaciones, una molécula o sustancia reportera se puede encapsular en un liposoma u otro micro-contenedor y liberarse en el medio para su detección cuando el liposoma se degrada mediante oxidación de lípidos. Las moléculas reporteras pueden generar de manera directa o indirecta señales detectables, y preferiblemente que se pueden medir.

Si se requiere, en enlace de las moléculas reporteras puede ser directo o indirecto, covalente, por ejemplo a través de una unión de péptidos, o no covalente. El enlace a través de una unión de péptidos puede ser como resultado de la expresión recombinante de una molécula de unión que codifica una fusión de genes (por ejemplo anticuerpo) y una molécula reportera.

45 Un modo es mediante enlace covalente de cada elemento de unión con una tinta de fluorocromo, fósforo o láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. En otros formatos, los fluorocromos o tintas se pueden encapsular en liposomas. Fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red. Tintas cromogénicas adecuadas incluyen diaminobenzidina.

Otros reporteros incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas tales como cuentas de látex que están coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológica o químicamente activos que pueden provocar directa o indirectamente señales detectables que se observan visualmente, se detectan electrónicamente o se registran de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan las reacciones que desarrollan o cambian colores o provocan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de
55 manera que las transiciones electrónicas entre los estados de energía resultan en absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas en conjunción con biosensores. Se pueden usar sistema de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina. Otros ejemplos son peroxidasa de rábano y quimioluminiscente. Cualquiera de estos procedimientos se puede usar para determinar la unión de un anticuerpo a un antígeno, particularmente un antígeno de lípido o clamidia, o la actividad de oxidación de lípidos. Una o más de estas
60 se puede determinar, por ejemplo, en presencia de un compuesto de prueba.

El modo de determinación de la unión no es una característica de la presente invención, y los expertos en la materia pueden elegir un modo adecuado según sus preferencias y conocimientos generales.

65 La actividad de oxidación de lípidos, incluyendo actividad de peroxidación de lípidos, se puede determinar mediante la determinación de la oxidación del lípido huésped (es decir, lípido de la muestra), lípido de un antígeno extraño tal como una célula de clamidia, o lípido de cualquier fuente, que se puede añadir por ejemplo como parte de un procedimiento de ensayo.

ES 2 329 770 T3

La oxidación de lípidos se puede determinar midiendo la acumulación de productos o productos secundarios, tales como moléculas reporteras acopladas oxidadas o la desaparición o consumo de substratos tales como lípidos o cosubstratos no modificados, tales como oxígeno.

5 Se conocen en la técnica muchos procedimientos para la determinación de la peroxidación de lípidos y son adecuados para su uso según la presente invención. El modo preciso de determinación de la oxidación de lípidos no es una característica de la presente invención y los expertos en la materia puede elegir un modo adecuado según sus preferencias y conocimientos generales.

10 Procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research, CRC Press, Boca Raton, Florida (1985), Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology, v. 186, Academic Press, London (1990); Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology, v. 234, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London (1994); y Free Radicals. A practical approach. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1996).

15 En realizaciones preferidas, la oxidación se determina mediante la determinación de la producción (es decir, la presencia o cantidad) de un producto de oxidación de lípidos.

20 Los productos y/o intermedios de oxidación de los lípidos en los cuales se inició la oxidación se pueden determinar o los productos y/o intermedios de oxidación se pueden determinar de lípidos en los que la oxidación se propaga.

25 Un producto de oxidación de lípidos adecuado puede incluir aldehídos tales como malondialdehído (MDA), peróxidos (lípidos), conjugados de dieno o gases de hidrocarburo. Los productos de oxidación de lípidos se pueden determinar mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, los productos de peroxidación de lípidos se pueden determinar usando HPLC (Brown, R.K., and Kelly, F.J In: Free Radicals. A practical approach. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1996), 119-131), espectroscopia UV (Kinter, M. Quantitative analysis of 4-hydroxy-2-nonenal. *Ibid.*, 133-145), o cromatografía de gas-espectrometría de masa (Morrow, J.D., and Roberts, L.J. F2-Isoprostanes: prostaglandin-like products of lipid peroxidation. *Ibid.*, 147-157).

30 La peroxidación de lípidos puede provocar una oxidación de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otros tipos de moléculas. Los productos de esta oxidación también se pueden usar para la medición indirecta de la actividad de las abzymas. Además, la peroxidación puede provocar cambios en las propiedades de las moléculas reporteras asociadas con la propagación de la oxidación de lípidos. Tal como se describe posteriormente, las moléculas reporteras se pueden encapsular en estos lípidos, por ejemplo como liposomas, y la liberación de la molécula reportera del liposoma es 35 indicativa de la oxidación.

40 Substancias y moléculas reporteras adecuadas pueden incluir bacterias luminosas intactas, luminol, lucigenina, folacina y luciferina. Estas sustancias, por ejemplo, se pueden acoplar a moléculas que usan $H_2O_2/O_2^{\cdot -}/O_2$ tales como peroxidasa, esterasa, oxidasa, luciferasa, catalasa, dismutasa de superóxido, perileno, NAD^+ , y acridinio ésteres bis (triclorofenil) oxalato (Campbell A.K. Chemiluminescence. VCH, Ellis Horwood Ltd., England, 1988).

Otros materiales susceptibles de liberar reacciones de cadenas de radicales también se pueden usar para determinar la oxidación de lípidos. Por ejemplo, la peroxidación de lípidos, como un proceso de cadena, inicia y mejora la polimerización de la acrilamida. La oxidación de lípidos se puede determinar así mediante la determinación de la 45 copolimerización de ^{14}C -acrilamida (Kozlov Yu P. (1968) Role of Free Radicals in normal and pathological processes. Doctorate thesis - MGU Moscow 1968).

50 Como la peroxidación de lípidos y lipoproteínas es un proceso mediado con radicales libres, se pueden medir las abzymas de oxidación de lípidos mediante la detección de estos radicales. Los radicales se pueden detectar o determinar usando quimioluminiscencia de bajo nivel intrínseca (con o sin sensibilizadores) (Vladimirov, Y.A., and Archakov, A.I. Lipid Peroxidation in Biological Membranes. Nauka, Moscow (1972); Vladimirov, Y.A. Intrinsic low-level chemiluminescence. In: Free Radicals. A practical approach. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1996), 65-82), resonancia de espín electrónico (con captura de espín (Mason, R.P. *In vitro* and *in vivo* detection of free radical metabolites with electron spin resonance. In: Free Radicals. A practical approach. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo (1996), 11-24) or without spin trapping (Petyaev, M.M. Biophysical approaches in the diagnosis of cancer. Medicina, Moscow (1972)) u otras técnicas bien conocidas en la técnica. La oxidación de lípidos también se puede determinar mediante la determinación del consumo de ácidos grasos u otros substratos de esta 55 reacción.

60 En algunas realizaciones preferidas, la producción de malondialdehído (MDA) se determina, después de la reacción con ácido 2-tiobarbitúrico (convenientemente a 1 mM) mediante la medición de la absorbancia en una longitud de onda apropiada, por ejemplo 525 nm.

65 El lípido que se oxida mediante una abzima anti-clamidia puede incluir la fracción de lípido de una lipoproteína, ácido graso, fosfolípido, colesterol, colesterol éster o triglicérido. Tal como se ha descrito anteriormente, la actividad de oxidación de lípidos de una abzima también puede provocar la oxidación de proteínas, carbohidratos y/o ácidos nucleicos, por ejemplo las fracciones de proteínas y/o carbohidratos de una lipoproteína.

ES 2 329 770 T3

La oxidación de los lípidos de clamidia se determina en algunas realizaciones preferidas porque proporciona un ensayo de una etapa conveniente, que se puede usar para determinar, por ejemplo, la presencia o ausencia de una abzima anti-clamidia. La oxidación de lípidos de clamidia se producirá cuando un anticuerpo específico de clamidia esté presente, que se une y oxida un antígeno de clamidia que comprende un lípido.

En procedimientos según estas realizaciones preferidas, un antígeno puede ser un antígeno de célula de clamidia.

Un procedimiento para obtener un inhibidor de la actividad de un anticuerpo de oxidación de lípidos puede incluir:

i) contactar un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un antígeno de células de clamidia en presencia de un compuesto de prueba; y

ii) determinar la actividad de oxidación de lípidos del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

En algunas realizaciones, un procedimiento puede incluir:

determinar la actividad de oxidación de lípidos de una molécula de anticuerpo a partir de una muestra obtenida del individuo en presencia de un compuesto de prueba, en el que dicha molécula de anticuerpo se une a un antígeno de clamidia.

En otras realizaciones, un procedimiento puede incluir:

determinar la unión a un antígeno de clamidia de una molécula de anticuerpo a partir de una muestra obtenida del individuo en presencia de un compuesto de prueba, en el que dicha molécula de anticuerpo posee actividad de oxidación de lípidos (es decir, oxida lípidos).

En otras realizaciones, un procedimiento puede incluir:

determinar la unión a un antígeno de clamidia de una molécula de anticuerpo a partir de una muestra obtenida de un individuo en presencia de un compuesto de prueba; y

determinar la actividad de oxidación de lípidos de dicha molécula de anticuerpo.

La determinación de la oxidación del lípido puede incluir determinar la cantidad, nivel o grado de oxidación que se induce mediante contacto con el antígeno de clamidia. Preferiblemente, el antígeno de célula de clamidia es un antígeno de lípidos y la oxidación del antígeno de lípidos está determinada.

Un antígeno se puede purificar y/o aislar o, más preferiblemente, puede estar comprendido en una membrana intacta, por ejemplo sobre la superficie de una célula de clamidia.

La oxidación de lípidos, por ejemplo en una muestra, en presencia de célula o antígeno de clamidia se puede comparar con la oxidación de lípidos en ausencia de la célula o antígeno de clamidia. Un aumento en la oxidación de lípidos es indicativa de la presencia de una abzima anti-lípidos.

Un procedimiento para identificar y/o obtener un modulador de la actividad de un anticuerpo de oxidación de lípidos puede incluir

i) contactar un anticuerpo de anti-clamidia de oxidación de lípidos con una célula de clamidia en presencia de un compuesto de prueba; y

ii) determinar la oxidación del lípido de dicha célula.

Un aumento en la oxidación de lípidos dependiente de la clamidia en presencia respecto a la ausencia de un compuesto de prueba es indicativa de que el compuesto de prueba es un inhibidor de abzima anti-lípidos.

La peroxidación de lípidos/lipoproteínas es una reacción en cadena de radicales libres y es capaz de autopropagarse de una molécula a otra, a una micela contenida en el lípido, o a una célula completa (después de fijarse a su membrana a través de receptores o absorción no específica) (Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase. Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam (1980); Lipid Peroxides in Biology and Medicine. Academic Press, Orlando, San Diego, San Francisco, New York, London (1982); Halliwell, B., y Gutteridge, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. Oxford (1996); Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals. Taylor and Francis, Washington (1997)).

En algunas realizaciones de los procedimientos aquí descritos, la propagación de la peroxidación se usa para determinar la actividad de abzimas de oxidación de lípidos.

Por ejemplo, un microcontenedor tal como un liposoma, una vesícula o una microcápsula que tiene una membrana que está hecha de un material susceptible a descomposición de radicales libres, por ejemplo una membrana de fosfo-

ES 2 329 770 T3

lípidos, se puede cargar con una tinta, fluorocromo u otra sustancia reportera o material de detección, por ejemplo: Eosina, Fluorescamina, Rodamina B o Verde Malaquita, y se usa en la detección de una abzima de oxidación de lípidos. La oxidación de lípidos en los procedimientos aquí descritos se puede determinar así mediante la determinación de la liberación de la sustancia reportera encapsulada.

5

El microcontenedor cargado se puede mezclar con una muestra de plasma o suero. Un antígeno de clamidia, convenientemente comprendido en o parte de una célula de clamidia, se añade a continuación a la mezcla. Cualquier abzima de oxidación de lípidos en la muestra se une entonces al antígeno y se inicia la peroxidación.

10

La iniciación de la oxidación de lípidos/lipoproteínas mediante la interacción del antígeno de clamidia con una abzima se autopropagará y extenderá al recubrimiento del microcontenedor. Esto daña el recubrimiento y provoca la liberación de la sustancia reportera en la solución circundante. Esta liberación se detecta a continuación.

15

Por ejemplo, un microcontenedor cargado se puede contactar con una abzima anti-lípidos en presencia de un compuesto de prueba. Un antígeno de clamidia, convenientemente comprendido en o parte de una célula de clamidia, se añade a continuación. En ausencia del compuesto de prueba que es un inhibidor de una abzima de oxidación de lípidos, la abzima se une al antígeno e inicia la peroxidación. La liberación de la sustancia reportera, por lo tanto, se produce como resultado del contacto de dicho anticuerpo con el microcontenedor o una composición que comprende dicha sustancia reportera en dicho microcontenedor.

20

Un procedimiento de ensayo puede incluir:

25

i) contactar un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos con un antígeno de célula de clamidia y un compuesto de prueba en presencia de un microcontenedor susceptible de oxidación de lípidos y que contiene una sustancia reportera; y

ii) determinar la liberación de dicha sustancia reportera del microcontenedor.

30

Si la intensidad de la señal producida mediante la liberación del reportero no es suficiente para provocar una señal que se pueda registrar o detectar, se puede incluir un propagador o sensibilizador de radicales libres en la mezcla de reacción, por ejemplo: iones libres y complejos de $\text{Fe}^{2+}/\text{Co}^{2+}$ u otros metales de valencia transiente. Estos y otros sensibilizadores sirven para multiplicar la cantidad de radicales libres en un sistema.

35

La liberación del material incorporado desde el microcontenedor provoca cambios en las propiedades físicas/químicas de la mezcla de reacción, que se pueden registrar visualmente (o mediante otros medios convencionales). Alternativamente, se pueden separar los microcontenedores dañados/fragmentados/disueltos de los no modificados mediante centrifugación activa o mediante sedimentación pasiva.

40

En lugar de los liposomas u otros microcontenedores (cargados con sustancias reporteras), se pueden usar los eritrocitos de la propia muestra de sangre como un objetivo para la propagación de la peroxidación de lípidos/lipoproteínas provocada por las abzimas anti-lípidos. Las bacterias de clamidia o antígenos se pueden introducir o contactar con una muestra de sangre, opcionalmente en presencia de un sensibilizador para asegurar la propagación de la reacción de peroxidación. La oxidación de lípidos se puede determinar mediante la determinación de la hemólisis de eritrocitos en la muestra de sangre. Esto se puede realizar en presencia de un compuesto de prueba.

45

Cualquier iniciación de la oxidación de lípidos/lipoproteínas mediante la interacción del antígeno de clamidia con abzimas en la muestra se autopropagará y extenderá en la membrana de las células de eritrocitos, provocando daños y eventualmente lisis celular. Así, la hemólisis se produce como resultado del contacto de dicho anticuerpo con un lípido con una composición que comprende eritrocitos. La aparición de hemólisis en la muestra de toda la sangre en respuesta a la adición de bacteria/antígenos de clamidia es, por lo tanto, indicativa de la presencia de abzimas de oxidación de lípidos. La hemólisis se puede determinar mediante cualquier procedimiento adecuado.

50

Un procedimiento puede incluir:

55

i) contactar un anticuerpo de anti-clamidia de oxidación de lípidos, un antígeno de célula de clamidia y un compuesto de prueba en presencia de eritrocitos; y

ii) determinar la hemólisis de dichos eritrocitos.

60

Tal como se ha descrito anteriormente, un procedimiento de ensayo se puede realizar en presencia o ausencia del compuesto de prueba. Una diferencia en la cantidad de hemólisis en la presencia, respecto a la ausencia del compuesto de prueba, es indicativa de que el compuesto de prueba es un inhibidor de la oxidación de lípidos mediada con anticuerpos.

65

Estas realizaciones se pueden preferir en algunas circunstancias porque las muestras no requieren una separación del plasma/suero de los eritrocitos antes de su análisis. Los liposomas u otros microcontenedores se pueden cargar con, por ejemplo, un material que puede desarrollar un color diferente del color rojo de la hemoglobina. Alternativamente, el giro de las muestras probadas o incluso la sedimentación pasiva separará microcontenedores/eritrocitos no dañados.

ES 2 329 770 T3

La liberación de la tinta reportera o hemólisis es indicativa de la presencia de anticuerpos de oxidación de lípidos en el material analizado. La intensidad de la señal está correlacionada con su actividad/concentración.

Como toda la sangre se puede analizar usando los procedimientos descritos anteriormente, estos procedimientos se pueden usar en condiciones domésticas o de no laboratorio. La presencia o severidad de la aterosclerosis se puede determinar, por ejemplo, comparando la señal reportera o hemólisis observada con valores conocidos en pacientes con aterosclerosis e individuos normales. Esta comparación se puede realizar usando un diagrama, escala, gráfico o calibración que indique la cantidad o nivel de señal reportera o hemólisis en etapas o severidades particulares de aterosclerosis.

La peroxidación de lípidos es un proceso redox que también se puede medir usando un sistema redox acoplado. Sistemas redox adecuados incluyen sistemas físicos y químicos. Por ejemplo, se puede usar un chip sensor para detectar los cambios en potencial redox de una reacción de oxidación de lípidos asociada al mismo. Un rango de chips sensores basados en enzimas redox o en mediadores redox son conocidos en la técnica. Los dos tipos de estos sensores se pueden ajustar/usar para la detección de moléculas radicales libres o moléculas redox acopladas con las mismas (Hall E.A.H. Biosensors. Redwood Press Ltd., Gran Bretaña, 1990).

La acumulación de H_2O_2 producida por la peroxidación de lípidos se puede medir, por ejemplo, mediante la adición de la reacción basada en peroxidasa acoplada, que usará peróxido de hidrógeno para oxidar sus otros co-substratos y producir un producto coloreado. Una acumulación de $O_2^{\bullet -}$ producido mediante peroxidación de lípidos se puede determinar usando moléculas sensibles a $O_2^{\bullet -}$, tales como citocromo C o riboflavina.

Alternativamente, la peroxidación de lípidos consume oxígeno molecular, así se puede usar cualquier reacción química o proceso físico que depende del O_2 , por ejemplo, electrodo de oxígeno o polarografía. (Polarography. Ed. Kolthoff I.M., Lingane J.J. Interscience Publishers, Nueva York, Londres, 19520).

Una muestra de ejemplo de sangre, suero o plasma se puede obtener de un individuo. Una muestra de prueba de suero o plasma se puede obtener, por ejemplo, extrayendo sangre de un individuo y aislando el suero o plasma de la sangre extraída. Procedimientos de extracción adecuados incluyen centrifugación para separar el suero y el plasma del material celular.

Los procedimientos de la presente invención se pueden realizar *in vitro* usando las muestras obtenidas de un individuo o en anticuerpos aislados de los mismos, o se pueden realizar *in vivo* usando un sistema de modelo animal, tal como se describe aquí. Un procedimiento *in vivo* que utiliza un sistema de modelo animal puede comprender la etapa de sacrificar el animal.

En el uso de los procedimientos de la presente invención, el experto en la material es consciente de la necesidad de usar experimentos de control apropiados.

Un desorden aterosclerótico tal como se describe aquí puede incluir aterosclerosis, enfermedad isquémica (coronaria) de corazón: isquemia miocárdica (angina), infarto miocárdico; enfermedad aneurismal; enfermedad vascular periférica ateromatosa: enfermedad aortoiliaca, isquemia de extremidad inferior crítica, isquemia visceral, enfermedad de arterias renales, enfermedad cerebrovascular, derrame cerebral, retinopatía aterosclerótica, trombosis y/o coagulación sanguínea aberrante e hipertensión. Estas condiciones pueden ser condiciones médicas o veterinarias.

Las condiciones descritas anteriormente están muy relacionadas y una predisposición a una de estas condiciones puede ser indicativa de una predisposición a otra de estas condiciones.

Un agente identificado usando uno o más filtros primarios (por ejemplo, en un sistema libre de células) como que tiene la capacidad de modular la unión del anticuerpo a un antígeno de lípido y/o la actividad de oxidación de lípidos del anticuerpo se puede determinar también usando uno o más filtros secundarios. Un filtro secundario puede implicar la prueba de niveles de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos en el sistema vascular o una función biológica de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos, por ejemplo, en un modelo animal tal como se describe posteriormente.

Las funciones biológicas adecuadas se pueden determinar en un filtro secundario que incluye la reducción en el tamaño o número de lesiones ateroscleróticas, o una reducción en otros síntomas o efectos de un desorden aterosclerótico, tal como la presión sanguínea.

Los procedimientos aquí descritos pueden incluir la identificación de un compuesto de prueba como agente que modula la unión y/o la actividad de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

Los procedimientos de ensayo pueden incluir el aislamiento, la purificación y/o la fabricación de un compuesto identificado como un modulador de la unión y/o actividad de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos.

Opcionalmente, los compuestos identificados como agentes que modulan la unión y/o actividad de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos que usa un procedimiento de ensayo aquí descrito se pueden modificar para

ES 2 329 770 T3

optimizar la actividad o proporcionar otras características beneficiosas, tal como una vida media aumentada o efectos secundarios reducidos bajo la administración a un individuo.

5 Los procedimientos de ensayo también pueden incluir la formulación del agente en una composición, tal como un medicamento, composición farmacéutica o fármaco, con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como se describe posteriormente. Esta composición se puede administrar a un individuo.

10 El formato preciso de procedimientos de ensayo de la invención puede variarse por parte de los expertos en la material usando la práctica y los conocimientos rutinarios.

15 Un modelo animal de desórdenes ateroscleróticos es útil para seguir la progresión de la enfermedad provocada por los anticuerpos de oxidación de lípidos y determinar varios parámetros de la enfermedad, tal como el índice de eliminación. Un modelo es también útil en los compuestos de prueba como terapia potencial para la reducción de niveles de abzimas y mejoras concomitantes en los síntomas. Un modelo animal se puede usar en lugar de un filtrado *in vitro* o puede formar un filtro secundario. Por ejemplo, los compuestos candidatos identificados en un filtro de fármacos *in vitro* se pueden probar en el modelo animal antes de progresar a los experimentos clínicos.

20 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento de generación de un modelo animal para una condición aterosclerótica que comprende introducir uno o más antígenos de células de clamidia en el sistema vascular de un animal no humano, y determinar la producción de anticuerpos de oxidación de lípidos que reaccionan con dicho uno o más antígenos de clamidia en el sistema vascular de dicho animal después de dicha introducción.

25 Un antígeno de célula de clamidia puede estar comprendido en o sobre la superficie de una célula de clamidia. Las células de clamidia pueden incluir células de cadenzas de clamidia que no infectan de manera natural el mamífero no humano, por ejemplo patógenos de clamidia humanos tales como *C. pneumoniae*.

Los antígenos o células de clamidia se pueden introducir mediante cualquier procedimiento de inoculación conocido en el sistema vascular del mamífero no humano.

30 Los animales no humanos adecuados incluyen mamíferos tales como conejos, ovejas, cabras, ratones, ratas, cobayas, camellos y cerdos.

Los modelos animales para las condiciones ateroscleróticas se pueden producir mediante estos procedimientos.

35 Un modelo animal para una condición aterosclerótica puede comprender un animal no humano que tiene anticuerpos de oxidación de lípidos en su sistema vascular,

40 en el que dichos anticuerpos de oxidación de lípidos se inducen u obtienen mediante la introducción de uno o más antígenos de células de clamidia en el sistema vascular del animal.

Los niveles de anticuerpos de oxidación de lípidos en el sistema vascular pueden ser elevados respecto a los niveles en un animal normal no inoculado.

45 El uno o más antígenos de células de clamidia pueden ser antígenos aislados o pueden estar comprendidos sobre la superficie de una célula de clamidia aislada.

La célula de clamidia puede ser una cadena o especie que no es patógena en dicho animal no humano, por ejemplo un patógeno de clamidia humano tal como se ha descrito anteriormente.

50 Tal como se ha descrito anteriormente, un compuesto identificado como un modulador de la actividad de las abzimas usando un filtro *in vivo* tal como se ha descrito anteriormente se puede probar para su actividad en un modelo animal no humano.

55 Un procedimiento tal como se ha descrito anteriormente puede incluir la etapa de: introducir un compuesto de prueba en el sistema vascular de un modelo animal tal como se ha descrito anteriormente; y

determinar la actividad y/o el nivel de los anticuerpos de oxidación de lípidos en dicho sistema vascular.

60 Una disminución en el nivel de anticuerpos de oxidación de lípidos después de dicha introducción es indicativa de que dicho compuesto de prueba es un modulador de la actividad y/o el nivel de los anticuerpos de oxidación de lípidos.

65 Alternativamente, un filtro primario tal como se ha descrito anteriormente puede realizarse en un modelo animal, por ejemplo un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un compuesto pueden contactarse en el sistema vascular de un modelo animal y se puede determinar la actividad de oxidación de lípidos de dicho anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos. Alternativamente, el nivel o cantidad de anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos se puede determinar en dicho sistema vascular u otro parámetro biológico, tal como el tamaño y número, de las lesiones ateroscleróticas.

ES 2 329 770 T3

Un procedimiento de identificación de un compuesto de prueba como agente que inhibe el nivel y/o la actividad de un anticuerpo de oxidación de lípidos puede comprender:

5 (a) introducir un compuesto de prueba en el sistema vascular de un animal que tiene niveles elevados de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos; y

10 (b) determinar el nivel o actividad de dichos anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos, con lo cual dicho compuesto de prueba es un inhibidor del nivel y/o de la actividad del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos cuando se detecta una falta de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos o una disminución en la actividad o nivel de dichos anticuerpos en presencia de dicho compuesto de prueba.

15 Un procedimiento para la producción de un modulador de la unión y/o la actividad del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos puede comprender la etapa adicional de seleccionar dicho compuesto de prueba que es un modulador de la unión y/o la actividad del anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

Este procedimiento también puede comprender la etapa de formular dicho compuesto de prueba seleccionado que es un modulador con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 Además, los procedimientos tal como se han descrito anteriormente pueden comprender la etapa adicional de sacrificar el animal no humano.

25 Un compuesto se puede identificar, usando un procedimiento de ensayo descrito anteriormente, como un agente que modula (por ejemplo inhibe) la actividad de un anticuerpo de oxidación de lípidos. Una composición farmacéutica o veterinaria, medicamento, fármaco u otra composición puede comprender este compuesto. La administración de esta composición a un paciente puede estar comprendida en un procedimiento de tratamiento (que puede incluir el tratamiento preventivo) de condiciones ateroscleróticas. Este compuesto se puede usar en la fabricación de una composición para la administración, por ejemplo para el tratamiento de una condición aterosclerótica. Un procedimiento para fabricación de una composición farmacéutica o veterinaria puede comprender la mezcla de este compuesto con un excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente otros ingredientes.

30 Un inhibidor de un anticuerpo de oxidación de lípidos obtenidos mediante un procedimiento de ensayo tal como se ha descrito aquí puede inhibir la unión de un anticuerpo de oxidación de lípidos a un antígeno de lípidos (es decir, bloquear el sitio de unión de la abzima) o puede inhibir la actividad de oxidación de lípidos del anticuerpo (es decir, bloquear los centros catalíticamente activos).

35 Los inhibidores que bloquean los centros catalíticamente activos de las abzimas pueden incluir queladores de metal, ejemplos de los cuales se muestran en la tabla 7. Los iones de metal de valencia transiente en el centro catalítico de una abzima están marcados específicamente mediante estos queladores para neutralizar las propiedades catalíticas de la abzima. Los queladores de metal que inhiben las abzimas incluyen aspirina.

40 Otros de sus similitudes incluyen antagonistas de sustrato que evitan la unión de las abzimas con su epítoto(s) objetivo en el organismo del huésped. Los antagonistas de unión pueden ser péptidos, lípidos, por Isaac garitos, o cualquier otro producto que se produzca de manera sintética o natural que imite un epítoto de las abzimas. Este antagonista se puede modelar sobre un antígeno de lípidos, que puede ser por ejemplo un huésped, es decir, un antígeno humano o un antígeno de célula clamidial.

45 El centro activo de una abzima se puede modificar de otras maneras para desactivar sus propiedades catalíticas. Por ejemplo, el centro activo de una abzima puede contener un grupo(s) foto-(UV-) sensible que se puede modificar mediante irradiación (UV) extracorporal de plasma/suelo para desactivar las propiedades de peroxidación de lípidos de estas moléculas.

50 Ejemplos de inhibidores que bloquean los sitios de unión de las abzimas incluyen moléculas de anticuerpo anti-idiotípicas, incluyendo Fab/Fv u otros fragmentos anticuerpos y derivados, con moléculas de péptidos que representan el fragmento(s) del bucle complementario de sus centros activos (es decir, que imitan la molécula de anticuerpo anti-idiotípica) que les permitirá inhibir la unión de las abzimas con sus antígenos objetivo. Las moléculas de anticuerpo adecuadas se pueden hacer utilizando una estrategia policlonal o monoclonal o mediante pantallas de fagos.

55 Otros compuestos con propiedades antagonistas se pueden usar para competir con el antígeno para el sitio de unión de una abzima, por ejemplo, un péptido, lípido, polisacáridos, o cualquier otro producto que se produce de manera sintética o natural que imita un epítoto al cual se une la abzima. Otros compuestos o procedimientos químicos y físicos que pueden modificar los sitios de unión de las abzimas también se pueden usar para interrumpir la unión, por ejemplo, irradiación tal como se ha descrito anteriormente.

60 Un procedimiento para hacer una composición farmacéutica puede comprender, la identificación de un compuesto como inhibidor de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos usando un procedimiento descrito aquí, sintetizar, preparar o aislar dicho inhibidor y mezclar el inhibidor con un excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente otros ingredientes para formular o producir dicha composición, y opcionalmente, determinar la oxidación de lípidos de un anticuerpo como se describe aquí en presencia de dicha composición.

ES 2 329 770 T3

Este procedimiento puede comprender la etapa de modificar el inhibidor para optimizar sus propiedades.

La modificación del compuesto farmacológicamente activo conocido para mejorar sus propiedades farmacéuticas es una aproximación conocida al desarrollo de productos farmacéuticos basados en un compuesto de “guía”. Esto podría ser deseable cuando el compuesto activo es difícil o caro de sintetizar o cuando no es adecuado para un procedimiento particular de administración, por ejemplo, los péptidos no son adecuados como agentes activos para composiciones orales ya que tienden a degradarse rápidamente mediante proteasas en el canal alimentario. El diseño, síntesis y prueba de los compuestos activos modificados, incluyendo las similitudes, se pueden usar para evitar un filtrado aleatorio de un gran número de moléculas para una propiedad objetivo.

Habitualmente se toman varias etapas en la modificación de un compuesto que tiene una propiedad objetivo dada. En primer lugar, se determinan las partes particulares del compuesto que son críticas y/o importantes en la determinación de la propiedad objetivo. En el caso de un péptido, esto se puede hacer variando sistemáticamente los residuos de aminoácidos en el péptido, por ejemplo, mediante la sustitución de cada residuo por vez. Estas partes o residuos que constituyen la región activa del compuesto se conocen como “farmacóforo”.

Una vez se ha encontrado el farmacóforo, se modela su estructura según sus propiedades físicas, por ejemplo estereoquímica, unión, tamaño y/o carga, usando los datos de una serie de fuentes, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, datos de difracción de rayos X y NMR. Se pueden usar el análisis computacional, el mapado de similitudes (que modela la carga y/o el volumen de un farmacóforo, más que la unión entre átomos) y otras técnicas en este proceso de modelado.

En una variante de esta aproximación, se modela la estructura tridimensional del anticuerpo de oxidación de lípidos y su antígeno de lípidos. Esto puede ser especialmente útil si el ligando y/o compañero de unión cambian la conformación en la unión, permitiendo que el modelo lo tenga en cuenta para el diseño de la similitud.

A continuación se selecciona una molécula de plantilla en la cual se pueden injertar los grupos químicos que simulan el farmacóforo. La molécula de plantilla y los grupos químicos injertados en la misma se pueden seleccionar convenientemente de manera que el compuesto modificado sea fácil de sintetizar, sea probable que sea farmacológicamente aceptable y no se degrade *in vivo*, mientras mantiene la actividad biológica del compuesto de guía. Los compuestos modificados encontrados mediante esta aproximación se pueden filtrar para ver si tiene la propiedad objetivo, o en qué extensión la presentan. La optimización o modificación adicional se puede realizar a continuación para llegar a uno o más compuestos finales para su prueba *in vivo* o clínica.

Si es un polipéptido, péptido, molécula de ácido nucleico, pequeña molécula u otro compuesto farmacéuticamente útil que se proporciona un individuo, la administración es preferiblemente en una “cantidad profilácticamente efectiva” o una “cantidad terapéuticamente efectiva” (como pueda ser el caso, aunque la profilaxis se puede considerar terapia), siendo esta suficiente para mostrar beneficios al individuo. La cantidad real administrada, y el índice y transcurso del tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y severidad de lo que se trate. La prescripción del tratamiento, las decisiones de la dosis, etc., está dentro de la responsabilidad del personal médico general y otros doctores médicos.

Una composición se puede administrar en solitario o en combinación con otros tratamientos, de manera simultánea o secuencial dependiendo de la condición a tratar.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, además del ingrediente activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Estos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, por ejemplo cutánea, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden ser en forma de tabletas, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede incluir un portador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites vegetales o animales, aceite mineral o aceite sintético. También se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución sacárida o glicoles tales como etileno glicol, propileno glicol o polietileno glicol.

Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, por la inyección en el sitio de afección, el ingrediente activo será en forma de solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Todos los expertos en la materia podrán preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactada. Se pueden incluir preservativos, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, como se requiera.

Ahora se mostrarán aspectos de la presente invención con referencia las figuras adjuntas descritas a continuación y los ejemplos experimentales, a modo de ejemplo y no limitativos.

La figura 1 muestra los resultados de unas reacciones de aglutinación entre 100:1 de clamidia ovina y IgG extraída de una lesión aterosclerótica humana.

ES 2 329 770 T3

La figura 2 muestra la dependencia de la peroxidación de clamidia ovina de la concentración de IgG de la lesión aterosclerótica humana. La concentración de clamidia fue constante y el pH fue de 5,7.

5 La figura 3 muestra la cinética de Michaelis-Menten de peroxidación de lípidos en clamidia ovina mediante 1,8 g de IgG de lesión aterosclerótica humana; K_M aparente = 13,3-16,1:1 de suspensión de clamidia; pH 5,7.

10 La figura 4 muestra el efecto de la adición de suspensión de clamidia ovina en la peroxidación de lípidos en suero humano. Se añadieron 10:1 de suspensión bacteriana a 990:1 de suero diluido 1:1; pH 5,7; todas las muestras mezcladas se incubaron a 37°C durante 18 horas (los números de suero son los mismos que en la tabla 5).

15 La figura 5 muestra la correlación entre el grado de estenosis arterial coronaria y la actividad de los anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos en pacientes IHD. La severidad de la estenosis está presentada en términos de una puntuación, que se calculó como un parámetro entero de la estenosis de arterias coronarias estimado mediante angiografía.

20 La figura 6 muestra la relación entre el grado de estenosis arterial coronaria y la concentración de triglicéridos en suero de paciente IHD.

La figura 7 muestra la relación entre el grado de estenosis arterial coronaria y la concentración de colesterol total en suero de paciente IHD.

25 La figura 8 muestra la relación entre el grado de estenosis arterial coronaria y la concentración de colesterol LDL en suero de paciente IHD.

La figura 9 muestra la correlación entre el grado de estenosis arterial cerebral y la actividad de los anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos en suero de paciente ICD. La severidad de la estenosis se presenta en términos de una puntuación, que se calculó un parámetro entero de la estenosis de arterias cerebrales estimado mediante angiografía.

30 La figura 10 muestra la relación entre el grado de estenosis arterial coronaria y la concentración de triglicéridos en suero de paciente ICD.

La figura 11 se muestra la relación entre el grado de estenosis arterial coronaria y la concentración de colesterol total en suero de paciente ICD.

35 La figura 12 se muestra la relación entre el grado de estenosis arterial coronaria y la concentración de colesterol LDL en suero de paciente ICD.

La figura 13 muestra la reacción cruzada de anticuerpos anti-apolipoproteína B con clamidia.

40 La tabla 1 contiene datos que muestran el efecto de la fracción de IgG extraída de una lesión aterosclerótica humana en la peroxidación de lípidos de bacteria de clamidia; pH 5,7; todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La tabla 2 contiene datos que muestran la reactividad cruzada para el IgG de la lesión entre lipoproteínas de suero humano y cadena ovina de *Chlamidia psittaci*.

45 La tabla 3 contiene datos que muestran el efecto de la clamidia felina sobre la peroxidación de lípidos en suero humano; todas las mediciones se realizaron por triplicado.

La tabla 4 contiene datos que muestran el papel del IgG en el inicio de la peroxidación de lípidos mediante clamidia ovina en plasma humano; todas las mediciones se realizaron por triplicado.

50 La tabla 5 contiene datos que muestran el efecto de la adición de clamidia ovina en el suero de control y en el suero de pacientes con complicaciones clínicas de aterosclerosis.

55 La tabla 6 muestra la inhibición de la actividad de oxidación de lípidos del IgG de la lesión aterosclerótica mediante inhibidores antioxidantes.

La tabla 7 muestra ejemplos de queladores de metal que se pueden utilizar según la presente invención.

60 La tabla 8 muestra ejemplos de antimicrobianos que se pueden usar según la presente invención.

La tabla 9 muestra ejemplos de antioxidantes que se pueden usar según la presente invención.

65 La tabla 10 muestra los niveles de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos en ovejas sanas e infectadas (Las figuras en corchetes representan el % de aumento/disminución respecto al control).

La tabla 11 muestra la inhibición de las abzimas usando queladores de metal.

ES 2 329 770 T3

La tabla 12 muestra la inhibición de la actividad de las abzimas *in vitro* usando queladores de metal.

La tabla 13 muestra el efecto de la aspirina sobre la actividad de las abzimas anti-clamidia en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria.

5

La tabla 14 muestra el efecto de la aspirina sobre la actividad de las abzimas anti-clamidia en pacientes con isquemia miocárdica silenciosa.

La tabla 15 muestra la actividad de las abzimas en pacientes tratados con un agente antimicrobiano.

10

La tabla 16 muestra la actividad de las abzimas en pacientes tratados con un agente antimicrobiano más aspirina diariamente.

La tabla 17 muestra la condición clínica de pacientes tratados solamente con el agente antimicrobiano.

15

La tabla 18 muestra los niveles de enzimas promedio en grupos de individuos que sufren condiciones relacionadas con la aterosclerosis.

La tabla 19 muestra los niveles de abzimas individuales en pacientes que sufren angina, que recibían o no recibían aspirina.

20

La tabla 20 muestra la inducción de abzimas en conejos inoculados con clamidia.

La tabla 21 muestra el efecto de clamidia tratada con formalina en conejos que tenían abzimas inducidas.

25

La tabla 22 muestra la actividad de las abzimas anti-clamidia en pacientes tratados con azitrocimina, 500 mg diariamente (grupo de terapia A).

La tabla 23 muestra la actividad de las abzimas anti-clamidia en pacientes tratados con azitromicina, 500 mg, más aspirina, 250 mg, diariamente (grupo de terapia B).

30

La tabla 24 muestra la actividad de las abzimas anti-clamidia en pacientes tratados con azitromicina, 500 mg diariamente más antioxidantes (grupos de terapia C).

La tabla 25 muestra la actividad de las abzimas anti-clamidia en pacientes del grupo de terapia D tratados con aspirina, 200 mg diariamente (grupo de terapia D).

35

La tabla 26 muestra la actividad de las abzimas anti-clamidia en el grupo de control de pacientes.

La tabla 27 muestra un resumen de los resultados de la terapia anti-abzimas.

40

La tabla 28 muestra una evaluación de la severidad de la angina de pecho mediante el cuestionario Rose-Blackburn modificado antes y después del tratamiento.

La tabla 29 muestra las puntuaciones de las abzimas y de la prueba Rose-Blackburn antes y después del tratamiento para pacientes IHD que se probaron negativos para IgG anti-clamidia.

45

La tabla 30 muestra las propiedades inhibitorias de la azitromicina sobre las abzimas.

La tabla 31 muestra el efecto de varios fármacos sobre la actividad de las abzimas anti-clamidia.

50

La tabla 32 muestra el efecto de la terapia anti-abzimas sobre la trombosis y la coagulación sanguínea.

55 Experimentos

Materiales y Procedimientos

Muestras

60

Se utilizaron tres muestras de suero de 22 pacientes con complicaciones clínicas y arteriosclerosis admitida para operaciones de derivación de arteria coronaria y aorta abdominal en el Centro de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico N° 1 en Rostov-na-Donu, Rusia.

65

20 de estos pacientes eran machos y 2 hembras, con edades entre 47 y 66 años. Uno de estos pacientes, N° 6/6a tuvo un infarto de miocardio agudo en el momento de la prueba, así que en algunos cálculos finales los datos de este paciente no se incluyeron. El grupo de control estaba comprendido de voluntarios clínicamente sanos, cinco de los cuales eran machos y cinco hembras con edades entre 40 y 55 años.

ES 2 329 770 T3

Se utilizaron piezas de ateromas de aorta de siete de estos pacientes para extraer la fracción de IgG mediante un sorbente de proteína A tal como se describe posteriormente.

5 *Extracción de IgG de una lesión aterosclerótica*

Las piezas de aorta (aproximadamente 200-400 mg de peso en mojado) se cortaron en piezas de aproximadamente 10 mg cada una, se colocaron en 5,0 ml de PBS con 1% de detergente no iónico Igepal CA-630 y se homogeneizaron mediante un homogeneizador mecánico (Ultra-Turrax) a potencia completa con una sonda de 15 mm tres veces durante tres segundos, cada vez con un intervalo de enfriamiento de 20 segundos. Después de la homogeneización, los componentes insolubles se separaron mediante centrifugación a 5000 g durante 10 minutos y los supernatantes se utilizaron para el análisis.

El supernatante se trató con proteína A fijada a 4% de agarosa en cuenta enlazada de manera cruzada (centígrados durante 30 minutos. La fracción de inmunoglobulina fijada a las cuentas se giró ralentizándose a continuación a 5000 g durante 10 minutos y se decantó el supernatante. Para retirar cualquier lipoproteína fijada a las inmunoglobulinas sedimentadas, las muestras se volvieron a suspender con 10% de Igepal CA-630. A continuación se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos y el supernatante se decantó.

Para retirar el detergente se realizaron tres lavados posteriores en el exceso de tampón de fosfato con centrifugación bajo el mismo régimen. La retirada de las lipoproteínas de la fracción de inmunoglobulina se confirmó mediante la ausencia de colesterol en esta fracción.

25 *Determinación del Abs anti-clamidia*

Se recogió sangre de una vena antecubital por la mañana después de ayuno durante toda la noche, el suero se separó y se congeló a -20°C antes de su prueba.

Se pidió la presencia de anticuerpos anti-clamidia en la reacción de aglutinación células se clamidia ovina y mediante ensayos ELISA (basados en antígeno recombinante).

Para la reacción de aglutinación, se incubaron de soluciones graduales del suero probado durante 24 horas a 37°C con 10⁶ de clamidia ovina viva. La aparición de agregados se detectó y se estimó en 700 nm. El ensayo ELISA se realizó según las instrucciones del fabricante (Medac).

Un título $\geq 1:64$ se consideró que era seropositivo.

40 *Determinación de la peroxidación de lípidos*

La peroxidación de lípidos se determinó como un nivel de concentración de MDA que se midió mediante un procedimiento espectrofotométrico [Draper, H.H. *et al* Free Radic. Biol. Med. (1993) 15, 353]. Éste procedimiento se basa en la formación de un producto coloreado cuando el malondialdehído reacciona con ácido tiobarbitúrico.

Reactividad cruzada entre las lipoproteínas y la clamidia del suero

La fracción IgG que comprende abzimas anti-clamidia se extrajo de una lesión aterosclerótica humana tal como se describe anteriormente. 100:1 de esta fracción (que contiene 1 g/ml) se incubó previamente con 890:1 de todo suero o sin lípidos de un donante sano durante una hora a 37°C; pH 5,7.

Las lipoproteínas (y el material asociado) se retiraron del suero mediante ultracentrifugación preparativa en solución de KBr según el procedimiento descrito anteriormente [Havel R.J *et al.* J. Clin. Invest. (1955) 34, 1345-1353.22].

A continuación se añadieron al suero 10⁵ células de *clamidia psittaci* (Intervet) en un volumen 10:1. La cantidad de oxidación inducida por contacto con las células de clamidia se determinó a continuación utilizando el procedimiento descrito anteriormente.

En presencia de unión entre las abzimas anti-clamidia y las lipoproteínas de plasma, nos observó oxidación adicional en el contacto con las células de clamidia, porque las abzimas anti-clamidia se retiraron mediante la ultracentrifugación.

En ausencia de unión entre las abzimas anti-clamidia y las lipoproteínas de plasma, la oxidación se observó en el contacto de plasma con las células de clamidia, porque las abzimas anti-clamidia estaban todavía presentes en la muestra.

ES 2 329 770 T3

Ensayo de abzymas anti-clamidia

Los reagentes utilizados en el ensayo de abzymas anti-clamidia son como sigue:

- 5 1. *Clamidia ovina* viva (forma liofilizada)
2. PBS (para disolver las bacterias)
3. 0,5M de tampón de acetato pH 4,0
- 10 4. 40% ácido tricloroacético
5. 1 mM ácido 2-tiobarbitúrico.

15 La presencia cantidad de anticuerpos anti-clamidia catalíticos en una muestra se detectó como sigue:

1. Las muestras de suero probado se diluyeron 1:1 mediante 0,05M de tampón de acetato pH 4,0 para hacer el pH final de estas muestras entre 5,6-5,8.
- 20 2. 990 μ l del suero diluido se mezclaron con 10 μ l de la vacuna de clamidia ovina viva comercial.
3. Las muestras se incubaron a continuación durante toda la noche (12-16 horas) a 37°C.
- 25 4. A cada muestra se añadieron 250 μ l de 40% ácido tricloroacético y 250 μ l de 1 mM ácido 2-tiobarbitúrico.
5. Todas las muestras se colocaron en un baño de agua y se hirvieron durante 30 minutos.
6. Las muestras se enfriaron y centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos.
- 30 7. Los supernatantes se recogieron y su absorción se midió a λ 525 nm para determinar la concentración de malondialdehídos (MDA) que son productos de la peroxidación de lípidos.

35 *Resultados*

Ejemplo 1

40 Se extrajo IgG de una lesión aterosclerótica en un paciente utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Se encontraron que estaban presentes anticuerpos anti-clamidia en esta fracción de IgG (figura 1).

La capacidad de la fracción de IgG extraída de oxidar lípidos se determinó. La fracción de IgG se mostró que provocaba una peroxidación de lípidos en cadenas ovinas y felinas de *clamidia psittaci* (tabla 1). El análisis cinético de esta región de peroxidación mostró que la fracción tenía un carácter enzimático (figuras 2, 3). Por lo tanto, la bacteria clamidia se puede considerar como un sustrato para sus anticuerpos extraídos de lesiones ateroscleróticas humanas.

50 Los epítopes para las abzymas anti-clamidia se investigaron también utilizando detergentes no iónicos. El tratamiento de clamidia con Triton X-100 o Igepal CA-630 abolió la oxidación de los lípidos en la bacteria mediante las abzymas extraídas. Se obtuvieron resultados similares para el tratamiento de lipoproteínas de baja densidad de suero humano.

55 Esto proporciona indicación de que los epítopes para los anticuerpos catalíticos son conformacionales y/o la integridad del antígeno es importante para iniciar la oxidación de los lípidos en las lipoproteínas y la clamidia.

La capacidad de las abzymas anti-clamidia para reaccionar de manera cruzada con lipoproteínas de plasma se determinó a continuación. El IgG extraído de la lesión aterosclerótica se incubó previamente consuelo de un paciente para permitir anticuerpos anti-lipoproteínas en el extracto que interactúen con lipoproteínas no modificadas. Las lipoproteínas y los anticuerpos unidos a las mismas se retiran a continuación mediante ultracentrifugación.

60 Se encontró que los anticuerpos anti-clamidia catalíticos se retiraron con las lipoproteínas (tabla 2). Esto demuestra que los anticuerpos anti-clamidia catalíticos reaccionan de manera cruzada con las lipoproteínas del suero y con la cadena ovina de las bacterias de clamidia.

65 La presencia de los anticuerpos anti-clamidia en el suero de pacientes de aterosclerosis se investigó a continuación. La adición de clamidia opina al suero de los pacientes observó que provocaba un aumento en la peroxidación de lípidos en la muestra. Un efecto similar se observó con una cadena de clamidia felina (tabla 3).

ES 2 329 770 T3

Los efectos observados eran debidos a la presencia de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos en la fracción de IgG en el suero de los pacientes (tabla 4). Los anticuerpos catalíticos del suero de los pacientes con aterosclerosis, por lo tanto, se observó que reaccionaba de manera cruzada con las lipoproteínas y la clamidia ovina.

5 El análisis correlativos de la concentración de anti-clamidia y anticuerpos anti-lipoproteínas en suero humano mostró que estos dos parámetros tienen una vinculación positiva estadísticamente significativa con el alto coeficiente de correlación 0,82. Esto proporciona una indicación adicional que el mismo anticuerpo posee las dos actividades de unión.

10 En estudios, combatientes de aterosclerosis que utilizan el mismo procedimiento de ensayo descrito anteriormente, se encontraron anticuerpos anti-clamidia catalíticos en el 81% de los pacientes con complicaciones clínicas de aterosclerosis y solamente en el 10% del grupo de control (figura 4, tabla 5). Esto demuestra que estos anticuerpos son un marcador patogénico de esta enfermedad.

15 Este estudio demuestra por primera vez la existencia de abzymas de anti-lípidos/lipoproteínas en sistemas biológicos. Su presencia en la aterosclerosis pero no en individuos sanos indica que estas abzymas juegan un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad y sus complicaciones. También pueden estar vinculados estos desórdenes bioquímicos/inmunológicos principales como la activación de la peroxidación de lípidos, la presencia de anticuerpos anti-lipoproteínas y la infección de clamidia, todos los cuales están implicados en el desarrollo de la aterosclerosis.

20 La presencia de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos en el plasma de un individuo indica que ya se ha iniciado los cambios patológicos específicos para esta enfermedad. Como estas abzymas son responsables de una oxidación de lípidos/lipoproteínas y este proceso usualmente está correlacionado con el grado/intensidad de la generalización de la aterosclerosis, el nivel/actividad de las abzymas anti-lípidos refleja la severidad de esta enfermedad.

25 Los cambios en el perfil de las lipoproteínas y la elevación del colesterol total en plasma/suero son los únicos factores de riesgo específicos establecidos para la aterosclerosis. Sin embargo, estos cambios se pueden detectar solamente en el 10-15% de todos los pacientes con complicaciones clínicas de esta enfermedad. La detección de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos es el segundo marcador específico para la aterosclerosis, pero tiene un valor de diagnóstico mucho mayor que la medición de los parámetros de lípidos descritos anteriormente.

30 Por lo tanto, los procedimientos aquí son ampliamente aplicables en el diagnóstico y la profilaxis de la aterosclerosis y las condiciones relacionadas.

35 Ejemplo 2

Inhibición de la peroxidación de lípidos

40 *Especímenes humanos*

Se extrajeron anticuerpos de lesiones ateroscleróticas avanzadas de aorta humana recuperadas en cuatro pacientes más, con una edad entre 53 y 64 años, durante cirugía de derivación de una estenosis aortal abdominal en el Centro de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico N° 1 en Rostov-na-Donu, Rusia. Después de la recuperación, estas muestras se colocaron inmediatamente en una solución 30% w/v de NaCl y se almacenaron a 0-4°C durante 1-2 semanas antes de su examen.

45 En los experimentos de control, se mostró que durante este periodo las actividades de estas enzimas como tripsina, catalasa, superóxido de dismutasa, glutatona peroxidasa, creatina quinasa y lactato dehidrogenasa, junto con un nivel de fragmentación de inmunoglobulina (IgG) y el grado de peroxidación de lípidos (concentración de malonaldehídos) no cambió de manera significativa.

50 Las piezas de aorta (aproximadamente 200-400 mg de peso en mojado) se cortaron en piezas de aproximadamente 10 mg cada una, se colocaron en 5,0 ml de PBS con 1% de detergente no iónico Igepal CA-630 y se homogeneizaron mediante un homogeneizador mecánico (Ultra-Turrax) a potencia completa con una sonda de 15 ml tres veces durante tres segundos cada una con 20 segundos de intervalos de enfriamiento. Después de la homogeneización, los componentes insolubles se separaron mediante centrifugación a 5000 g durante 10 minutos y los supernatantes se utilizaron para el análisis.

60 *Extracción de anticuerpos*

Los anticuerpos se extrajeron y analizaron por separado de las lesiones de las cuatro piezas de la aorta abdominal obtenida de cuatro pacientes diferentes.

65 La primera etapa fue el tratamiento del supernatante con proteína A fijada a 4% agarosa en cuentas vinculado de manera cruzada a 37°C durante 30 minutos. Después de esto, la fracción de inmunoglobulinas fijada a las cuentas se hizo girar a 5000 g durante 10 minutos. El supernatante se decantó. Para retirar cualquier lipoproteína fijada a las

ES 2 329 770 T3

5 inmunoglobulinas sedimentadas, las muestras volvieron a suspender un 10% de Igepal CA-630. A continuación, se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos y el supernatante se decantó. Para retirar el detergente, se realizaron tres lavados posteriores en el exceso del tampón de fosfato con centrifugación bajo el mismo régimen. La retirada de las lipoproteínas de la fracción de inmunoglobulinas se confirmó mediante la ausencia de colesterol en esta fracción.

Lipoproteínas

10 Se obtuvieron lipoproteínas de baja densidad, $d = 1,030-1,050$, a partir del plasma de donantes sanos mediante ultracentrifugación de preparación secuencial en solución KBr según el procedimiento descrito previamente [Havel R.J. *et al* J. Clin. Invest. (1955) 34, 1345-1353]. El LDL puede estar asociado con inmunoglobulinas del plasma en estas preparaciones [Bauer B.J. *et al* Atherosclerosis (1982), 44, 153-160].

15 Estas inmunoglobulinas pueden interferir potencialmente con una reacción entre LDL y sus anticuerpos fijados a la proteína A, o se pueden unir mediante esta última propia proteína. Para evitar estos posibles artefactos, un importante, antes de la titración de las lipoproteínas con anticuerpos de lesión en las pruebas de afinidad, retirar el LDL con el anticuerpo fijado utilizando una cantidad saturada de cuentas de agarosa de proteína A.

20 Para determinar el nivel de LDL (en términos de concentración de colesterol), la curva de calibración se hizo para cada nuevo lote de lipoproteínas y durante cada nuevo experimento.

Peroxidación LDL mediante lesión IgG

25 Las muestras de LDL con o sin antioxidantes probados (control) se incubaron con lesión IgG durante 16 horas a 37°C a un pH de 5,6. El nivel de peroxidación de lípidos, en términos de la concentración de malondialdehído (MDA), se midió mediante el siguiente procedimiento. A 1,0 ml de cada muestra se añadieron 250 μ l de 40% ácido tricloroacético y 250 μ l de 1 mM 2-ácido tiobarbitúrico. Después de la ebullición de las muestras en un baño de agua durante 30 minutos, se enfriaron y se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos. Los supernatantes se recogieron y se midió su absorción a λ 525 nm.

Los resultados de este experimento se presentan en la tabla 6.

35 Se observó que una serie de inhibidores con actividad antioxidante reduce la actividad de oxidación de lípidos de anticuerpos aislados de placas aterosclerótica es por debajo del límite de detección en este ensayo. Todos estos compuestos, por lo tanto, inhiben la actividad de los anticuerpos de oxidación de lípidos.

40 Las abzimas aisladas se ensayaron *in vitro* para su actividad catalítica tal como se describe aquí en presencia de varios inhibidores antioxidantes de las siguientes clases:

Queladores de hierro (Fe²⁺) - tetraciclina

Queladores de cobre (Cu²⁺) - DDC, aspirina y penicilamina

45 Queladores de metal generales - CN⁻, N₃, DTPA (quelatos libres de iones solamente) y ácido picolínico.

Los resultados se muestran en la tabla 11.

50 Estos resultados muestran que la inhibición de las enzimas se produce a través de quelación de cobre, más que quelación de hierro. Tres queladores de cobre separados demostraron que bloquean la actividad y estos resultados sugieren que las abzimas contactan con un guión de cobre unido como centro catalítico.

Ejemplo 3

55 *Ejemplo clínico de reducción en la actividad de los anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos*

Paciente - A.M.P., caucásico, macho, 43 años de edad, que tenía síntomas clínicos que se parecían a las etapas tempranas de angina de pecho con quejas de dolor de pecho transiente no provocado en combinación con dificultad para respirar. Sin embargo, un ECG no reveló cambios patológicos en el corazón.

60 Los resultados de un análisis de sangre el 27 diciembre 2000 revelaron niveles totales normales de colesterol y colesterol LDL; los títulos de IgG anti-clamidia y anticuerpos IgA fueron ambos 1:64 (ELISA, Medac). Sin embargo, se detectaron abzimas anti-clamidia de oxidación de lípidos y su actividad era de 32 μ M MDA (figura media de medición por triplicado) por 1 ml de su suero.

65 Se recomendó el siguiente tratamiento diario, a lo largo de tres meses: hidrocloreuro de tetraciclina 500 mg en combinación con un cóctel antioxidante - Vitamina E 20 mg, Vitamina A 1,5 mg, Vitamina B6 3,2 mg, ácido ascórbico 180 mg, gluconato de zinc 30 mg, L-Selenometionina 100 μ g.

ES 2 329 770 T3

En tres meses después del inicio de la terapia las quejas de dolor de pecho y dificultad respiratoria desaparecieron. Al final de marzo, al final del tratamiento, y casi exactamente tres meses después del inicio del tratamiento, el análisis de su suero no mostró ningún cambio en los títulos de IgG anti-clamidia y anticuerpo IgA (1:64 (ELISA, Medac)). Al mismo tiempo, la presencia de abzimias anti-clamidia no fue detectable.

Dos semanas después, la prueba se repitió con el mismo resultado.

Ejemplo 4

La influencia de clamidia ovina en la peroxidación de lípidos de suero ovino

Las ovejas se vacunaron con células de clamidia usando técnicas estándar y se probaron para la actividad de las abzimias. Los resultados se indican en la tabla 10.

Las ovejas vacunadas previamente estaban libres de enfermedades y sanas y no mostraron cambios significativos en los niveles de ensayo con y sin clamidia.

Después de la vacunación, las ovejas mostraron niveles muy altos de anticuerpos anti-clamidia, pero niveles insignificantes o nulos de abzimias.

El aborto posterior (tipo salvaje) representa que las ovejas con enfermedad de clamidiosis han abortado debido a la oclusión del sistema vascular en el útero: en éstas, el nivel de la actividad de las abzimias se verificó mediante la adición de clamidia que es significativamente mayor que sin clamidia.

Estos resultados muestran que la administración de vacuna de clamidia puede reducir o evitar la producción de anticuerpos de oxidación de lípidos.

Ejemplo 5

La asociación de la actividad de las enzimas y la estenosis arterial

Se investigó la actividad de los anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos y el grado de estenosis arterial en dos grupos clínicos diferentes. El primero fue un grupo de pacientes con enfermedad cardíaca isquémica (IHD) y el segundo un grupo de pacientes con enfermedad cerebrovascular isquémica (ICD).

Estenosis de las arterias coronarias

Los resultados preliminares del experimento mostraron una correlación positiva y significativa entre la actividad de las abzimias anti-clamidia y la severidad de la estenosis de las arterias coronarias pacientes con IHD (figura 5).

No se observó ningún enlace entre grado de estenosis coronaria y lípidos en suero tales como triglicéridos, colesterol total y colesterol de lipoproteínas de baja densidad, colesterol LDL (figuras 6, 7, 8).

Estenosis de las arterias cerebrales

Se observó una correlación significativa positiva entre el nivel de las enzimas y la estenosis arterial en el grupo de pacientes con ICD (figura 9).

Como en los pacientes IHD, de estenosis arterial y triglicéridos en suero, colesterol total y colesterol LDL (figuras 10, 11, 12).

Estos experimentos establecen un enlace positivo entre la actividad de las enzimas anti-clamidia y el grado de estenosis en el corazón y en las arterias del cerebro, y muestra que estos anticuerpos están implicados tanto en la iniciación común en la progresión de la aterosclerosis.

Ejemplo 6

Inhibición de las acciones usando ácido acetilsalicílico (aspirina)

Los datos presentados en las tablas 13 y 14 demuestran que la actividad de las acciones de oxidación de lípidos anti-clamidia se pueden inhibir mediante ácido acetilsalicílico (aspirina) cuando se administra a humanos.

ES 2 329 770 T3

Tres pacientes con enfermedad cardiaca coronaria (CHD), cuya sangre tenía un nivel significativo de actividad de abzimas de estas abzimas, se trataron con 250 mg de dosis diaria de aspirina.

Después de una semana, los análisis de sangre de estos pacientes revelaron una inhibición significativa de la actividad de las abzimas: cinco pliegues para un paciente y un nivel indetectablemente bajo para los otros dos (tabla 13).

Para de que la administración de aspirina en los experimentos anteriores coincidía con la eliminación natural de las abzimas de los cuerpos de los pacientes y para investigar el efecto *in vivo* de la aspirina en abzimas de oxidación de lípidos anti-clamidia, se realizó el siguiente experimento.

Se identificó un paciente F con isquemia de miocardio silenciosa que tomaba regularmente 250 mg de aspirina diarios. El nivel de las enzimas en la sangre del paciente F se determinó que se encontró que era casi indetectable.

El paciente F dejó de tomar dextrina durante una semana y el nivel de las abzimas en su sangre se determinó otra vez. Un nivel significativo de abzimas de oxidación de lípidos se encontró en el suero del paciente F.

El paciente P reanudó el régimen anterior de 250 mg de aspirina diarios, y el nivel de las abzimas se determinó después de siete días. El nivel de estas abzimas se redujo de manera significativa (tabla 14) respecto al nivel cuando el paciente no recibió aspirina.

Durante el transcurso de estos experimentos, el paciente no tuvo ningún desorden respiratorio, o signos de ninguna otra condición patológica. Esto indica que las variaciones registradas de la actividad de las enzimas estaban relacionadas con la toma de aspirina por parte de este paciente.

En conclusión, los datos presentes muestran que el ácido acetilsalicílico inhibe los anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos *in vivo*, y en particular, en pacientes con complicaciones clínicas de aterosclerosis.

Ejemplo 7

Anticuerpos que reaccionan de manera cruzada con células de clamidia

Una preparación comercialmente disponible de anticuerpos específicos para Apo-B humano se probó para su capacidad de reaccionar de manera cruzada con *clamidia psittaci* ovina (Intervet).

La preparación de anticuerpos anti-apo-B se observó que contenía una fracción que también se une a clamidia ovina (figura 13).

El Apo-B, por lo tanto, tiene un epítotope es idéntico a un epítotope presente en la membrana clamidial. Los anticuerpos que se unen a este epítotope reaccionarán de manera cruzada con células de clamidia y apo-B humano.

Ejemplo 8

El efecto de los agentes anti-clamidia sobre la actividad de las abzimas in vivo

Los pacientes con edades entre 45 y 62, con angina estable, se trataron con 500 mg de azitromicina una vez al día durante 15 días o 30 días con 500 mg de azitromicina, 500 mg, más aspirina, 250 mg, diariamente durante 15 días.

La actividad de las abzimas antes y después del tratamiento se muestra para el primer grupo en la tabla 15 y para el segundo grupo en la tabla 16.

La actividad de la séptima se mostró que se reducía de manera significativa en los dos grupos de pacientes después de 15 días, siendo la reducción particularmente grande en el grupo tratado con azitromicina y aspirina. También se observó una reducción en los niveles LDL. No se registraron reacciones adversas en ninguno de los pacientes.

La condición clínica de los pacientes también se observó que mejoraba a lo largo del transcurso del tratamiento (17).

La administración del fármaco anti-clamidia azitromicina a lo largo de dos semanas, en particular en combinación con aspirina, redujo la actividad de las abzimas y mejoró la condición clínica de los pacientes que sufren angina.

ES 2 329 770 T3

Ejemplo 9

Actividad de las abzymas in vivo

5 Los niveles de enzimas se determinaron en cinco series de personas utilizando los procedimientos aquí descritos. Se determinó un grupo de control que era sano mediante las técnicas presentes. Un grupo de isquemia silenciosa eran individuos que mostraron eran isquémicos en una prueba de ejercicio/ECG, pero que no conocían ningún problema de salud.

10 Los grupos de individuos que sufren de angina estable o inestable y que han sufrido un infarto de miocardio también se probaron.

15 El nivel promedio de las abzymas en cada grupo se muestra en la tabla 18, donde n es el número de individuos en cada grupo. Los individuos se consideraron positivos para las abzymas, si se observó un aumento del 15% en la oxidación de lípidos en la adición de las células de clamidia usando los procedimientos descritos aquí. El porcentaje de cada grupo queda positivo para las abzymas también se muestra en la tabla 18. Ninguno de los valores en la tabla se ha ajustado para individuos que tomaban aspirina.

20 El nivel de actividad de las abzymas y la proporción de los individuos que se fueron positivos para las abzymas se muestra que está relacionado con la severidad de la condición de los individuos. La actividad de las abzymas se observa que cae en picado después de un ataque al corazón (comparar valores para angina inestable e infarto de miocardio en fase aguda). La actividad de las abzymas se eleva a continuación progresivamente después del ataque al corazón en pacientes que sobreviven.

25 Esto es indicativo de un papel activo de las abzymas en la inducción de un infarto del miocardio. Las abzymas pueden formar parte del mecanismo de aglutinación de los coágulos trombolíticos que bloquean los vasos sanguíneos y producen el infarto. Esta aglutinación en coágulos reduce la actividad de las abzymas detectable el sistema vascular. Como el óvulo se disuelve después del infarto, la actividad de las abzymas detectable aumenta.

30 Ejemplo 10

El efecto del aspirina en la actividad de las abzymas in vivo

35 La actividad de las abzymas se determina en grupos de individuos con angina estable o angina inestable de clase I, II y III utilizando los procedimientos aquí descritos. Los individuos también se cuestionaron si estaban tomando aspirina. Los individuos se agruparon en subgrupos según si indicaban que tomaban aspirina y los resultados se muestran en la tabla 19. Estos resultados no están ajustados para individuos que tomaban aspirina pero que no lo informaron.

40 Las figuras mostradas en la tabla 19 son valores de la actividad de las abzymas de individuos en cada grupo (es decir, los que toman aspirina de clase I y los que no toman aspirina, etc.).

45 Estos resultados muestran que los niveles de abzymas se corresponden con la severidad de la enfermedad. Los que tomaron aspirina generalmente tienen una actividad de abzymas menor que los que no tomaron aspirina con los mismos síntomas clínicos.

Ejemplo 11

Modelo animal para los desórdenes de aterosclerosis

50 Los conejos fueron infectados con *clamidia psittaci* (cadena Lori) mediante la ruta intratraqueal con 1,5 ml de 10% de suspensión de embrión de pollo que contenía $1 \times 10^{7.5}$ de células de clamidia. El suero de los conejos se recogió en el día 0 (antes de la infección) y a continuación cada 14 días, mediante la utilización de la ruta de recogida de sangre estándar desde el corazón.

55 El suero se utilizó a continuación en un ensayo ELISA estándar para medir el título de IgG anti-clamidia. En las mismas muestras de suero, la cantidad del nivel de abzymas de clamidia se midió utilizando el ensayo estándar descrito previamente. La aparición de abzymas se correlaciona con la aparición de anticuerpos IgG anti-clamidia.

60 Los resultados para cuatro conejos (tres infectados y uno de control) se muestran en la tabla 20.

65 Los resultados muestran que un modelo animal con altos niveles de abzymas se puede generar mediante infección con clamidia. Estos modelos son útiles para el seguimiento de la perversión de la enfermedad provocada mediante las abzymas y la determinación de varios parámetros, tales como índice de eliminación. Los modelos también son útiles en los compuestos de prueba como fármacos potenciales para la reducción de los niveles de abzymas y la mejora concomitante en los síntomas.

Ejemplo 12

Abzimas anti-clamidia en conejos

5 La producción de anticuerpos de anti-Chlamydia de oxidación de lípidos o demostrada utilizando un modelo de conejo producido tal como se ha descrito anteriormente mediante infección intratraqueal con *clamidia Psittaci*.

10 Los resultados se muestran en la tabla 21. Los conejos fueron infectados de manera intratraqueal con 1,5 ml de 10% de suspensión de embrión de pollo que contenía $1 \times 10^{7.5}$ de *clamidia Psittaci* (cadena Lori) y la sangre se recogió de los corazones de los conejos. Se muestran los niveles de abzimas en el día 7 después de una inyección subcutánea de una vacuna, formalina tratada con $1 \times 10^{7.5}$ *clamidia Psittaci* (cadena Lori) (§ tabla 21).

15 La aparición de abzimas coincidió con la acumulación de IgG anti-clamidia detectado como se detectó mediante ELISA. Una inyección de las mismas bacterias, pero en preparación tratada con formalina, en el día 14 de la infección (conejo 3) provocó un aumento en los títulos de IgG anti-clamidia ELISA en el día 7 después de la inoculación. Al mismo tiempo, en el suero de este conejo se encontró una reducción de 2 pliegues en la actividad de las abzimas, de 131 a $64 \mu\text{M}$ MDA/ml.

20 No hubo ninguna reducción en la actividad de las enzimas registradas para los otros dos conejos, que no recibieron esta inoculación.

La inoculación de la preparación de la vacuna del antígeno de clamidia se observó así que reducía la presencia/actividad de las abzimas de anti-clamidia.

25 Ejemplo 13

Terapia Anti-Abzimas en enfermedad isquémica del corazón

30 Un grupo de 30 pacientes con enfermedad de isquemia de corazón (IHD) fue seleccionado para terapia experimental para reducir/eliminar la actividad de las abzimas anti-clamidia en su suero (el grupo de terapia) y un grupo de 20 pacientes "coincidentes" no fueron tratados (el grupo de control de pacientes no tratados). El experimento tuvo lugar en el Saratov Cardiological Centre (Federación rusa) desde junio a agosto de 2002.

35 El grupo de terapia comprendía 23 pacientes macho y 7 pacientes hembra con una edad promedio de $55 \pm 1,1$ años. Los pacientes del grupo de control para la monitorización del nivel de abzimas comprendía 20 pacientes con IHD, de los cuales 15 eran pacientes macho y 5 hembra, con una edad promedio de $53 \pm 1,2$ años. Cada paciente proporcionó su consentimiento escrito para su participación en el experimento.

40 Todos los pacientes tuvieron una angina de clase II-III según la clasificación de la Canadian Cardiological Society. 15 en el grupo de terapia y 10 en el grupo de control de pacientes tenían un historial de infarto del miocardio en el último año. El diagnóstico de IHD para los otros 15 pacientes del primer grupo y 10 en el grupo de control de pacientes se confirmó mediante angiografía coronaria, que detectó un 70% o más de estenosis arterial.

45 Aparte del grado de generalización o severidad de la aterosclerosis, todos los grupos coincidiendo solamente en edad, género y factores de riesgo, sino también de medicación, nitratos, bloqueadores β , inhibidores de enzimas de conversión de angiotensina, etcétera.

50 La progresión de la condición clínica de los pacientes se monitorizó mediante el uso del protocolo de Bruce modificado para prueba ECG de ejercicio/tensión de ruedas de ardilla y en el cuestionario Rose-Blackburn (Cardiovascular Survey Methods. WHO, Ginebra, 1968).

55 El parámetro principal de la selección de un paciente para el experimento fue el nivel de la actividad de abzimas anti-clamidia el exceso de $15 \mu\text{M}$ de malondialdehído (MDA) por ml de suero. El grupo de terapia se separó en cuatro subgrupos terapéuticos:

1.) Grupo de terapia A. Aquéllos a los que se les dio un inhibidor no específico de abzimas anti-clamidia, azitromicina, que también tiene propiedades antimicrobianas, que se prescribió en la dosis de 500 mg diarios.

60 2.) Grupo de terapia B. Se prescribió una administración combinada de azitromicina, en la misma dosis, con ácido acetilsalicílico (aspirina). Esta última tiene la capacidad aparente de bloquear específicamente las abzimas a través de iones de quelación de cobre en su centro activo. La dosis de aspirina fue de 250 mg por día.

65 3.) Grupo de terapia C - Se prescribió una administración combinada de dos tipos de inhibidores no específicos de las abzimas con propiedades antioxidantes, azitromicina antimicrobiana, en la misma dosis que en los grupos previos, y vitaminas E, A, C. la dosis diarias de vitamina E fue de 30 mg, de vitamina A 1.500 EU y de vitamina C 90 mg.

4.) Grupo de terapia D - A los pacientes en este grupo solamente se les dio 250 mg de aspirina diariamente.

ES 2 329 770 T3

La sangre de los pacientes de los tres grupos se probó cada dos semanas. Las terapias se continuaron sujetas a la eficiencia de la supresión/eliminación de la actividad de las abzimias anti-clamidia y los resultados del experimento se muestran hasta 60 días después de la administración de placebo/terapia.

5 El título de los anticuerpos de anti-clamidia se midió en el grupo de terapia utilizando el procedimiento previamente descrito (ver tabla 26). La severidad de los síntomas clínicos también se midió (ver tabla 28).

Los resultados de la monitorización de la supresión de la actividad de las abzimias anti-clamidia se presentan en las siguientes tablas (tablas 22-27).

10

En primer lugar, se apreció que en dos semanas de la terapia en todos los grupos hubo una reducción significativa en actividad de las abzimias. La más prominente fue en el grupo de terapia B, donde la utilización de un inhibidor no específico, azitromicina, se convino con el uso de un inhibidor específico, aspirina (tabla 23). Incluso, el nivel de la actividad en este grupo alcanzó el nivel de individuos clínicamente sanos (de resumen de la tabla 28). Una observación importante fue que el paciente TGB7 en este grupo mostró un gran aumento en el nivel de abzimias (correlacionado con un empeoramiento de los síntomas clínicos) en el día 45 (doble asterisco - tabla 23) y a continuación después de otros 15 días de tratamiento, el paciente empezó a sentirse mejor y las abzimias se redujeron a cero. TGB7 y mostró un aumento en los niveles de ApoB (asterisco - ver tabla 7) al mismo tiempo que un aumento en el nivel de abzimias en 45 días.

15

20

La terapia menos efectiva fue en el grupo de terapia A (azitromicina solamente - tabla 22), donde para el 27% de los pacientes (3 de 11, marcados con un asterisco) no hubo cambios en la actividad de las abzimias después de 15 días. Sin embargo, una reducción continuada para la mayoría de los pacientes se invirtió para dos de los mismos en el primer grupo en el día 30 del experimento (TGA2 y TGA6, Tabla 1, marcados con dos asteriscos). Esta observación, junto con el hecho de que hubieron algunos pacientes, aunque reducidos, con un nivel significativo restante de la actividad de las abzimias, provocó la extensión del tratamiento durante otros 30 días, resultando en disminuciones significativas en todos los pacientes. En el grupo de terapia A, los síntomas clínicos de los pacientes TGA2 y TGA6 mejoraron durante 15 días y están correlacionados con una reducción en el nivel de abzimias, sin embargo los síntomas clínicos empeoraron y el nivel de abzimias aumentó alrededor del día 30 del experimento (doble asterisco - Tabla 22).

25

30

En el grupo de terapia C (Azitromicina y antioxidantes) un paciente (TGC1) que no mostró ninguna disminución en la actividad de las abzimias (con asterisco - tabla 24).

35

La utilización de aspirina en solitario, en las dosis prescritas, sin azitromicina, produjo una reducción en la actividad de las abzimias pero en un grado menor que el observado con la combinación (grupo de terapia D - tabla 25).

40

La terapia anti-abzimias aplicada ha mejorado significativamente la condición clínica de la mayoría de los pacientes, la cual se evaluó con el cuestionario Rose-Blackburn modificado (Tabla 27) y se verificó mediante el uso de la prueba ESG de ejercicio/tensión de rueda de ardilla. Al mismo tiempo, no hubo ninguna noticia de dinámica clínica positiva en el grupo de control, incluso para un único paciente. En la tabla 27, PCG indica grupo de control de pacientes, § indica los resultados obtenidos mediante ensayo inmunofluorescente, §§ indica los resultados obtenidos mediante ensayo inmunoenzimático, §§§ indica los resultados obtenidos mediante ensayo inmunoturbidimétrico. * indica una diferencia estadísticamente significativa.

45

No se observaron cambios significativos estadísticamente para los siguientes parámetros de coagulación: tiempo de coagulación de caolín, tiempo de tromboplastina parcial activada, tiempo de protrombina. No hubo ningún cambio registrado en el nivel de creatinina en suero y las enzimas del hígado alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa.

50

Ningún paciente en los grupos de terapia experimental es había tenido cambios positivos en sus condiciones clínicas durante una serie de meses/años antes de su selección para el experimento. Por lo tanto, esta ausencia de dinámica positiva se puede utilizar como control "integral" para el progreso clínico significativo de los pacientes que se ha observado.

55

El régimen intensivo original del inhibidor de abzimias, que tiene propiedades antimicrobianas, eliminó totalmente la presencia de IgG anti-clamidia

60

Dirigiendo las abzimias anti-clamidia, se consiguieron mejoras significativas en las concentraciones de lípidos y la trombosis (tabla 27). Por lo tanto, es posible sugerir que las anormalidades desarrolladas en el metabolismo de lípidos y el sistema de coagulación en la aterosclerosis son secundarias a la aparición de estos anticuerpos catalíticos de oxidación de lípidos.

65

El efecto beneficioso observado de la azitromicina no se podría explicar mediante sus propiedades anti-bacterianas porque solamente en 15 pacientes de 30 (en el 50%) seleccionados para experimentos habían probado de antemano eran positivos en la presencia de infección de Chlamydia. El nivel de IgG anti-clamidia en el suero de otros ocho pacientes era insignificante, por debajo del 1:32 en ensayo de inmunofluorescencia. Los otros siete pacientes se probaron negativos.

ES 2 329 770 T3

La prueba de diagnóstico indica que si un paciente lleva abzimas y que no está necesariamente correlacionado con que el paciente sea positivo para anticuerpos IgG de clamidia. Por lo tanto, la terapia no debe escribirse sobre la base de la seropositividad para clamidia. Esto muestra la utilidad en la invención cuando la prueba de diagnóstico está vinculada con la administración de la terapia correcta seguida mediante repetidas pruebas pronósticas para monitorizar la eliminación de abzimas utilizando el tratamiento.

Ciertos pacientes IHD en el experimento terapéutico fueron negativos para anticuerpos IgG anti-clamidia, pero se probaron positivos para las abzimas. Las puntuaciones de abzimas y la prueba de Rose-Blackburn antes y después del tratamiento para estos pacientes se muestran en la tabla 29. Estos pacientes fueron tratados y se redujo su actividad de las abzimas con una mejora posterior en los síntomas clínicos.

Estos resultados muestran que si un paciente lleva abzimas no está necesariamente correlacionado con que el paciente sea positivo para anticuerpos IgG de clamidia. Una condición aterosclerótica no se puede diagnosticar o prescribir la terapia sobre la base de la seropositividad para clamidia. Sin embargo, las abzimas se han mostrado que son útiles como un marcador de diagnóstico de condiciones ateroscleróticas y puede estar vinculado con la administración de la terapia apropiada seguida mediante pruebas pronósticas repetidas para monitorizar la eliminación de las abzimas.

20 Ejemplo 14

Propiedades anti-abzimas/antioxidantes de la azitromicina

La actividad inhibitoria de la azitromicina en abzimas aisladas de una lesión aterosclerótica semidió tal como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 30. Toda números un promedio de la medición duplicada/triplicada, y se calcula como la diferencia entre el nivel de la acumulación de MDA en el suero probado antes y después de la división de 0,5 dedos y su inmunización de vacuna de clamidia ovina "Intervet". El efecto del DMSO se dedujo de las lecturas donde se indica (**).

Se encontró que la azitromicina es un inhibidor *in vitro* de la actividad de las abzimas. Esta actividad puede ser responsable de los efectos biológicos *in vivo* observados con la azitromicina, tal como la rápida disminución de la actividad de las abzimas después de la administración de la azitromicina.

35 Ejemplo 15

Integridad de la membrana de clamidia y actividad de las abzimas

La actividad de las abzimas semi idiota como se describe anteriormente utilizando formalina, sulfato de amonio o muestras tratadas con SDS de *clamidia pneumoniae* o *clamidia Psittaci*. En estas acciones, ninguna reacción de oxidación de lípidos en el sistema de prueba.

El tratamiento de la batería de clamidia con agentes caotrópicos, incluyendo detergentes no iónicos de 1% Triton X-100 e Igepal CA-630, 10% solución de DMSO, que preservan la presencia de los lípidos de la membrana del sistema que interrumpen la integridad de la membrana bacteriana, abrogó completamente el desarrollo de la reacción de oxidación de lípidos.

Estos experimentos indican que los lípidos son importantes para el inicio y el desarrollo de la redacción de la peroxidación de lípidos que se desarrolla en el sistema de prueba. En particular, se indica un papel para los lipopolisacáridos, que se interrumpe mediante los tratamientos anteriores.

Ejemplo 16

55 *Historias de Casos*

Caso No 1

Un paciente macho de 64 años de edad fue diagnosticado con enfermedad isquémica del corazón hace tres años cuando tuvo los primeros síntomas de angina de pecho. El diagnóstico confirmado mediante angiografía coronaria, que estableció una estenosis de dos arterias: 75% de la arteria coronaria derecha y 100% de oclusión de la arteria intraventricular anterior.

Fue seleccionado para el experimento terapéutico porque se detectaron abzimas en su suero. Una combinación de dos inhibidores de abzima, azitromicina, en una dosis de 500 mg diarios, y aspirina, en una dosis de 250 mg diarios. Su nivel de IgG anti-clamidia en alto con un título de 1:256.

ES 2 329 770 T3

Antes del tratamiento, su condición clínica, estimada mediante una puntuación de un protocolo Rose-Blackburn modificado, fue de 19. La actividad de abzima fue 25 μ M MDA/ml, el nivel de colesterol total 226 mg/dL, triglicéridos - 90 mg/dL, HDL-colesterol - 56 mg/dL, LDL-colesterol - 73 mg/dL, ApoA - 139 mg/dL, ApoB - 81 mg/dL, alanina aminotransferasa (ALT) - 25 U/L, aspartato aminotransferasa (AST) - 29 U/L, creatinina - 0.71 mg/dL.

Durante el tratamiento nos apreciaron reacciones adversas significativas. En su primera visita después del inicio de la terapia, 15 días, se aprecia una cierta mejora en los signos de su enfermedad. Esta mejora continuó hasta el día 30 de la terapia. Esto estuvo soportado mediante un aumento en el tiempo de tolerancia durante la prueba ESG de ejercicio de ruedas de ardilla mediante el protocolo de Bruce modificado.

En ese momento no se detectó actividad de abzimas ni presencia de IgG anti-clamidia en su suero. El nivel de parámetros de líquidos también mejoró: el colesterol total se redujo a 172 mg/dL, los triglicéridos a - 80 mg/dL, HDL-colesterol - 52 mg/dL, LDL-colesterol - 64 mg/dL, ApoA - 110 mg/dL, ApoB - 67 mg/dL. El nivel de ALT, AST y creatinina permaneció el mismo - 25 U/ml, 27 U/ml y 0.7 mg/dL respectivamente.

Al llegar el día 45 desde el inicio de la terapia se apreció que una semana antes, en el día 38 desde el inicio, su condición empezó a deteriorarse - la frecuencia e intensidad de los ataques de angina aumentó súbitamente. Esto coincidió con un aumento en la actividad de las abzimas, que alcanzó 80 μ M MDA/ml. Sin embargo, es importante indicar que no se registró ningún IgG anti-clamidia tradicional.

Al mismo tiempo, los parámetros del metabolismo de lípidos también se deterioraron: colesterol total aumentado a 185 mg/dL, triglicéridos - 143 mg/dL, LDL-colesterol - 74 mg/dL, ApoA - 115 mg/dL, ApoB - 87 mg/dL. El nivel de HDL-colesterol y ApoA permaneció esencialmente el mismo - 50 mg/dL y 115 mg/dL, correspondientemente. Una observación importante fue que el nivel de enzimas en el hígado también cambió, ALT aumentado a 35 U/L y AST a 39 U/L; la concentración de creatinina era de 0,8 mg/dL.

Sin embargo, pareció que la terapia continuada suprimía/eliminaba la actividad de las abzimas, que también estuvo acompañado por una mejora en la concentración de algunos parámetros de los lípidos: el colesterol total se redujo a 165 mg/dL, los triglicéridos a - 100 mg/dL, mg/dL. La concentración de HDL-colesterol era 47 mg/dL, LDL-colesterol - 72 mg/dL, ApoA - 112 mg/dL. El nivel de ALT, AST y creatinina era de 24 U/ml, 25 U/ml y 0,7 mg/dL respectivamente.

Al mismo tiempo, el nivel de ApoB permaneció en el nivel previo al tratamiento de 80 mg/dL. La condición clínica inicialmente mejorada también volvió al nivel al que estaba antes de iniciar la terapia, la puntuación Rose-Blackburn era de 19. Para estabilizar el nivel suprimido de las abzimas con un intento de mejorar los parámetros clínicos del paciente, se recomendó continuar la terapia anti-abzimas prescrita.

No se detectó ningún IgG anti-clamidia en este paciente desde el día 15 del inicio de la terapia y la utilización continuada de azitromicina pretendía controlar el nivel suprimido de las abzimas de reacción cruzada, que se unen y oxidan las lipoproteínas, más que la infección bacteriana por sí misma.

Caso No. 2

Un paciente macho de 46 años de edad fue diagnosticado con IHD cuando fue ingresado con un infarto de miocardio agudo el 21 febrero 2002. Antes no tenía ningún historial de enfermedades cardíacas. En mayo siguiente una angiografía coronaria no reveló ninguna estenosis/estrechamiento de sus arterias coronarias.

Este paciente se seleccionó para un experimento terasnóstico en el campo de que se detectó una actividad significativa de las abzimas anti-clamidia en su suero. Era de 140 μ M MDA/ml. Una combinación de dos tipos de inhibidores de abzima, azitromicina, en la dosis de 500 mg diariamente, y se prescribió un coctel antioxidante de vitaminas E, A, C. la dosis diaria de vitamina E era de 30 mg, de vitamina A 1.500 EU y de vitamina C 90 mg.

No había ningún nivel detectable de anti-clamidia IgA, IgG o IgM en el suero de este paciente antes o durante el período de tratamiento.

Antes del tratamiento su condición clínica, estimada mediante la puntuación de un protocolo Rose-Blackburn modificado, era de 17. El nivel de colesterol total era de 205 mg/dL, triglicéridos - 129 mg/dL, colesterol HDL - 39 mg/dL, colesterol LDL - 80 mg/dL, ApoA - 152 mg/dL, ApoB - 221 mg/dL.

Durante el tratamiento nos ofrecieron reacciones adversas significativas. Empezó a sentir una cierta mejora en los signos de la enfermedad después de las primeras dos semanas del tratamiento. Éste progreso continuo a través de todo el periodo de la terapia de 60 días. Esto estaba soportado por un aumento significativo en el tiempo de tolerancia durante la prueba ESG de ejercicio de ruedas de ardilla realizado según el protocolo de Bruce modificado.

Al final del periodo de observación, después de 60 días, no se detectó ni actividad de abzimas ni presencia de anti-clamidia IgG en su suero.

ES 2 329 770 T3

Estos cambios en la actividad de las abzymas coincidió con una mejora significativa en la condición clínica del paciente. Su puntuación en el protocolo Rose-Blackburn se redujo de 17 antes del tratamiento a 13 después del mismo.

5 Ejemplo 17

Efecto de la Terapia de Anti-Abzymas sobre la Trombosis

Uno de los indicadores de desórdenes de aterosclerosis es que los pacientes a menudo presentan aberraciones en el tiempo que tarda su sangre en la formación de cuádrulos (que generalmente aumenta en los pacientes). Una serie de trayectorias pueden provocar la formación de coágulos y, por lo tanto, hay cuatro pruebas reconocidas internacionalmente para el tiempo de coagulación. La primera se llama Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) y funciona añadiendo tromboplastina y calcio para medir la trayectoria intrínseca. La segunda se llama Prothombin Time (PT) y es una medición simple de la trayectoria extrínseca. La Silica clotting time (SCT) mide la coagulación inducida mediante partículas finas (sílice) y la Kaolin Clotting Time (KCT) mide la población decida mediante partículas mayores (caolina). Para todas estas unos tiempos de coagulación rápidos son indicativos de un mayor riesgo de trombosis.

Antes el tratamiento, se midieron los tiempos de coagulación usando los cuatro procedimientos para todos los pacientes en todos los grupos de terapia y se calculó que el promedio con un error estándar. Las mediciones se repitieron 60 días después. Los controles fueron nuestro grupo de control de pacientes (medidas tomadas una vez - los valores no cambiaron de manera significativa para estos pacientes a hablar con el tiempo) y también forman nuestro grupo de control clínicamente sano. Los resultados del tratamiento se muestran en la tabla 32.

El valor promedio para los pacientes antes del tratamiento para la prueba APTT fue de $22,4 \pm 0,89$ (comparable con el valor del grupo de control de pacientes de $25,2 \pm 1,37$) y en la significativamente diferente del valor del grupo clínicamente sano de $49,1 \pm 7$. Después del tratamiento, los pacientes tenían un valor promedio de $46,9 \pm 6,45$ y estaban, por lo tanto, dentro del “intervalo normal” de tiempos de coagulación, es decir, se habían normalizado.

El valor promedio para los pacientes antes del tratamiento para la prueba PT fue de $13,5 \pm 0,94$ (comparable con el valor del grupo de control de pacientes de $17,3 \pm 4,05$) inferior que el valor del grupo clínicamente sano de $23,7 \pm 4,01$. Después del tratamiento los pacientes tenían un valor promedio de $25,3 \pm 4,05$ y, por lo tanto, estaban dentro del “intervalo normal” de tiempos de coagulación, es decir, se habían normalizado.

El valor promedio para los pacientes antes del tratamiento para la prueba SCT fue de $151 \pm 15,0$ (comparable con el valor del grupo de control de pacientes de $137 \pm 11,5$) y significativamente menor que el valor del grupo clínicamente sano de $248 \pm 10,0$. Después del tratamiento, los pacientes tenían un valor promedio de $235 \pm 17,9$ y estaban, por lo tanto, dentro del “intervalo normal” de tiempos de coagulación, es decir, se habían normalizado.

El valor promedio para los pacientes antes del tratamiento para la prueba KCT fue de $51,2 \pm 4,59$ (comparable con el valor del grupo de control de pacientes de $50,3 \pm 2,16$) y era significativamente diferente del valor promedio del grupo clínicamente sano de $133 \pm 23,7$. Después del tratamiento, los pacientes tenían un valor promedio de $126 \pm 34,2$ y, por lo tanto, estaban dentro del “intervalo normal” de tiempos de coagulación, es decir, se habían normalizado.

Estos resultados muestran que la terapia de anti-abzymas se puede utilizar para normalizar los tiempos de población (utilizando todos los ensayos de tiempos de coagulación reconocidos internacionalmente) y reducir el riesgo de trombosis y, así, ataques de corazón e ictus.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 329 770 T3

TABLA I

IgG de lesión aterosclerótica humana, en µg	Peróxidación de lípidos, en µM MDA por ml	
	+ 10 µl clamidia ovina	+ 2,5 µl clamidia felina
0 (control)	3 ± 0,4	0 ± 0,3
0,18	6 ± 1,1	2 ± 0,7
0,36	2 ± 1,2	0 ± 0,5
0,57	10 ± 0,9	1 ± 0,2
0,8	18 ± 1,0	0 ± 0,4
1,35	19 ± 0,7	0 ± 0,5
1,8	26 ± 1,3	0 ± 0,8
5,4		4 ± 0,3
8,0		23 ± 1,5

ES 2 329 770 T3

TABLA 2

Sistemas probados	Peroxidación de lípidos en suero, en μM MDA/ml	
	Sin clamidia	+ 10 μl clamidia ovina
<u>Lipoproteínas + anticuerpos</u> (1 ^{er} control)		
Lipoproteínas de suero	130 \pm 9,43	193 \pm 19,9
+ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lesión IgG*	246 \pm 17,5	342 \pm 8,52
<u>Solamente anticuerpos</u> (2 ^o control)		
Lipoproteína retirada del suero mediante ultracentrifugación		
+ 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lesión IgG*	29 \pm 3,57	63 \pm 5,42
<u>Retirada de anticuerpo mediante pre- absorción con lipoproteínas de suero</u>		
El suero se incubó inicialmente con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lesión IgG* y a continuación las lipoproteínas se retiraron mediante ultracentrifugación	35 \pm 4,66	23 \pm 1,71

ES 2 329 770 T3

TABLA 3

5	Suero	Suero Control, MDA en $\mu\text{M/ml}$	Suero paciente N°3', MDA en $\mu\text{M/ml}$
10	Nivel inicial	58 \pm 4,5	187 + 5,0 (100%)
15	+ 6,25 μl clamidia felina	50 \pm 2,8	225 \pm 9,9 (120%)
20			p < 0,05

TABLA 4

30	Muestras	Suero Control', MDA en $\mu\text{M/ml}$		Suero paciente N°2', MDA en $\mu\text{M/ml}$			
35		Nivel inicial	+ clamidia ovina		Nivel inicial	+ clamidia ovina	
40			10 μl	100 μl		10 μl	100 μl
45	Suero	56 \pm 6,4	58 \pm 5,0	48 \pm 6,6	128 \pm 9,0 (100%)	202 \pm 13,4 (158%) p<0,01	580 \pm 24,2 (453%) p<0.001
50	Suero- IgG	52 \pm 6,2	60 \pm 6,6	62 \pm 7,2	76 \pm 4,4	72 \pm 6,8	96+ 8,4

ES 2 329 770 T3

TABLA 5

Casos	Peroxidación de lípidos en μM MDA por 1 ml de suero		
	Antes de la adición de clamidia*	Después de la adición de clamidia*	Incremento
Control: K	58	90	32
K1	104	124	20
K2	124	148	24
K3	131	168	37
K4	106	124	18
M	112	108	- 4/0
M1	70	70	0
M2	78	86	8
M3	102	80	- 22/0
M4	84	76	- 8/0
	96.8 ± 3.99 (n = 10)	108 ± 5.73 (n = 10) P (+Chlamydia) > 0.05	13.9 ± 5.14 (n = 10)
Pacientes 1	116	166	50
4	86	106	20
5	122	168	46
6	40	62	22
6a	208	336	128
7	118	166	48
8	82	98	16
9	160	290	130
10	60	80	20
11	236	368	132
12	256	328	72
13	174	350	176
14	168	306	138
15	126	162	36
16	290	290	0
17	246	342	96
18	270	376	106
19	156	272	116
20	164	312	148
21	206	344	138
22	290	332	42
	170 ± 10.8 (n = 21) P (control) < 0.001	250 ± 15.0 (n = 21) P (control) < 0.001 P (+Chlamydia) < 0.01	80.0 ± 13.1 (n = 21) P (control) < 0.001

ES 2 329 770 T3

TABLA 6

LDL, 480 µg de proteína	Nivel de producción de MDA mediante 0,82 µg de lesión IgG, en µM
Control	0,49 ± 0,023
+ 0,1M formato de sodio	0
+ 0,1 mM ácido ascórbico*	0
+ 0,1 M ácido benzoico	0
+ 1% DMSO*	0

* Antioxidantes aprobado para su uso en humanos en la mayoría de países desarrollados.

TABLA 7

Metales	Queladores	Preparaciones Proprietarios
Fe ⁺² /Fe ⁺³	Mesilato de Desferrioxamina	<i>Canad.:</i> Zinecard; <i>Fr.:</i> Cardioxano; <i>Ital.:</i> Cardioxano; Eucardion; <i>USA:</i> Zinecard.
	Derivados Haem	<i>Austral.:</i> Panhematina; <i>Fr.:</i> Normosang; <i>USA.:</i> Panhematina.

ES 2 329 770 T3

Metales	Queladores	Preparaciones Proprietarios
5 CU ⁺ /CU ²⁺ 10 15 20	<u>Penicilamina</u>	Aust.: Artamina; Distamina; Austral.: D-Penammina; Belg.:Quelatina; Canad.: Cuprimina; Depen; Fr.: Trolovol; Alem.: Metacaptasa; Trisorcina; Trolovol; Irl.: Distamina; Ital.: Pemina; Sufortan; Países B.: Cuprimina, Distamina; Gerodyl; Quelatina; Noruega: Cuprimina; S.Afr.:Metaalcaptasa; España:Cupreina; Sufortanon; Suecia:Cuprimina; Suiza:Mercaptil; UK: Distamina, Pendramina; USA:Cuprimina; Depen.
25	Tiopronina	Fr.: Acadiona; Alem.:Captimer; Ital.: Epatiol; Mucolisina; Mucosyt; Tiola; Tioglis; España: Sutilan; Suiza: Mucolisina; USA:Thiola. Multi-ingredientes: Ital.:Mucolisina Antibiótico; España: Hepadigest.
35	Dihidrocloruro de Trientina	USA: Siprina.
40	Dietilditiocarbamato Ácido Acetilsalicílico	
45 50	<u>Edetato de Disodio/Trisodio</u>	Fr.: Chelatran; Tracemato; Irl.: Limclair; UK: Limclair; USA: Disotato; Endrato. Multi-ingredientes: Canad.:Lágrimas de suplemento de murina; Fr.: Vitaclair; Ger.: Complete; Duracare; Oxysept; UK: Uriflex G; Uriflex R.
55	Ácido edético	Multi-ingredientes: Ital.:Conta-Lens Wetting; USA: Summer's Eve Post-Menstrual; Triv; Vagisec Plus; Zonite.
60	Unitiol	Ger.: Dimaval; Mercuval.
Otros metales de		

ES 2 329 770 T3

Metales	Queladores	Preparaciones Proprietarios
5 valencia transiente		
10 *Cualquier metal bivalente		

15
TABLA 8

20 Agentes antibacterianos	Preparaciones propietario
25 <u>Tetraciclina</u>	<p>30 Aust: Acromicina; Actisite; Hostaciclina; Laticina; Esteclina; tetrarco; Austral.: Acromicina; Acromicina V; Laticina; Mistecclina; Panmicina P; Esteclina-V; Tetramicoína;</p> <p>35 Tetrex; Belg.: Hostacuclina; Canad.: Acromicina; Acromicina V; Apo-Tetra; Novo-Tetra; Nu-Tetra; Tetracina; Fr.: Florociclina; Hexaciclina; Tetramig; Alem.: Acromicina; Akne-Pyodron Kur; Akne-Pyodron oral; Dispatetrina; Hostaciclina; Imex; Quimociclina N; Sagitacina N; Esteclina; Supramicina; Tefilina; 40 Tetrabakat; Tetrablet; Tetracitro S; Tetralución; Ital.: Acromicina; Ambramicina; Calociclina; Ibicina; Espaciclina; Tetra-Proter; 45 Tetrabiopthal; Tetrafosamma; Países B.: Tetrarco; S.Afr.: Acromicina; Arcanaciclina; Gammatet; Hostaciclina; Rotet;</p> <p>50 Tetrex; España: Actisite; Ambramicia; Britaciclina; Kinciclina; Quimpe Antibiótico; Tetra Hubber; 55 Tetralen; Tetrarco Simple; Suecia: Acromicina; Actisite; Suiza: Acromicina; Actisite; Servitet; Tetraseptina; Trifaciclina; UK: Acromicina; 60 Economicina; Sustamicina; Tetrabid-Organon; Tetrachel; USA: Acromicina V; Acromicina; Actisite; Nor-Tet; Panmicina; Robitet Robicaps; Sumicina;</p>

ES 2 329 770 T3

Agentes antibacterianos	Preparaciones propietario
	Telina; Tetracap; Tetralan; Tetram.*
<u>Eritromicina</u> <u>Azitromicina</u> <u>Roxitromicina</u> Ofloxacina Clinafloxacina Ciprofloxacina Clindamicina Doxiciclina Minociclina	

*Multi-ingredientes: numerosas preparaciones

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 329 770 T3

TABLA 9

Antioxidantes	Preparaciones Proprietario:
<p>5 Alfa- 10 Tocoferol</p>	<p>Aust.: Avigilen; Ephynal; Etocovit; Evit; Evitol; Tetefit Vitamin E; Austral: Alpha Keri Silky Smooth; Bioglan Micelle E; Bioglan Natural E; Bioglan Water Soluble E; 15 Chew-E; Dal-E; Invite E Forte; Invite E; Marco E; Mega E; Megavit Natural E; Belg.: Ephynal; Canad.: Aquasol E; Novo E; 20 Organex; Vita-E; Fr.: Ephynal; Tocalfa; Toco; Tocomine; Alem.: Antioxidants E; Biopto-E; Detulin; E-Muslin; E-Vicotrat; 25 Ecoro; Embial; Ephynal; Pexan E; Puncto E; Sanavitan S; Tocoirell; Tocovenos; Tocovitdl; Togasan; Vitagutt Vitamin 30 E; Irl.: Ephynal; Ital.: E Perle; E-Vit; E- Vitum; Ephynal; Evasen Cream; Evion; 35 Evitina; Fertilvit; Na-To-Caps; Tocoferina E; Tocoferolo Bioglan; Tocogen; Viteril; Noruega: AFI-E; Ido- 40 E; S. Afr.: Ephynal; España: Auxina E; Ephynal; Glutaneurina B6 Fte; Suecia: Ephynal; Opto Vit-E; 45 Vitacim; UK: Bio E; Ephynal; Praire Gold; Vita-E; USA: Amino-Opti-E; Aquasol E; Aquavit-E; Vita-Plus E; Vitec.*</p>
<p>50 <u>Mannitol</u></p>	<p>Aust.: Osmofundin 20%; Austral.: Mede-Prep; Osmitol; Canad.: Osmitol; Fr.: 55 Manicol; Alem.: Eufusol M 20; Mannit-Losung; Osmofundin 15%; Osmosteril 20%; Thomaemannit; Ital.: Isotol; 60 Mannistol; Suiza: Mannite; USA: Osmitol; Resectisol.*</p>

ES 2 329 770 T3

Antioxidantes	Preparaciones Proprietario:
5 Silidianina	<p>Aust.: Apihepar.; Biogelat leberschutz; Hepar Pasc Mono; Legalon; Silyhexal; Austral.: Herbal Liver Formula; 10 Liver Tonic Capsules; Prol.; Belg.: Legalon SIL; Fr.: Legalon; Alem.: Alepa; Ardeyhepan N; Carduus-monoplant; Cefasliymarin; 15 Divinal-Hepa; Durasilymarin; Hegrimarín; Heliplant; Hepa-loges N; Hepa-Merz Sil; Hepar-Pasc; Heparano N; Heparsyx N; 20 Hepatorell; Hepatos; Heplant; Legalon; Legalon SIL; Logomed Leber-KapseIn; Mariendistel Curarina; Phytohepar; 25 Poikicholan; Probiophyt V; Silibene; Silicur; Silimarit; Silmar; Sulfolitruw H., 30 Vit-o- Mar; Ital: Eparsil; Legalon; Locasil; Marsil; Silepar; Silimarin; Silirex; Silliver; Silmar; Trissil; S. 35 Afr.: Legalon; España: Legalon; Silarine; Silimazu; Suiza: Legalon; Legalon SIL.</p>
40 Ácido ascórbico Etc.	

45 *Multi-ingredientes: numerosas preparaciones

50 TABLA 10

55 Oveja	Peroxidación de lípidos de suero ovino en μ M MDA por ml	
	- Clamidia	+ Clamidia
60 Pre-vacunada		
65 No.1	44	39 (89%)

ES 2 329 770 T3

Oveja	Peroxidación de lípidos de suero ovino en μM MDA por ml	
	- Clamidia	+ Clamidia
No.2	59	67 (114%)
Post- vacunada		
No.8	67	85 (127%)
No.5	54	46 (85%)
Post- absorción (tipo salvaje)		
A	48	102 (212%)
B	63	118 (187%)

TABLA 11

Me^{2+} -agente unión, 10 μM de cada	Actividad de oxidación de lípidos de abzimas anti- clamidia en, μM MDA/ml*	Resultado	Uso clínico potencial de agente para la inhibición de abzimas anti- clamidia
Control	24,3		
NaN_3	0	Positivo	Muy tóxico, no usar

ES 2 329 770 T3

Me ²⁺ -agente unión, 10 µM de cada	Actividad de oxidación de lípidos de abzimias anti- clamidia en, µM MDA/ml*	<u>Resultado</u>	Uso clínico potencial de agente para la inhibición de abzimias anti- clamidia
KCN	0	Positivo	Muy tóxico, no usar
Tetraciclina	18,3	Negativo	No usar
DTPA	45,2	Negativo	No usar
Ácido picolínico	0	Positivo	Prooxidante, no usar
<u>Cu²⁺ -queladores</u>			
DDC	0	Positivo	Posible uso ("Imutiol")
Ácido acetilsalicílico	6,2	Positivo	Posible uso ("Aspirina")
Penicilamina	0	Positivo	Posible uso ("Penicilamina")

* Cada número es un promedio de mediciones duplicadas/triplicadas y se calcula como una diferencia entre el nivel de acumulación de MDA en el suero probado antes y después de la adición de 0,5 de dosis de inmunización de vacuna de clamidia ovina ('Intervet') .

ES 2 329 770 T3

TABLA 12

Inhibidor	Mecanismo de acción	Inhibición In-vitro (+ = inhibición) (- = no inhibición)
Tetraciclina	Inhibición Fe ²⁺	-
DDC	Inhibición libre y unión Cu ²⁺	+
Aspirina (ácido acetilsalicílico)	Inhibición libre y unión Cu ²⁺	+
Penicilamina	Inhibición libre y unión Cu ²⁺	+
CN ⁻	Inhibición libre y unión metal	+
N ₃	Inhibición libre y unión Cu ²⁺	+
DTPA	Inhibición metal libre solamente	-
Ácido picolínico	Inhibición libre y unión metal	+

ES 2 329 770 T3

TABLA 13

Inicio de paciente con CHD	Nivel de actividad de abzimas anti- clamidia en μM MDA/ml	
	Antes de tomar aspirina	7 días después de empezar a tomar 250 mg de aspirina diariamente
S	45	0
A	100	20
Y	45	0

TABLA 14

Inicio del paciente	Nivel de actividad de abzimas anti-clamidia en μM MDA/ml		
	Toma de aspirina 250 mg a diario	Después de detener la toma de aspirina durante 7 días	7 días después de volver a iniciar la toma de 250 mg de aspirina a diario
F	10	65	20

TABLA 15

Paciente	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml		
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del tratamiento	30 días después del inicio del tratamiento
1.	30	6,7	3,3
2.	90	6,7	-

ES 2 329 770 T3

Paciente	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml		
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del tratamiento	30 días después del inicio del tratamiento
3.	80	0	0
4.	40	60	37
5.	50	0	0
6.	15	8,3	28
7.	10	6,7	3,3
8.	35	33	10
9.	85	75	78
10.	30	0	0
11.	40	-	-
	45,9	19,6	17,7

TABLA 16

Paciente	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml	
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del tratamiento
12	100	43
13	93	27
14	33	0
15	30	0
16	153	0
17	15	0
18	25	3,3
19	15	0

ES 2 329 770 T3

Paciente	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml	
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del tratamiento
	58,0	9,16

TABLA 17

Paciente	Condición clínica	
	Antes del tratamiento	Después de 15 días de tratamiento
2	Angina inestable; Prueba de ejercicio ECG inaplicable	Condición estable; la prueba de ejercicio ECG demostró una tolerancia significativa; no se registraron ataques de angina durante este periodo; retorno a su trabajo a plena capacidad
5	Clasificado como angina clase III; 10 tabletas de nitroglicerina a diario	Basada en la mejora de la prueba de ejercicio ECG, la condición del paciente se reclasificó como angina clase II; reducción en la frecuencia y severidad de los ataques de angina; 5 tabletas de nitroglicerina a diario

ES 2 329 770 T3

TABLA 18

CONTROL	ISQUEMIA SILENCIOSA	ANGINA ESTABLE	ANGINA INESTABLE	INFARTO DE MIOCARDIO	
				Fase aguda 1er-3er Día	14° Día
6,36 ± 1,14	68,8 ± 16,7	37,1 ± 2,23	101	14,4 ± 2,60	80,6 ± 21,4
(n = 67)	(n = 15)	(n = 193)	(n = 13)	(n = 25)	(n = 14)
11/67 =16%	14/15 = 93%	130/193 =67%	12/13 = 92%	12/25 =48%	12/14 =86%
	$P_{\text{control}} < 0,001$	$P_{\text{control}} < 0,001$	$P_{\text{control}} < 0,001$	$P_{\text{control}} < 0,01$	$P_{\text{acute phase}} < 0,01$
			$P_{\text{angina estable}} < 0,001$	$P_{\text{angina inestable}} < 0,001$	

TABLA 19

ENFERMEDAD ISQUÉMICA DE CORAZÓN (total): 168/235 = 71%							
<u>ANGINA ESTABLE</u>						<u>ANGINA INESTABLE</u>	
I		II		III		IV	
	+		+		+		+
	aspirina		aspirina		aspirina		aspirina
15	0	45	30	45	20	70	180

ES 2 329 770 T3

ENFERMEDAD ISQUÉMICA DE CORAZÓN (total): 168/235 = 71%							
<u>ANGINA ESTABLE</u>						<u>ANGINA INESTABLE</u>	
I		II		III		IV	
	+ aspirina		+ aspirina		+ aspirina		+ aspirina
75	5	0	5	40	0	90	130
15	45	70	10	10	45	30	70
15	0	50	10	45	0	250	0
	10	20	0	60	5	140	37
	0	0	5	90	35	130	90
		8	25	25	0		100
		0	0	30	15		
		53	5	153	30		
		18	22,5	15	105		
		17	0	93,3			
		43	5				
		10	3,3				
		50	0				
		32,5	16,7				
		100					
	1/6		4/15		6/10		6/7
	17%		27%		60%		86%
30,0	10,0	32,2	9,2	56,0	25,5	119	86,7
(n = 4)	(n = 6)	(n = 16)	(n = 15)	(n = 11)	(n = 10)	(n = 6)	(n = 7)
4/9 = 44%		12/26 = 46%		12/17 = 71%		12/13 = 92%	

65

ES 2 329 770 T3

TABLA 20

Conejo	Anti-clamidia IgG, ELISA**		Abzimas anti-clamidia, en μ M MDA/ml**	
	Día de la infección		Día de la infección	
	0	14	0	14
1	0	1:1.600	0	71
2	0	1:3.200	-	203
3	0	1:800	0	131
Control	0	0	0	0

TABLA 21

Conejo	Anti-clamidia IgG, ELISA**				Abzimas anti-clamidia, en μ M MDA/ml**			
	Día de la infección				Día de la infección			
	0	14	22		0	14	22	
			§ + vacuna			§ + vacuna		
1	0	1:1.600	1:1.600	-	0	71	165	-
2	0	1:	1:3.200	-	-	203	180	-
3	0	3,200	-	1:1.600	0	131	-	64
		1:800						
Control	0	0	-	-	0	0	-	-

ES 2 329 770 T3

TABLA 22

Pacientes	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml				
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del tratamiento	30 días después del inicio del tratamiento	45 días después del inicio del tratamiento	60 días después del inicio del tratamiento
TGA1	30	6,7	3,3	0	0
TGA2	90	6,7	78**	17	3,3
TGA3	80	0	0	0	6,7
TGA4	40	60*	37*	0	0
TGA5	50	0	0	20*	0
TGA6	15	8,3	28**	43*	6,7
TGA7	28	6,7	3,3	3,3	0
TGA8	35	33	10	3,3	0,5
TGA9	85	75*	078*	0	0
TGA10	30	0	0	5.0	0
TGA11	40	52*	10	0	0
	47,5	22,5	22,5	7,4	1,6

ES 2 329 770 T3

TABLA 23

Pacientes en Grupo Terapia B	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml				
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del trata- miento	30 días después del inicio del trata- miento	45 días después del inicio del trata- miento	60 días después del inicio del trata- miento
TGB1	100	43	10	0	-
TGB2	93	27	30	0	10
TGB3	33	0	0	0	0
TGB4	30	0	6,7	0	3,3
TGB5	153	0	0	0	3,3
TGB6	15	0	0	3.3	0
TGB7	25	3,3	0	80**	0
TGB8	155	0	3,3	10	0
	58,0	9,16	6,25	11,6	2,4

TABLA 24

Pacientes en Grupo Terapia C	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml			
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del trata- miento	30 días después del inicio del trata- miento	45 días después del inicio del trata- miento
TGC1	15	28*	23*	23*
TGC2	23	0	0	0

ES 2 329 770 T3

Pacientes en Grupo Terapia C	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml			
	Antes del tratamiento	15 días después del inicio del trata- miento	30 días después del inicio del trata- miento	45 días después del inicio del trata- miento
TGC3	25	17	0	13
TGC4	60	0	0	0
TGC5	45	1,7	0	0
TGC6	43	18	0	0
TGC7	140	53	20	20
TGC8	130	57	17	3,3
TGC9	18	0	0	13
	55,6	19,4	6,67	8,10

TABLA 25

Pacientes en Grupo Terapia D	Actividad abzimas anti-clamidia, en μM MDA/ml	
	Antes del tratamiento	60 días después del inicio del tratamiento
TGD1	103	63
TGD2	253	103
	178	83,2

ES 2 329 770 T3

TABLA 26

	<u>Grupo Control</u> <u>Pacientes (PCG)</u>	<u>Actividad abzymas anti-clamidia, en</u>	
		<u>µM MDA/ml</u>	
		<u>En Día 1</u>	<u>En Día 60</u>
5			
10	PCG1	43	43
	PCG2	93	70
15	PCG3	60	53
	PCG4	17	25
20	PCG5	70	55
	PCG6	25	23
25	PCG7	20	34
	PCG8	70	68
30	PCG9	20	20
	PCG10	30	27
35	PCG11	20	45
	PCG12	170	150
40	PCG13	70	103
	PCG14	45	57
45	PCG15	50	55
	PCG16	53	71
50	PCG17	18	45
	PCG18	15	34
55	PCG19	45	67
	PCG20	60	61
60		50,0±7,08	55,3±6,18

65

ES 2 329 770 T3

TABLA 27

5	Parámetro		Azitromicina	Azitromicina	Azitromicina	PCG	Norm
			Grupo Terapia A	+ antioxidantes Grupo Terapia C	+ aspirina Grupo Terapia B		
15	Abzimas anti- clamydia actividad, en µM/MDA/ml	Antes del tratamiento	47,5 ± 8,96	55,0 ± 16,2	58,0 ± 20,4	50,0 ±7,08	6,36 ± 1,14
20		60 días después del tratamiento	1,6 ± 0,89 p < 0,001*	8,1 ± 3,60 p < 0,05*	2,4 ± 1,37 p < 0,05*	553±6,18 p>0,05	
25	Anti-clamidia IgG ³ . (títulos) 1	Antes del tratamiento	43,6	48,5	52,0	-	0
30		60 días después del tratamiento	0 p < 0,001*	0 p < 0,001*	0 p < 0,001*	-	0
35	Estado clínico Cuestionario Rose G., Blackburn H. modificado	Antes del tratamiento	19,4 ± 1,79	18,6 ± 0,81	20,4 ± 1,79	19,8 ± 1,43	0
40		60 días después del tratamiento	14,4 ± 1,14 p < 0,05*	15,4 ± 1,75 p > 0,05	15,0 ± 1,17 p < 0,01*	21,5 ± 21,5 ±	
45	Coagulación	Antes del tratamiento	151 ± 18,8				200 -
50	Tiempo coagulación Sílice**, en seg	60 días después del tratamiento	222 ± 18,4 p < 0,05*				250
55							

ES 2 329 770 T3

TABLA 28

Grupo Terapia/Paciente	Puntuación mediante Cuestionario Rose- Blackburn modificado	
	Antes del tratamiento	60 días después del inicio del tratamiento
Grupo Terapia		
A		
TGA1	25	17
TGA2	22	19
TGA3	12	10
TGA4	19	13
TGA5	23	16
TGA6	21	18
TGA7	25	15
TGA8	16	15
TGA9	10	8
TGA10	15	11
TGA11	25	17
	19,4 ± 1,79	14,4 ± 1,14
Grupo Terapia		
B		
TGB1	21	19
TGB2	17	14
TGB3	23	14
TGB4	24	12
TGB5	19	19

ES 2 329 770 T3

Grupo Terapia/Paciente	Puntuación mediante Cuestionario Rose- Blackburn modificado	
	Antes del tratamiento	60 días después del inicio del tratamiento
TGB6	16	-
TGB7	24	13
TGB8	19	14
	20,4 ± 1,24	15,0 ± 1,17
Grupo Terapia		
C		
TGC1	15	9
TGC2	21	21
TGC3	18	13
TGC4	16	16
TGC5	19	9
TGC6	21	21
TGC7	17	17
TGC8	20	13
TGC9	20	20
	18,6 ± 0,81	15,4 ± 1,75

TABLA 29

Código paciente	Actividad abzimas Día 0	Actividad abzimas Día 60	Puntuación Rose Blackthorn Día 0	Puntuación Rose Blackthorn Día 60
TGA2	90	3,3	22	19

ES 2 329 770 T3

Código paciente	Actividad abzimas Día 0	Actividad abzimas Día 60	Puntuación Rose Blackthorn Día 0	Puntuación Rose Blackthorn Día 60
TGA3	80	6,7	12	10
TGA4	40	0	19	13
TGA6	15	6.7	21	18
TGB3	15	0	23	14
TGC5	45	0	19	9
TGC7	140	20	17	17

TABLA 30

Compuesto y su concentración	Actividad de oxidación de lípidos de abzimas anti-clamidia en, μM MDA/ml *	Comentarios
Control	61	
Azitromicina**		
Suspensión en agua		Las propiedades antioxidants son comparables con o mayores que α -Tocoferol
20 μM	0	
10 μM	0	
2 μM	0	
1 μM	19	

ES 2 329 770 T3

Compuesto y su concentración	Actividad de oxidación de lípidos de abzimas anti-clamidia en, μM MDA/ml *	Comentarios
Suspensión en DMSO		
5 μM	0	
1 μM	7	
<u>α-Tocoferol</u> en DMSO		
10 μM	0	
1 μM	15	

TABLA 31

<u>FÁRMACOS</u>	Actividad anti-abzima, en μM MDA/ml
Control	21,7
Beta Bloqueante	
1. Propranolol Hydrocloruro OBSIDAN	
175 μM	21,3
35 μM	18,3

ES 2 329 770 T3

	<u>FÁRMACOS</u>	Actividad anti-abzima, en μM MDA/ml
5	Nitratos	
10	1. Gliceril Trinitrato PERLINGANIT	0
	220 μM	0
15	44 μM	0
	22 μM	0
20	4,4 μM	0
25	2. Isosorburo Dinitrato ISOKET	
	211 μM	0
30	42 μM	0
35	Magnesio	
	1. Sulfato de Magnesio	
40	101 μM	0
	51 μM	0
45	40 μM	16
	20 μM	26
50	Heparina	
	1. Heparina	
55	0,1 mg/ml	19,7
60	2. Nadroparina Calcio	12,8

65

ES 2 329 770 T3

	<u>FÁRMACOS</u>	Actividad anti-abzima, en μM MDA/ml
5		
	FRAXIPARINA	
	465 UI	20,5
10	95 UI	
15	Bloqueante Canal Calcio	
	1. Verapamil Hidrocloruro	
20	ISOPTIN 51μM	
	10,2 μM	3
25	5,1 μM	24,0
		21,5
30	<u>Corticosteroides</u>	
	1. Dexametasona	
35	25 μM	
	12,5μM	24,5
40		20,1
	<u>Antibióticos</u>	
45	1. Lincomicina Hidrocloruro	
	13 μM	30,3
50	6,5 μM	28,5

55

60

65

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos no procedentes de patente citados en la descripción

- 10 • **Swartz G.M., Jr. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988**, vol. 85, 1902-1906 [0002]
- **Alving C.R.; Swartz G.M., Jr. Critical Reviews in Immunology, 1991**, vol. 10, 441-453 [0002]
- **Alving C.R. Biochem. Soc. Trans., 1984**, vol. 12, 342-344 [0002]
- 15 • **Kabakov A.E. et al. Clin. Immun. Immunopath., 1992**, vol. 63, 214-220 [0002]
- **Mironova M et al. CLIN. IMMUN. IMMUNOPATH., 1997**, vol. 85, 73-82 [0002]
- 20 • **Lopes-Virella M.F.; Virella G. Clin. Immun. Immunopath., 1994**, vol. 73, 155-167 [0002]
- **Kiener P.A. et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1995**, vol. 15, 990-999 [0002]
- **Tertov V.V et al. Atherosclerosis, 1990**, vol. 81, 183-189 [0003]
- 25 • **Orekhov A.N. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989**, vol. 162, 206-211 [0003]
- **Orekhov A.N. et al. Biobhem. Biophys. Res. Comm., 1989**, vol. 162, 206-211 [0004]
- 30 • **Orekhov A.N. et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1991**, vol. 11, 316-326 [0004]
- **Goto Y. Lipid Peroxides in Biology and Medicine. Academic Press, 1982**, 295-303 [0004]
- **Halliwell B.; J.M.C. Gutteridge. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, 1989** [0004]
- 35 • **Schultz D et al. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000**, vol. 20, 1412-1413 [0004]
- **Armitage et al. Nature, 1992**, vol. 357, 80-82 [0037]
- 40 • **Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab Press, 31 December 2000** [0038]
- **Dematis et al. J. Mol. Biol., 1999**, vol. 286 (2), 617-633 [0038]
- 45 • **Harrison et al. Methods Enzymol., 1996**, vol. 267, 83-109 [0038]
- **Roivainen M. et al. Circulation, 2000**, vol. 101, 252-257 [0040]
- **Siscovick D.S. et al. J. Infect. Dis., 2000**, vol. 181 (3), 417-420 [0040]
- 50 • **Mendall M. et al. J. Infect., 1995**, vol. 30, 121-128 [0040]
- **Davidson M. et al. Circulation, 1998**, vol. 98, 628-633m [0040]
- 55 • **Song Y.G. et al. Yonsei Med. J., 2000**, vol. 41, 319-327 [0040]
- **Huittinen et al. Eur Resp. J., 2001**, vol. 17 (6), 1078-1082 [0043]
- **Kinnunen A. et al. Scand. J. Immunol., 2001**, vol. 54 (1-2), 76-81 [0043]
- 60 • **Schultz, JS. Biotechnol. Prog., 1996**, vol. 12, 729-743 [0048]
- **CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press, 1985** [0060]
- 65 • **Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology. Academic Press, 1990**, vol. 186 [0060]
- **Oxygen Radicals in Biological Systems. Methods in Enzymology. Academic Press, 1994**, vol. 234 [0060]

ES 2 329 770 T3

- Free Radicals. A practical approach. *IRL Press, 1996* [0060]
- **Brown, R.K.; Kelly, F.J.** Free Radicals. A practical approach. *IRL Press, 1996*, 119-131 [0063]
- 5 • **Quantitative analysis of 4-hydroxy-2-nonenal. Kinter, M.** FREE RADICALS. *A PRACTICAL APPROACH*. 133-145 [0063]
- **F2-Isoprostanes: prostaglandin-like products of lipid peroxidation. Morrow, J.D.; Roberts, L.J.** FREE RADICALS. *A PRACTICAL APPROACH*. 147-157 [0063]
- 10 • **Campbell A.K.** Chemiluminescence. *VCH, Ellis Horwood Ltd, 1988* [0065]
- **Kozlov Yu P.** Role of Free Radicals in normal and pathological processes. *Doctorate thesis, 1968* [0066]
- 15 • **Vladimirov, Y.A.; Archakov, A.I.** *Lipid Peroxidation in Biological Membranes, 1972* [0067]
- **Intrinsic low-level chemiluminescence. Vladimirov, Y.A.** Free Radicals. A practical approach. *IRL Press, 1996*, 65-82 [0067]
- 20 • **vitro and in vivo detection of free radical metabolites with electron spin resonance. Mason, R.P.** Free Radicals. A practical approach. *IRL Press, 1996*, 11-24 [0067]
- **Petyaev, M.M.** Biophysical approaches in the diagnosis of cancer. *Medicina, Moscow, 1972* [0067]
- 25 • **Chemical and Biochemical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase. Elsevier/North-Holland, 1980** [0081]
- **Lipid Peroxides in Biology and Medicine. Academic Press, 1982** [0081]
- 30 • **Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.** Free Radicals in Biology and Medicine. *Clarendon Press, 1996* [0081]
- **Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals. Taylor and Francis, 1997** [0081]
- 35 • **Hall E.A.H.** Biosensors. *Redwood Press Ltd, 1990* [0096]
- **Polarography. Lingane J.J.** *Interscience Publishers, 19520* [0098]
- **Draper, H.H. et al. Free Radic. Biol. Med., 1993**, vol. 15, 353 [0159]
- 40 • **Havel R.J et al. J. Clin. Invest., 1955**, vol. 34 (22), 1345-1353 [0161]
- **Havel R.J. et al. J. Clin. Invest., 1955**, vol. 34, 1345-1353 [0186]
- 45 • **Bauer B.J. et al. Atherosclerosis, 1982**, vol. 44, 153-160 [0186]

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener un inhibidor de oxidación de lípidos mediado con anticuerpos, que comprende:

5 (a) poner en contacto un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un compuesto de prueba en presencia de un antígeno de célula clamidial; y

(b) determinar la oxidación de los lípidos del antígeno de célula clamidial mediante el anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho antígeno de célula clamidial está comprendido en una célula de clamidia.

15 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la oxidación de lípidos se determina mediante la determinación de la producción de un producto de oxidación de lípidos.

20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el producto de oxidación de lípidos es malondialdehído (MDA).

5. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la oxidación de lípidos se determina mediante la determinación de la hemólisis de eritrocitos.

25 6. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la oxidación de lípidos se determina mediante la determinación de la liberación de una sustancia reportera desde un microcontenedor.

7. Procedimiento para la obtención de un inhibidor de oxidación de lípidos mediado con anticuerpos, que comprende:

30 (a) contactar un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos y un antígeno de célula clamidial en presencia de un compuesto de prueba; y

(b) determinar la unión de dicho antígeno de célula clamidial con dicho anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

35 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho antígeno de célula clamidial está comprendido en una célula de clamidia.

40 9. Procedimiento para la obtención de un inhibidor de oxidación de lípidos mediado con anticuerpos, que comprende:

(a) introducir un compuesto de prueba el sistema vascular de un animal no humano que tiene elevados niveles de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos; y

45 (b) determinar el nivel y/o la actividad de dichos anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos después de dicha introducción.

50 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende la identificación de un compuesto de prueba como un agente que inhibe la unión y/o la actividad de un anticuerpo anti-clamidia de oxidación de lípidos.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende el aislamiento de un compuesto de prueba identificado como un inhibidor de la unión y/o la actividad del anticuerpo de oxidación de lípidos.

55 12. Procedimiento según la reivindicación 11, que comprende la formulación del compuesto de prueba en una composición con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el inhibidor de la oxidación de lípidos mediado con anticuerpos es útil en el tratamiento de una condición aterosclerótica.

60 14. Procedimiento según la reivindicación 9,

en el que dichos niveles elevados de anticuerpos de oxidación de lípidos anti-clamidia en el animal no humano se elicitan mediante la introducción de uno o más antígenos de célula clamidial o células en el sistema vascular del animal.

65

ES 2 329 770 T3

15. Procedimiento para la producción de un modelo animal no humano de una condición aterosclerótica, que comprende:

5 introducir uno o más antígenos de célula clamidial o células aisladas en el sistema vascular de un animal no humano; y

determinar el nivel de anticuerpos anti-clamidia de oxidación de lípidos en dicho sistema vascular después de dicha introducción.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

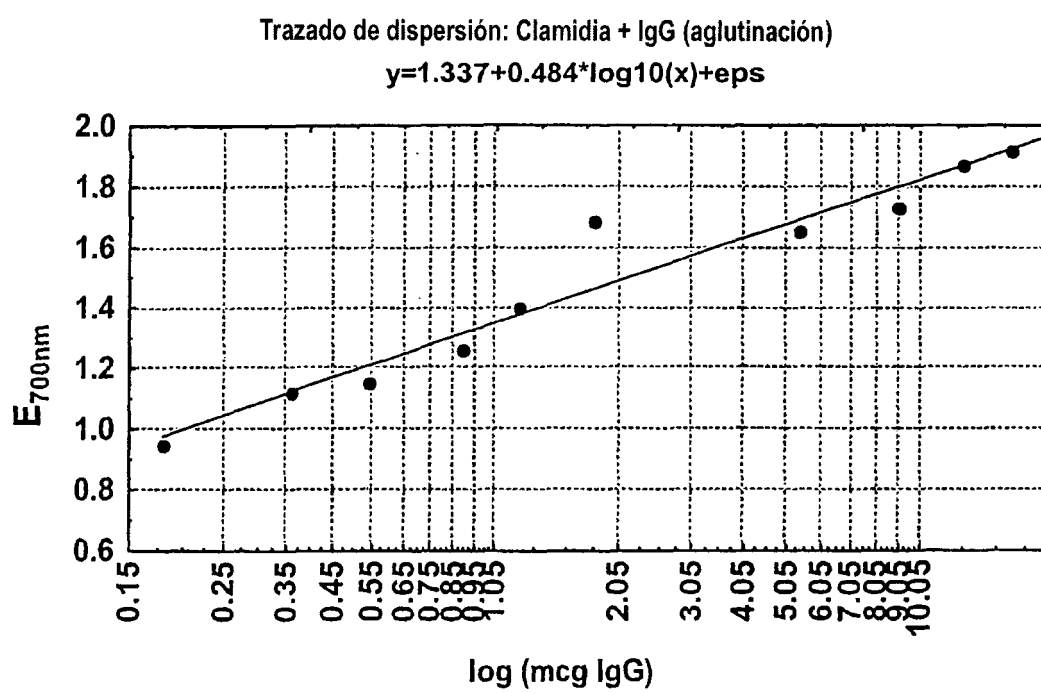


Figura 1

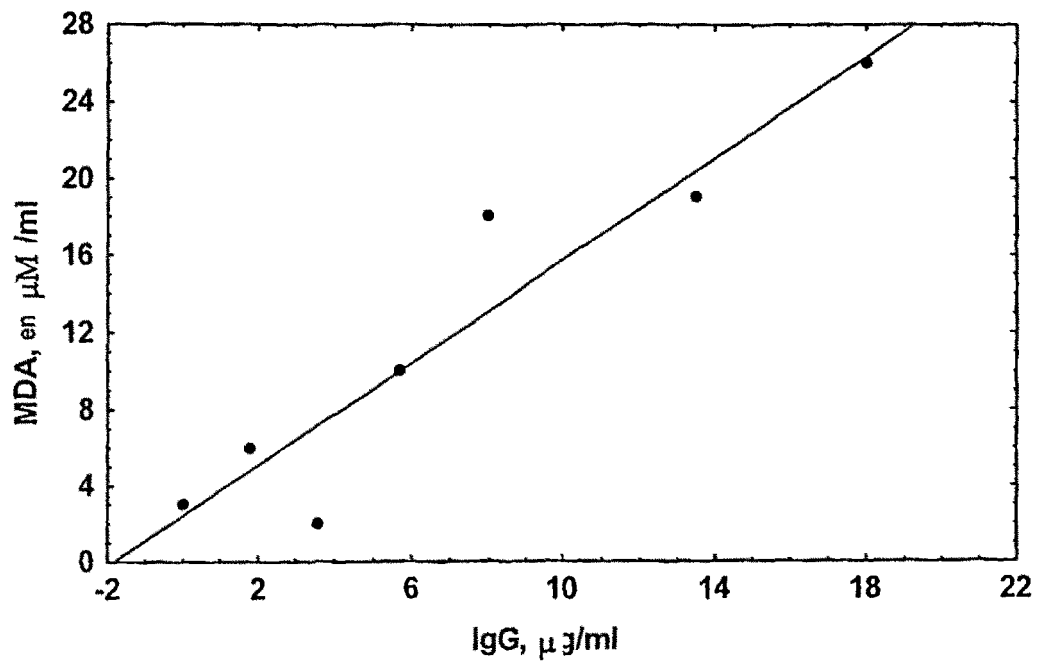


Figura 2

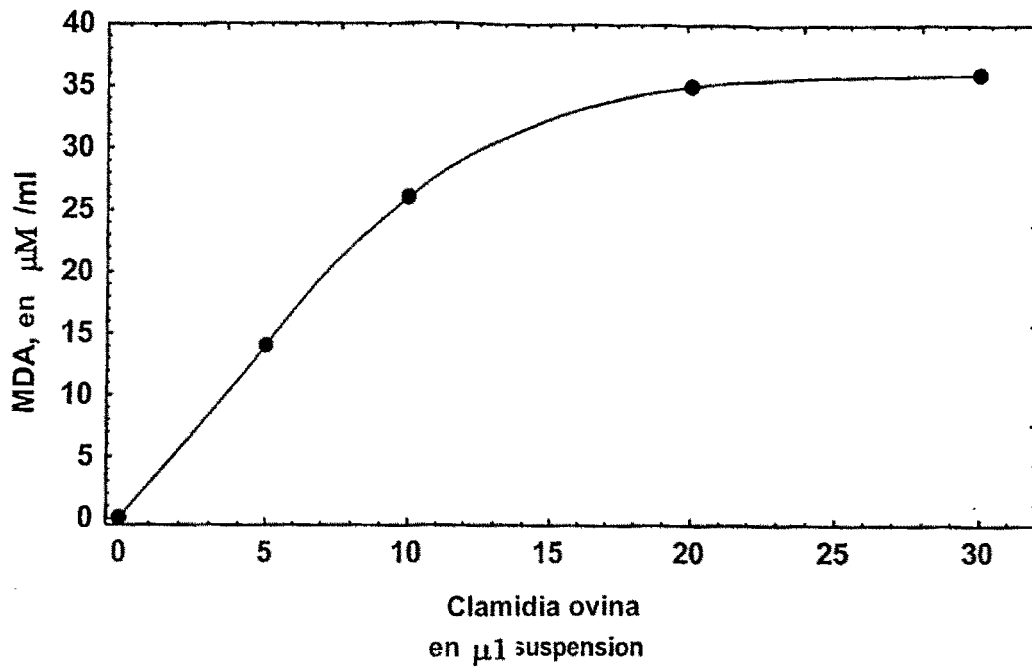


Figura 3

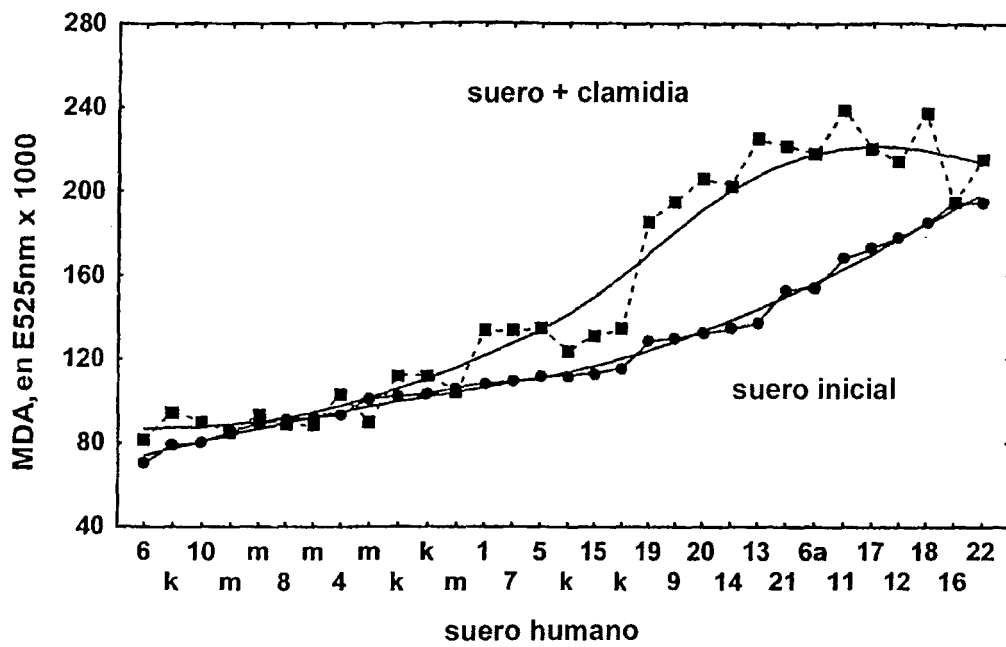


Figura 4

Estenosis Arterial Coronaria vs. Actividad Abzimas

$$\text{Actividad Abzimas} = 10,803 + 3,6418 * \text{Estenosis}$$

Correlación: $r = 0,47818$

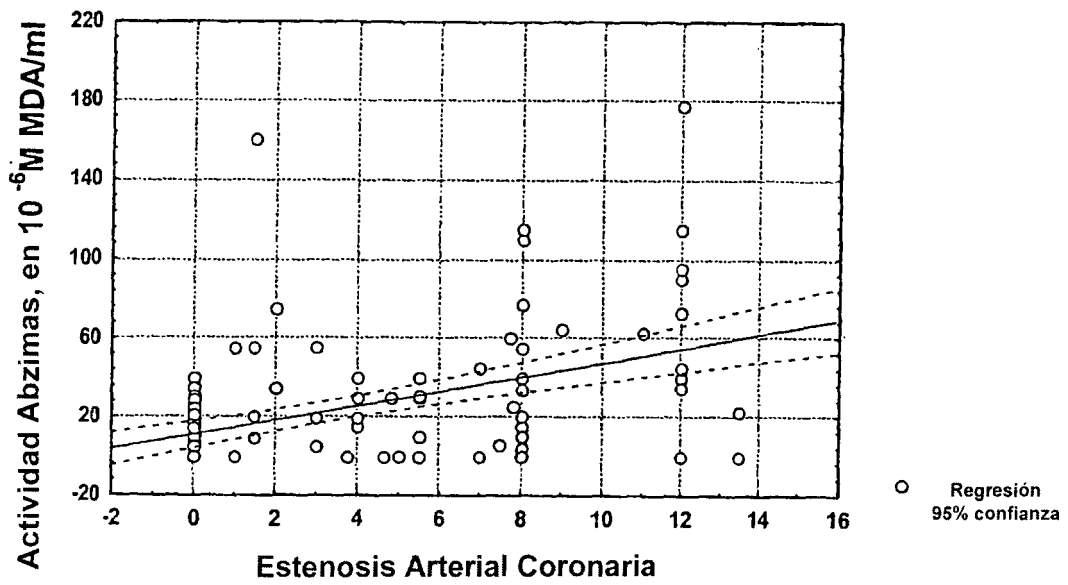


Figura 5

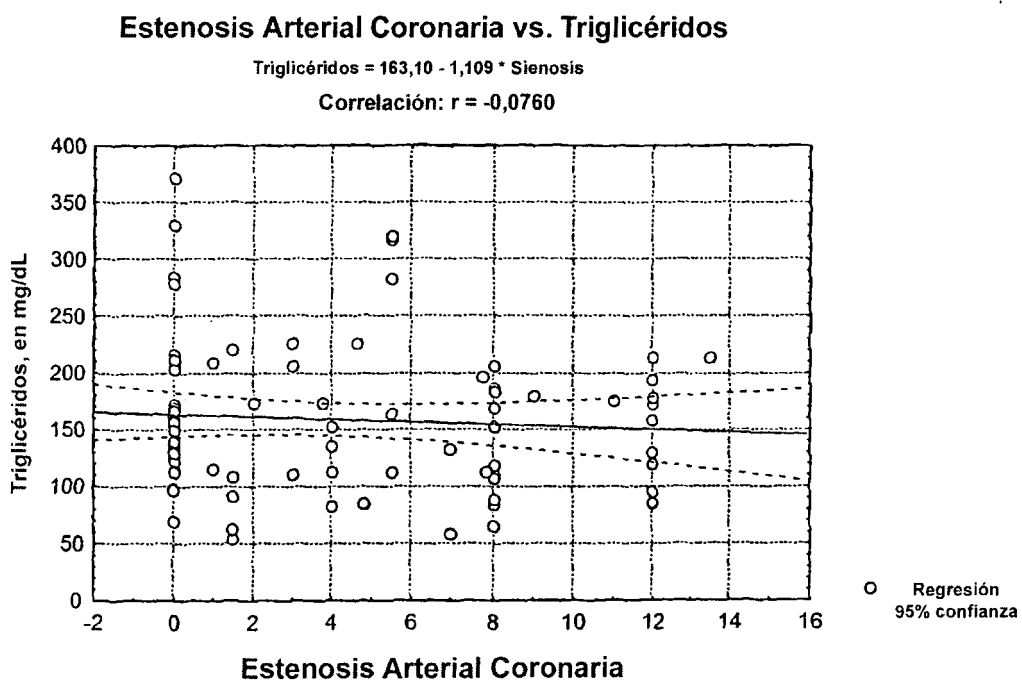


Figura 6

Estenosis Arterial Coronaria vs. Colesterol Total

$$\text{Colesterol Total} = 285,33 - 1,919 \cdot \text{Estenosis}$$

Correlación: $r = -0,0956$

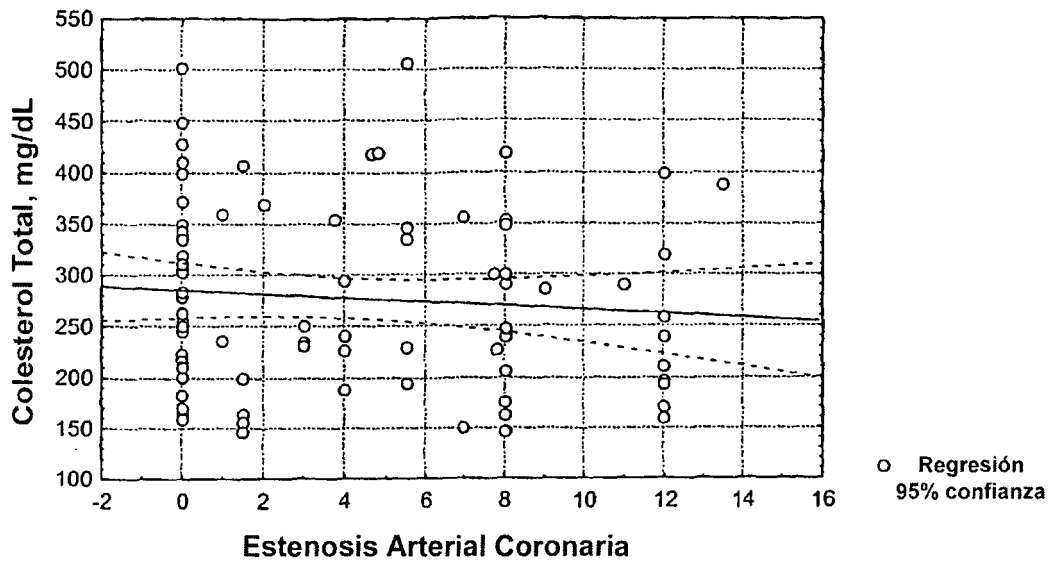
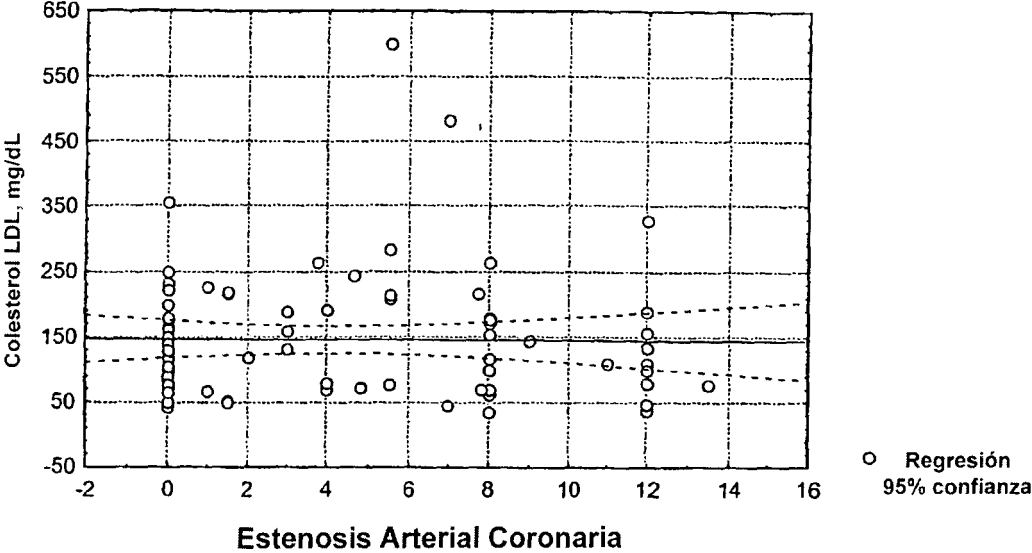


Figura 7

Estenosis Arterial Coronaria vs. Colesterol LDL

$Colesterol\ LDL = 146,62 - 0,1908 * Estenosis$

Correlación: $r = -0,089$



Estenosis Arterial Cerebral vs. Actividad Abzimas

$$\text{Actividad Abzimas} = 6,5794 + 4,2754 \cdot \text{Estenosis}$$

Correlación: $r = 0,55830$

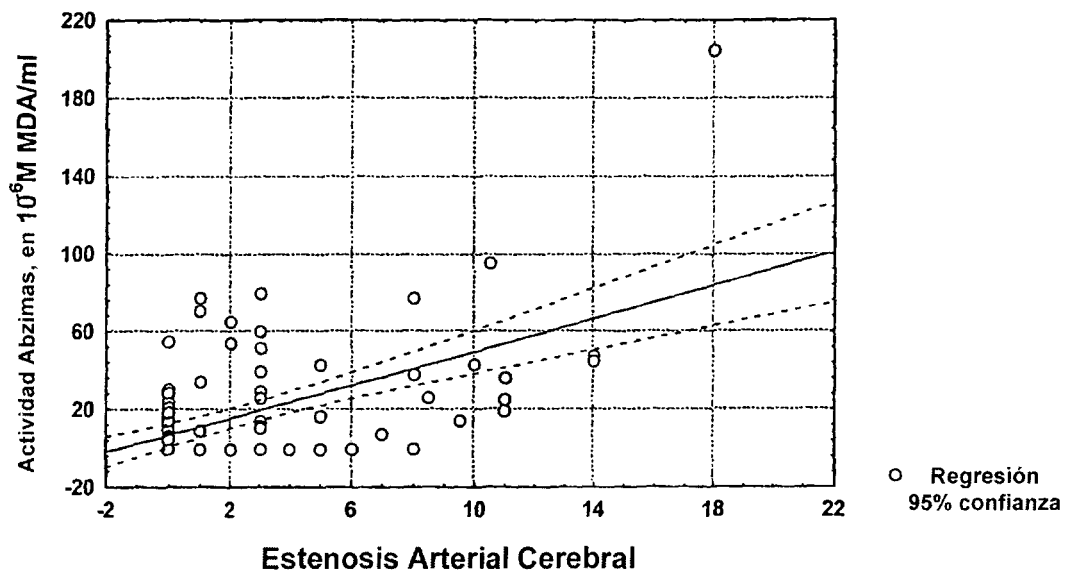


Figura 9

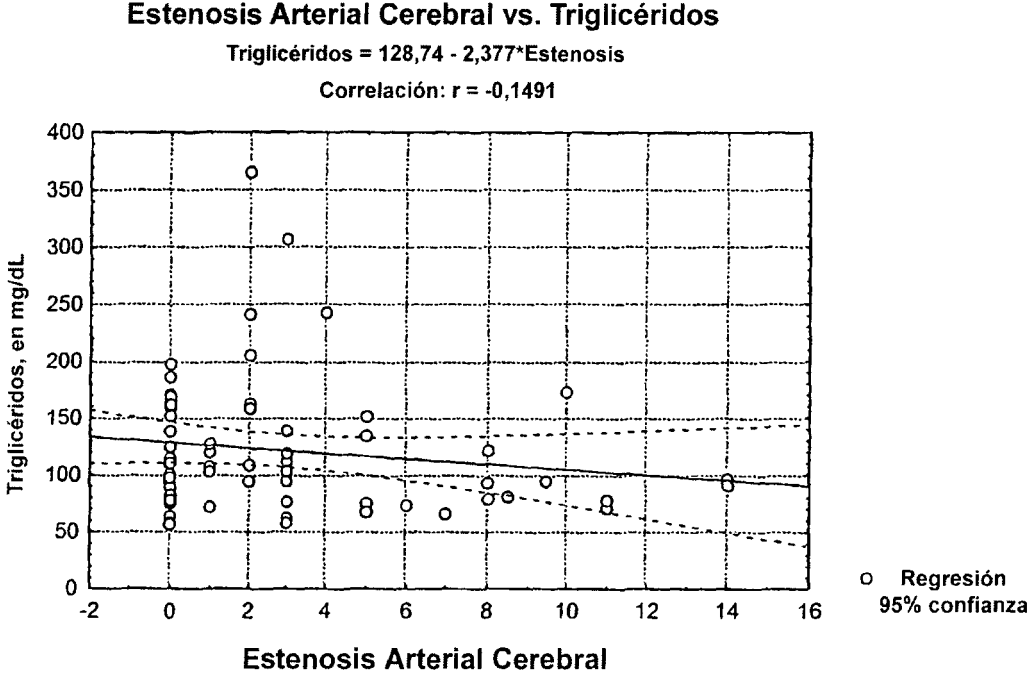


Figura 10

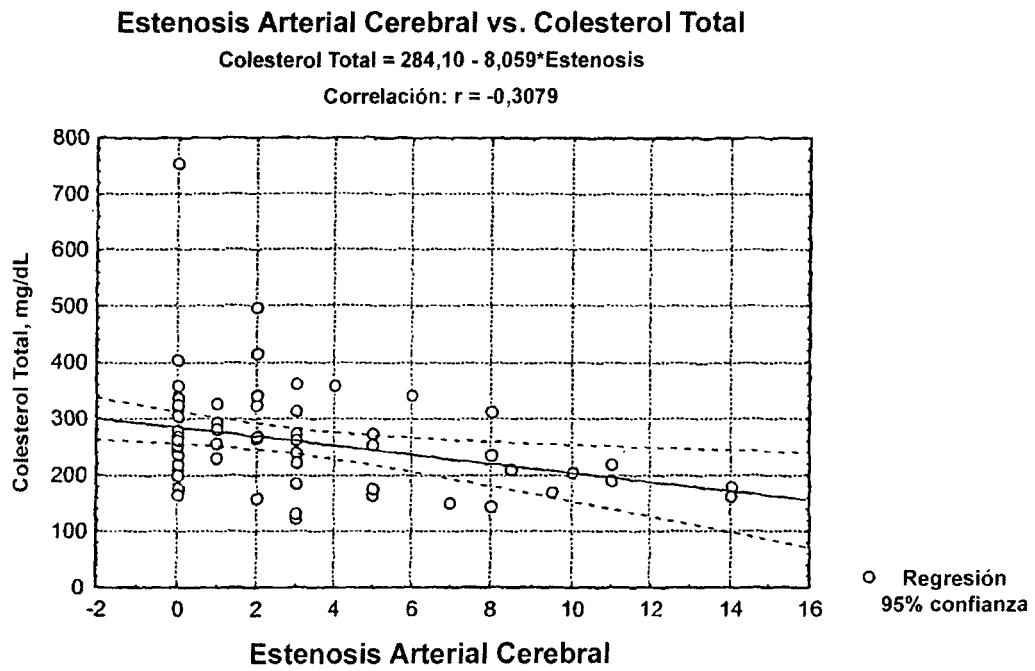


Figura 11

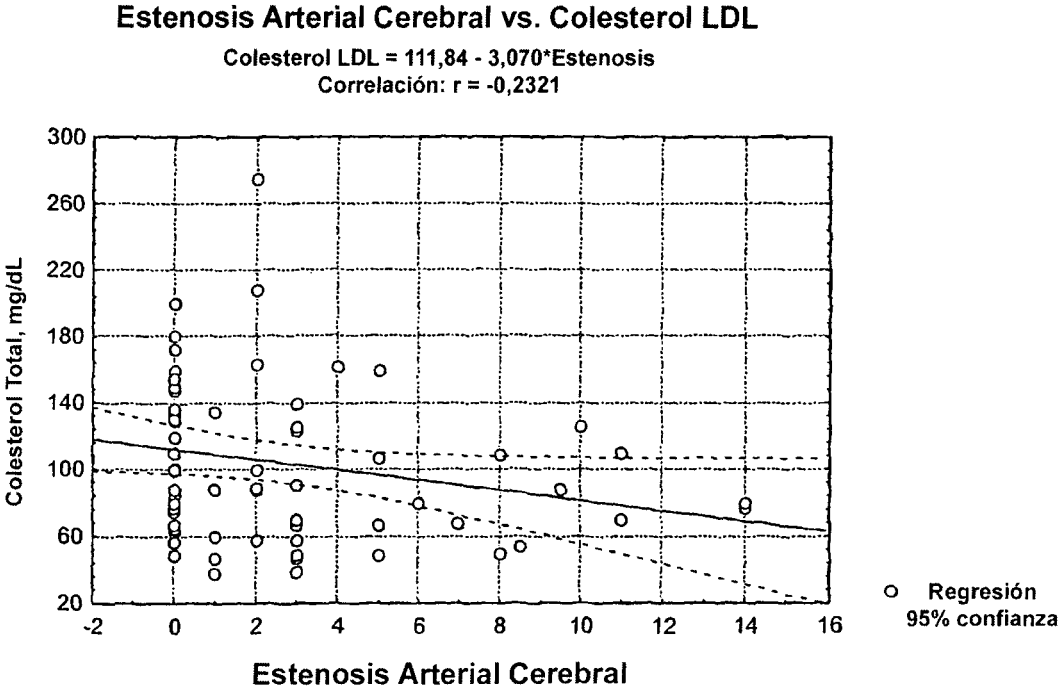


Figura 12

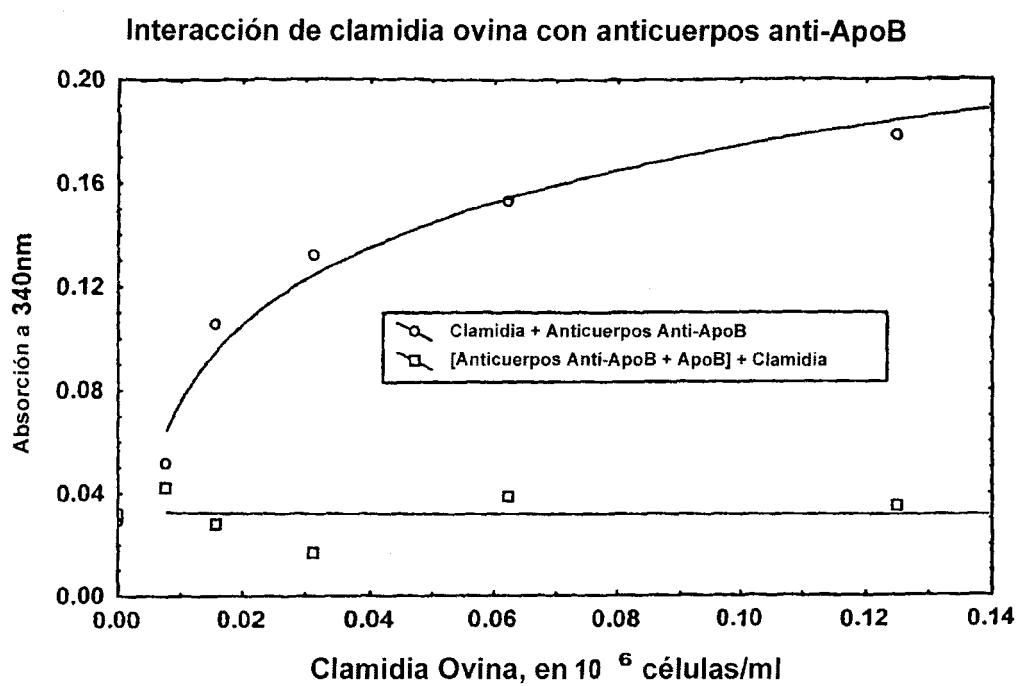


Figura 13