



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 978**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97947592 .8**
96 Fecha de presentación : **12.11.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0946196**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.1999**

54 Título: **Método para tratar la cicatrización de heridas de pacientes diabéticos.**

30 Prioridad: **22.11.1996 US 755235**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2010

73 Titular/es: **The Trustees of Columbia University in
the City of New York
Broadway and West 116th Street
New York, New York 10027-6699, US**

72 Inventor/es: **Stern, David, M. y
Schmidt, Ann, Marie**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Método para tratar la cicatrización de heridas de pacientes diabéticos.

5 Antecedentes de la invención

En toda esta aplicación, se hace referencia a varias publicaciones por el autor y la fecha. Las citaciones completas para estas publicaciones se pueden encontrar en una lista alfabéticamente al final de la especificación justo antes de las reivindicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones en su totalidad describen el estado de la técnica como lo conoce el experto en la materia.

La cicatrización ineficaz de heridas es un problema serio en diabetes, que contribuye a la morbilidad aumentada (Reynolds, 1985; Galloway y Shuman, 1963; y Pearl y Kanat, 1988). La respuesta reparadora en la cicatrización de heridas está orquestada por elementos celulares múltiples que trabajan juntos de muchas maneras, incluyendo infiltración de la lesión por células efectoras inflamatorias. Después de esto, los elementos fibroblásticos junto a las células efectoras inflamatorias proporcionan mecanismos antibacterianos y fomentan la eliminación de tejido necrótico, así como el depósito de tejido conjuntivo nuevo. Un trastorno fundamental del metabolismo de glucosa podría perturbar estos procesos protectores complejos e interactivos. Se ha sugerido en trabajos anteriores que la disfunción celular en la cicatrización diabética implica la función deficiente de neutrófilos (Bagdade *et al.*, 1978; Nolan *et al.*, 1978; y Mowat y Baum, 1971), infiltración retrasada de la herida con células inflamatorias (Greenhalgh *et al.*, 1990 y Fahey *et al.*, 1991), producción de colágeno disminuida (Goodson y Hunt, 1977 y Goodson y Hunt, 1986) y actividad disminuida de factores de crecimiento endógenos, tal como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (Giardino *et al.*, 1994), que podría proporcionar una base para una formación más lenta de tejido de granulación y cierre de la herida.

25 Compendio de la invención

La presente invención proporciona el uso de un agente para la producción de un medicamento para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto diabético, en donde el agente es un polipéptido que comprende los dos tercios extracelulares del receptor para productos finales de glucación avanzada.

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1. *Efecto de sRAGE en la cicatrización de heridas en el ratón genéticamente diabético db+/db+*. Se creó una herida de espesor total de 1,5 x 1,5 cm en los lomos de ratones db+/db+ o ratones control, heterocigotos db+/m+ y se cubrieron con TEGADERM®. Las heridas diabéticas se trataron con solución salina tamponada en fosfato (PBS) directamente bajo el TEGADERM® a diario durante 7 días empezando el día 3 después de la cirugía o con sRAGE (200 ng). El área de la herida se midió en la línea base hasta el día 21 colocando una cubierta de vidrio sobre el área de la herida, calcando el área de la herida y poniendo esta información en un ordenador para calcular el porcentaje de cierre de la herida como función del tiempo. El eje izquierdo representa el porcentaje de cierre de la herida.

Figura 2. *La administración de sRAGE al ratón genéticamente diabético db+/db+ mejora la cicatrización de heridas: estudios de respuesta a la dosis*. Se crearon las heridas como anteriormente y se trataron desde el día 3 hasta el 9 con sRAGE (bien 2.000, 200 ó 20 ng/día) o con solución salina tamponada con fosfato. En el día 10, se midió el área de la herida y se comparó con el área inicial de herida como anteriormente. Los resultados se presentan como las veces de incremento en el porcentaje de cicatrización comparado con los ratones tratados con solución salina tamponada con fosfato (definido como uno en la figura). Se muestran todos los análisis estadísticos comparando la cicatrización de la herida en presencia de diferentes dosis de sRAGE frente al tratamiento de heridas diabéticas con solución salina tamponada con fosfato.

Figuras 3A y 3B. *Epítomos inmunorreactivos de AGE en las heridas de ratones diabéticos (db+/db+)*. Se extirparon las heridas de espesor total de 1,5 x 1,5 cm creadas en los lomos de ratones diabéticos (ratones db+/db+; figura 3A) y ratones no diabéticos (db+/m+; figura 3B), se fijaron y las secciones se tiñeron con IgG anti-AGE purificada por afinidad. Aumento: 200X.

55 Descripción detallada de la invención

La presente especificación divulga un método para tratar síntomas de diabetes en un sujeto diabético que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de sRAGE a fin de tratar los síntomas de diabetes en el sujeto. Los síntomas pueden comprender cicatrización anormal de heridas, síntomas de infarto de miocardio, síntomas de ictus, síntomas de enfermedad vascular periférica, amputación, síntomas de enfermedad renal, insuficiencia renal, ceguera, neuropatía, inflamación o impotencia.

La presente especificación divulga un método para tratar síntomas de diabetes en un sujeto diabético que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la unión de productos finales de glucación avanzada a cualquier receptor para productos finales de glucación avanzada a fin de tratar los síntomas de diabetes en el sujeto. Según este método, el agente puede comprender un polipéptido, un peptidomimético, una molécula orgánica, un hidrato de carbono, un lípido, un anticuerpo o un ácido nucleico. Según este método, el poli-

péptido puede comprender un polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, un receptor para un polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, un receptor soluble para polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo. Según este método, el anticuerpo puede comprender un anticuerpo anti-RAGE o un fragmento F(ab')₂ anti-RAGE. Según este método, la cantidad terapéuticamente eficaz puede comprender una dosis desde alrededor de 200 ng/día/kg de peso corporal hasta alrededor de 200.000 ng/día/kg de peso corporal o desde alrededor de 50 ng/día/kg de peso corporal hasta alrededor de 500.000 ng/día/kg de peso corporal.

La presente especificación divulga un método para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto diabético que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la unión de productos finales de glucación avanzada a un receptor para productos finales de glucación avanzada, durante un periodo de tiempo suficiente en una cantidad suficiente a fin de mejorar la cicatrización de heridas en el sujeto.

Según este método, el agente puede comprender un polipéptido, un peptidomimético, una molécula orgánica, un hidrato de carbono, un lípido, un anticuerpo o un ácido nucleico. El polipéptido de esta invención puede comprender un polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, un receptor para un polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, un receptor soluble para polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo.

En una forma de realización de este método, la administración puede comprender la administración diaria desde alrededor del día de la herida hasta alrededor de diez días después de la herida. La presente invención proporciona que la cantidad suficiente comprende una dosis desde alrededor de 10 ng/día/kg de peso corporal hasta alrededor de 500.000 ng/día/kg de peso corporal o una dosis desde alrededor de 150 ng/día/kg de peso corporal hasta alrededor de 200.000 ng/día/kg de peso corporal.

La presente especificación divulga un método para tratar los síntomas de diabetes en un sujeto diabético que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, agente que inhibe la unión de productos finales de glucación avanzada a cualquier receptor para productos finales de glucación avanzada a fin de tratar los síntomas de la diabetes en el sujeto.

Según este método, el agente puede ser un polipéptido, un peptidomimético, una molécula orgánica, un hidrato de carbono, un lípido, un anticuerpo o un ácido nucleico. En el caso de polipéptidos, el polipéptido puede ser un polipéptido producto final de glucación avanzada (AGE) o una parte del mismo, un receptor para un polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, un receptor soluble para polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, por ejemplo RAGE soluble, o un polipéptido recombinante. El polipéptido se puede sintetizar químicamente o producir mediante métodos estándar de ADN recombinante. En el caso de anticuerpos, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-RAGE o un fragmento F(ab')₂ anti-RAGE.

Según este método, los síntomas que se pueden tratar incluyen cicatrización anormal de heridas, síntomas relacionados con tener un infarto de miocardio, tal como dolor de pecho, síntomas relacionados con tener un ictus, enfermedad vascular periférica, amputación, enfermedad renal, insuficiencia renal, ceguera, neuropatía, inflamación e impotencia.

El sujeto en el que se emplea el método de la invención puede ser cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, ratón, vaca, cerdo, perro, gato o mono.

La administración del agente se puede efectuar mediante inyección intralesional, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa; mediante infusión; o puede implicar distribución mediada por liposomas; o distribución tópica, nasal, oral, anal, ocular u ótica.

En la práctica del método la administración puede comprender la administración diaria, semanal, mensual o cada hora, estando sujeta la frecuencia precisa a diferentes variables tales como la edad y estado del sujeto, la cantidad a ser administrada, la vida media del agente en el sujeto, área del sujeto en la que se desea la administración y similares.

En relación con este método, una cantidad terapéuticamente eficaz puede incluir dosis que tengan en cuenta el tamaño y el peso del sujeto, la edad del sujeto, la gravedad del síntoma, el área de superficie de la herida, la eficacia del agente, el método de distribución del agente y la historia de síntomas del sujeto. El experto en la materia sería capaz fácilmente de determinar las dosis exactas y tiempos exactos de administración basados en tales factores. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser una dosis desde alrededor de 200 ng/día/kg de peso corporal hasta alrededor de 200.000 ng/día/kg de peso corporal. A este respecto, se ha mostrado que 24 microgramos administrados por vía intraperitoneal a diario (en los días 3-9) a un ratón diabético herido produjo una cicatrización de la herida muy mejorada. A este respecto, la dosis también se puede administrar como una dosis única o como una serie de dosis durante un periodo de tiempo.

La presente invención también proporciona el uso de un agente para la producción de un medicamento para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto diabético, en donde el agente es un polipéptido que comprende los dos tercios extracelulares del receptor para productos finales de la glucación avanzada.

La presente especificación divulga un método para aliviar la inflamación en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la unión de productos finales de glucación avanzada a cualquier receptor para productos finales de glucación avanzada a fin de tratar los síntomas de inflamación en el sujeto.

Según este método, el agente puede ser un polipéptido, un peptidomimético, una molécula orgánica, un hidrato de carbono, un lípido, un anticuerpo o un ácido nucleico. En el caso de polipéptidos, el polipéptido puede ser un polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, un receptor para un polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, un receptor soluble para polipéptido producto final de glucación avanzada o una parte del mismo, o un polipéptido recombinante. El polipéptido se puede sintetizar químicamente o producir mediante métodos estándar de ADN recombinante. En el caso de anticuerpos, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-RAGE o un fragmento F(ab')₂ anti-RAGE.

Puede haber otros mecanismos por los que RAGE soluble puede mejorar la cicatrización de heridas diabéticas. RAGE soluble puede tener otros efectos, tales como efectos antiinflamatorios que son, al menos en parte, independientes de unión a AGE e interfieren con su capacidad de activar RAGE celular.

La administración del agente se puede efectuar mediante inyección intralesional, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa; mediante infusión; mediante distribución mediada por liposomas o mediante distribución tópica, nasal, oral, anal, ocular u ótica.

En una forma de realización de la invención reivindicada, la administración puede incluir la administración a diario desde aproximadamente el día de la herida hasta aproximadamente diez después de la herida.

En otra forma de realización de la invención, la cantidad suficiente puede incluir una dosis desde alrededor de 200 ng/día/peso corporal del ratón hasta alrededor de 200.000 ng/día/peso corporal del ratón.

La presente especificación también divulga un método para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto diabético que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéutica de un agente a fin de mejorar la cicatrización de heridas en el sujeto. El mecanismo de mejorar la cicatrización de heridas puede ser bioquímico en naturaleza o competitivo en naturaleza.

Como se usa aquí "AGE" significa un producto final de glucación avanzada; "RAGE" significa un receptor para un producto final de glucación avanzada; "sRAGE" significa una forma soluble de un receptor para productos finales de glucación avanzada, tal como los dos tercios extracelulares del polipéptido RAGE.

En la práctica del uso de la invención una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que es capaz de inhibir la unión de AGE a cualquier receptor para un producto final de glucación avanzada. Según esto, la cantidad eficaz variará con el sujeto que se trata, así como la afección a ser tratada. Para los fines de esta invención, los métodos de administración deben incluir, pero no están limitados a, administración por vía cutánea, subcutánea, intravenosa, parenteral, oral, tópica o mediante aerosol.

Partes del agente de la invención pueden estar "marcadas" mediante asociación con una sustancia marcadora detectable (por ejemplo, radiomarcado con ¹²⁵I o biotinilado) para proporcionar reactivos útiles en la detección y cuantificación de tal agente o las células que expresan su receptor o sus derivados en muestras de tejido sólido y líquido tales como sangre, líquido cefalorraquídeo u orina.

La administración de compuestos y agentes farmacéuticos a sujetos para mejorar la cicatrización de heridas se conoce en la técnica porque la necesidad de mejorar los síntomas asociados con la diabetes ha sido una necesidad que se sentía desde hacía tiempo. Las siguientes publicaciones se incorporan aquí mediante referencia: patente de EE. UU. No. 5561116, Solid product containing propolis components, and preparation and uses thereof; patente de EE. UU. No. 4971954, Collagen-based matrices ribose cross-linked; patente de EE. UU. No. 5567417, Method for inhibiting angiogenesis using heparinase; patente de EE. UU. No. 5565428, Method of administration of IGF-1. Se divulga administrar factor de crecimiento insulínico de tipo I a un mamífero a fin de mantener su actividad biológica en el mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de IGF-I al mamífero durante un periodo de tiempo que estimula la respuesta máxima en el mamífero. La patente '428 también divulga la administración durante un periodo de tiempo y la administración repetida e interrupción de la administración durante un periodo tan largo como sea necesario para alcanzar o mantener la respuesta biológica deseada en el mamífero. De esta manera, el experto en la materia conoce métodos de administración de cantidades terapéuticas de un péptido o proteína. Patente de EE. UU. No. 5561137, Thio-heterocyclic macrolactam immunomodulators; patente de EE. UU. No. 5561110, Method for the treatment of the complications and pathology of diabetes; patente de EE. UU. No. 5547672, Accelerated wound healing; patente de EE. UU. No. 5532227, Tetracyclines including non-antimicrobial chemically-modified tetracyclines inhibit excessive glycosylation of different types of collagen and other proteins during diabetes; patente de EE. UU. No. 5527772 Regulation of cell proliferation and differentiation using peptides; patente de EE. UU. No. 5468737, Wound healing accelerated by systemic administration of polysaccharide from aloe; patente de EE. UU. No. 5395398, Microelectric apparatus for the antisepsis, promulgation of healing and analgesia of wound and chronic skin ulcers; patente de EE. UU. No. 5378475, Sustained release drug delivery devices; patente de EE. UU. No. 5246708, Methods for promoting wound healing with deoxyribonucleosides; patente de EE. UU. No. 5532227,

Tetracycline, including non-antimicrobial chemically-modified tetracycline inhibit excessive glycosylation of different types of collagen and other proteins during diabetes.

Woutier *et al.*, (1996) divulga el uso de sRAGE y anticuerpos bloqueantes anti-RAGE para reducir la permeabilidad vascular de ratas diabéticas mediante infusión intravenosa.

Cuando se administran, los compuestos con frecuencia se depuran rápidamente de la circulación y por lo tanto pueden dar lugar a una actividad farmacológica de relativamente corta duración. Por consiguiente, se pueden requerir inyecciones frecuentes de dosis relativamente grandes de compuestos bioactivos para mantener la eficacia terapéutica. Se sabe que los compuestos modificados mediante la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina muestran vidas medias sustancialmente más largas en sangre después de la inyección intravenosa que los compuestos correspondientes no modificados (Abuchowski *et al.*, 1981; Newmark *et al.*, 1982; y Katre *et al.*, 1987). Tales modificaciones también pueden aumentar la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminar la agregación, aumentar la estabilidad física y química del compuesto y reducir mucho la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. Como resultado, se puede alcanzar la actividad biológica *in vivo* deseada mediante la administración de tales aductos polímero-compuesto con menor frecuencia o en dosis menores que con el compuesto sin modificar.

La unión de polietilenglicol (PEG) a compuestos es particularmente útil porque el PEG tiene una toxicidad muy baja en mamíferos (Carpenter *et al.*, 1971). Por ejemplo, en los Estados Unidos se aprobó un aducto con PEG de adenosina desaminasa para su uso en seres humanos para el tratamiento del síndrome de inmunodeficiencia combinada grave. Una segunda ventaja proporcionada mediante la conjugación a PEG es la de reducir eficazmente la inmunogenicidad y antigenicidad de compuestos heterólogos. Por ejemplo, un aducto con PEG de una proteína humana podría ser útil para el tratamiento de una enfermedad en otra especie de mamífero sin el riesgo de desencadenar una respuesta inmune grave. El compuesto de la presente invención capaz de mejorar la cicatrización en un sujeto se puede administrar en un dispositivo de microencapsulación a fin de reducir o prevenir una respuesta inmune del huésped contra el compuesto o contra las células que pueden producir el compuesto. El compuesto de la presente invención también se puede administrar microencapsulado en una membrana, tal como un liposoma.

Los polímeros tal como PEG se pueden unir convenientemente a uno o más residuos reactivos de aminoácidos en una proteína tal como al grupo alfa-amino del aminoácido amino terminal, los grupos épsilon amino de las cadenas laterales de lisina, los grupos sulfhidrilo de las cadenas laterales de cisteína, los grupos carboxilo de las cadenas laterales de aspartilo y glutamilo, el grupo alfa-carboxilo del aminoácido carboxi-terminal, cadenas laterales de tirosina, o a derivados activados de cadenas de glucosilo unidas a ciertos residuos de asparragina, serina o treonina.

Se han descrito numerosas formas activadas de PEG adecuadas para la reacción directa con proteínas. Los reactivos útiles de PEG para la reacción con grupos amino de proteínas incluyen ésteres activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato, particularmente aquellos en los que los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenceno-4-sulfonato. Los derivados de PEG que contienen grupos maleimido o haloacetilo son reactivos útiles para la modificación de grupos sulfhidrilo libres de proteínas. Asimismo, los reactivos de PEG que contienen grupos amino hidracina o hidracida son útiles para la reacción con aldehídos generados mediante oxidación con peryodato de grupos hidratos de carbono en proteínas.

La especificación también divulga un kit que comprende una cantidad terapéutica de un agente, agente que es capaz de inhibir la unión de productos finales de glucación avanzada a un receptor para productos finales de glucación avanzada, durante un periodo de tiempo suficiente en una cantidad suficiente a fin de tratar los síntomas crónicos de la diabetes en un sujeto. Un kit puede incluir una composición que incluye sRAGE o una parte del mismo en una forma que previamente se ha regulado en dosis y regulado en tiempo de modo que un sujeto pueda tomar fácilmente el agente terapéutico en casa o lejos de un marco clínico.

Esta invención se ilustra en la sección de detalles experimentales que sigue. Estas secciones se exponen para ayudar a la comprensión de la invención pero no se pretende, y no se debe interpretar, que limiten en modo alguno la invención como se expone en las reivindicaciones que siguen posteriormente.

Detalles experimentales

Ejemplo 1

Cicatrización de heridas mejorada en ratones diabéticos mediante tratamiento con el receptor soluble para productos finales de glucación avanzada (sRAGE)

La cicatrización deficiente de heridas en diabetes continúa siendo una causa importante de morbilidad en el periodo posoperatorio, después de traumatismo y en la reparación de lesiones cutáneas. Los productos finales de glucación (AGE) son el resultado de glucación/oxidación no enzimática de proteínas/lípidos. La formación acelerada y acumulación de los AGE en tejidos de pacientes con diabetes se ha asociado, en ciertas situaciones, al desarrollo de complicaciones secundarias. Un medio importante por el que los AGE perturban los procesos homeostáticos es mediante su interacción con sitios celulares de unión; el mejor caracterizado de estos es el receptor para AGE o RAGE,

una molécula de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresada por el endotelio, monocitos y células de músculo liso, así como células mesangiales y neuronas. El acoplamiento con AGE de RAGE produce la activación endotelial, con expresión de moléculas de adhesión, propiedades procoagulantes aumentadas y función de barrera disminuida; y la perturbación de monocitos, con cambios en la motilidad y activación celular, que produce la expresión de citoquinas proinflamatorias. La interacción de los AGE con células que expresan RAGE, especialmente endotelio y fagocitos mononucleares, puede fomentar la activación celular crónica, previniendo de esta manera la cicatrización óptima de heridas como se refleja mediante la formación de tejido de granulación y tejido conjuntivo nuevo. Los datos aquí son consistentes con este concepto: usando un modelo de herida por segunda intención en ratones diabéticos, el cierre de la herida aumenta después de la administración de RAGE soluble(s), el dominio extracelular del receptor. Estos experimentos contribuyen a un fin a largo plazo y una necesidad sentida desde hace mucho tiempo, la comprensión de la contribución de las interacciones celulares de los AGE en la patogénesis de complicaciones diabéticas.

La mala cicatrización de heridas en diabetes probablemente sea una manifestación de un defecto básico en la respuesta inflamatoria-reparadora del huésped, además de una posible insuficiencia vascular subyacente. La exposición de macromoléculas a azúcares aldosa produce una glucación y oxidación no enzimática (Baynes, 1991; Sell y Monnier, 1989; Ruderman *et al.*, 1992; y Vlassara *et al.*, 1994), que forma inicialmente los aductos de glucación temprana reversible, bases de Schiff y productos de Amadori. Después de reorganizaciones moleculares complejas adicionales, se dan los AGE irreversibles. Los últimos comprenden un grupo heterogéneo de estructuras caracterizadas mediante fluorescencia, propensión a formar entrecruzamientos, generación de intermedios de oxígeno reactivo (ROI) e interacción con receptores celulares, el mejor caracterizado de los cuales es el receptor para AGE o RAGE (Schmidt *et al.*, 1992; Neeper *et al.*, 1992; y Schmidt *et al.*, 1994a). Los AGE acumulados en los tejidos en la diabetes tienen influencia en la función del órgano diana por dos mecanismos generales: directamente, a través de efectos en la arquitectura del tejido, consiguiendo a la formación de entrecruzamientos y atrapando proteínas del plasma, e indirectamente, mediante interacción con elementos celulares, tal como células endoteliales (CE), fagocitos mononucleares (FM), centrales para la homeostasis así como la respuesta del huésped a estímulos patofisiológicos relevantes.

Hay estudios que sugieren que los dos tercios extracelulares de la molécula, soluble o sRAGE, parecen ser capaces de inhibir la interacción de los AGE circulantes con superficies celulares (Schmidt *et al.*, 1994b). Por ejemplo, la unión de albúmina AGE radiomarcada, un ligando prototipo desarrollado en el laboratorio, a células endoteliales cultivadas o fagocitos mononucleares derivados de sangre periférica, se inhibió en presencia de dosis crecientes de sRAGE. In vivo, la depuración de albúmina AGE radiomarcada de la circulación de un ratón normal después de inyección intravenosa se retrasó tras el tratamiento con sRAGE. Se intentó la extrapolación de estos descubrimientos al marco de la cicatrización de heridas. El fin en estos estudios era evaluar el papel de la interacción AGE-RAGE en el marco de la respuesta del huésped a la herida.

Para evaluar la contribución de la interacción AGE-RAGE a la cicatrización deficiente de heridas en diabetes, se comparó la respuesta de cicatrización en animales diabéticos con animales normales, y para determinar si el bloqueo de RAGE mejoraría el cierre de la herida en diabetes. En estos estudios, se encontró que la administración de RAGE soluble mejoró la cicatrización de heridas en ratones genéticamente diabéticos. Estos datos apoyan la hipótesis de que el bloqueo de RAGE puede representar una diana posible para la intervención en cicatrización de heridas diabéticas así como otras complicaciones de la diabetes, tales como enfermedades renales, retinales, neurológicas, cardiovasculares, cerebrovasculares y vasculares periféricas. Los sujetos diabéticos experimentan restenosis aumentada y problemas locales después de angioplastia lo que sugiere que RAGE soluble puede ser beneficioso para reducir la restenosis después de lesión por globo/stent.

55 **Materiales y métodos**

Modelo murino de diabetes. Se empleó un modelo genético de diabetes resistente a insulina/hiperglucémica (ratones db+/db+) debido a un rasgo autosómico recesivo (cromosoma 4) que produce anomalías del metabolismo de glucosa y obesidad en ratones homocigotos. Los ratones heterocigotos (db+/m+) no desarrollan estas anomalías y se emplean como controles (Coleman, 1982 y Wyse y Dulin, 1970). Los animales diabéticos son hiperglucémicos (glucosa > 400 mg/dl a la edad de 3 meses) y desarrollan anomalías similares a las complicaciones humanas, incluyendo reparación deficiente de heridas. La esperanza de vida de los ratones homocigotos es de 6-8 meses. Los estudios con heridas empezaron cuando los ratones alcanzaron las 8 semanas de edad, ya que los AGE están presentes para ese tiempo.

Modelo de cicatrización de heridas. Para el análisis de la cicatrización de heridas en diabetes se empleó un modelo de herida por segunda intención (Greenhalgh *et al.*, 1990), ya que estimula, en parte, la situación clínica que sigue a la rotura de la piel en un área ulcerada. Se creó una herida de espesor total de 1,5 x 1,5 cm en el lomo del ratón que posteriormente se cubrió con TEGADERM (cierre plástico, transparente). El área inicial de la herida se midió colocando una cubierta de vidrio estéril sobre el área y calcando los extremos de la herida. El área se determinó luego usando un programa informático (NIH Image 157). Se hicieron medidas en serie de las dimensiones de la herida en los días 3, 5, 7, 10, 14 y 17. Estos datos, consistentes con los de estudios previos (Greenhalgh *et al.*, 1990), mostraron un retraso significativo de la reparación de heridas en el ratón diabético especialmente en las primeras 2-3 semanas después de creación de la herida. Se sacrificaron los animales en cada grupo el día 17 para análisis. Los estudios empezaron cuando los ratones alcanzaron las 8-10 semanas de edad. En ciertos experimentos, los ratones se trataron con RAGE soluble (los dos tercios extracelulares de la molécula) bajo en TEGADERM en los días 3 hasta el 9 después de procedimiento inicial de la herida.

Inmunohistoquímica para la detección de productos finales de glucación avanzada. Al tiempo del procedimiento de la herida, se extirparon las heridas de 1,5 x 1,5 cm, se fijaron en formalina (al 10%) y después se procesaron para inmunohistoquímica usando IgG anti-AGE purificada por afinidad (Miyata *et al.*, 1996).

5 Resultados

Para entender el papel de RAGE en la cicatrización de heridas diabéticas, se crearon heridas de 1,5 x 1,5 cm en los lomos de ratones db+/db+ ó db+/m+. Primero se determinó que no había diferencias estadísticamente significativas en el área original de la herida entre los grupos de ratones que recibieron las distintas pautas de tratamiento. Cuando se administró sRAGE (200 ng/día) bajo el TEGADERM a diario desde el día 3 hasta el 9, la cicatrización observada en los ratones diabéticos aumentó significativamente comparados con los ratones diabéticos tratados con vehículo (solución salina tamponada con fosfato; $p < 0,05$; figura 1). Además, la cicatrización observada en ratones diabéticos tratados con sRAGE se aproximó a la observada en ratones control db+/m+ tratados con vehículo (las diferencias no eran estadísticamente significativas) (Figura 1).

Consistente con la hipótesis de que estos descubrimientos eran debidos a mecanismos mediados por receptor, los estudios de respuesta a la dosis revelaron que no había aumento de la cicatrización de heridas diabéticas diabética tras la administración de sRAGE, 2.000 ng/día, comparado con la dosis diaria de 200 ng/día (las diferencias no eran significativas; figura 2). Sin embargo, consistente con los estudios descritos aquí en ratones diabéticos, el tratamiento con 200 ó 2.000 ng/día de sRAGE (administrado en los días del 3 hasta el 9) era significativamente superior al tratamiento de estos ratones con solución salina tamponada con fosfato cuando se midió el área final de la herida en el día diez después de la creación de la herida (figura 2). Sin embargo, a una dosis diaria de sRAGE de 20 ng/día, no había diferencia significativa en la cicatrización de la herida en los ratones diabéticos que recibían sRAGE frente a aquellos ratones diabéticos que recibían vehículo (figura 2).

Para determinar si las heridas diabéticas estaban enriquecidas en material inmunorreactivo a AGE, se realizó inmunohistoquímica de heridas de ratones diabéticos frente a controles usando IgG anti-AGE purificada por afinidad. Estos estudios demostraron que había un aumento significativo en el material reactivo a AGE en el tejido de herida de los ratones diabéticos (figura 3A) comparados con los animales controles no diabéticos (figura 3B).

30 Discusión

Los resultados de estos estudios indican que en tejido diabético tal como heridas, hay deposición/formación aumentada de AGE. Tales AGE, tras la interacción con su receptor celular RAGE, generan un ambiente inflamatorio sostenido en el que la cicatrización y la quiescencia de las potentes células efectoras y mediadoras están marcadamente retrasadas. Se ha hipotetizado que la interferencia con la interacción AGE-RAGE podría producir cicatrización acelerada. En estos estudios, se demostró que la administración local de RAGE soluble mejoró la cicatrización de heridas diabéticas en una manera dependiente de la dosis. Los mecanismos específicos que subyacen a la eficacia de la administración de sRAGE son importantes. Es posible que la administración de sRAGE mejore uno cualquiera de un número de pasos importantes en la cicatrización fisiológica de heridas tales como inflamación, angiogénesis y/o formación y deposición de tejido granular nuevo, específicamente colágeno.

En conjunto, estos datos sugieren que un ambiente enriquecido en AGE tal como el observado en diabetes, la interferencia con la interacción AGE-RAGE celular podría producir mejora de las complicaciones crónicas de la diabetes. Dado que RAGE se expresa en el endotelio y el músculo liso de la vasculatura, en células mesangiales, en ciertas células neurales y vasculares de la retina y en ciertas neuronas tanto del sistema nervioso central como del periférico así como en otras células, es probable que el bloqueo de RAGE celular pudiera producir una mejora de las complicaciones diabéticas que de otra manera podrían producir infartos de miocardio, ictus, enfermedad vascular periférica, amputación de las extremidades, enfermedad/insuficiencia renal, ceguera, impotencia y neuropatía. RAGE se encuentra en monocitos y macrófagos y puede estar presente en otros tipos celulares en donde también puede ser posible la intervención terapéutica. Los estudios presentes apoyan el concepto de que la administración de sRAGE (u otras formas de bloqueo de RAGE; tales como sRAGE recombinante, péptidos basados en RAGE, IgG anti-RAGE o $F(ab')_2$ anti-RAGE) podrían presentar una forma nueva de intervención terapéutica en esta enfermedad crónica, debilitante.

55 Referencias

- Bagdade, J. *et al.* (1978)** Impaired granulocyte adherence. A reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 27:677-681.
- Baynes, J. (1991)** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405-412.
- Coleman, D. (1982)** Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes* 31 (Supl.):1-6.
- Fahey, T. *et al.* (1991)** Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *Surg. Res.* 50:308-313.
- Galloway, J. y Shuman, D. (1963)** Diabetes and Surgery. *Am. J. Med.* 34:177-191.

Giardino, I. et al. (1994) Nonenzymatic glycosylation *in vitro* and in bovine endothelial cells after basic fibroblast growth factor activity. *J. Clin. Invest.* 94:110-117.

Goodson, W. y Hunt T. (1977) Studies of wound healing in experimental diabetes mellitus. *J. Surg. Res.* 22:221-227.

Goodson, W. y Hunt T. (1986) Wound collagen accumulation in obese hyperglycemic mice. *Diabetes* 35:491-495.

Greenhalgh, D. et al. (1990) PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am. J. Pathol.* 136:1235-1246.

Mowat, A. y Baum, J. (1971) Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *NEJM* 284:621-627.

Neeper, M. et al. (1992) Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for AGEs. *J. Biol. Chem.* 267:14998-15004.

Nolan, C. et al. (1978) Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 27:889-894.

Pearl, S. y Kanat, I. (1988) Diabetes and healing: a review of the literature. *J. Foot Surg.* 27:268-273.

Reynolds, C. (1985) Management of the diabetic surgical patient. A systematic but flexible plan is the key. *Postgrad. Med.* 77:265-279.

Ruderman, N. et al. (1992) Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J.* 6:2905-2914.

Schmidt, A-M et al. (1994a) Cellular receptors for AGEs. *Arterioscler. Thromb.* 14:1521-1528.

Schmidt, A-M et al. (1994b) RAGE has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to AGEs. *PNAS, USA* 91:8807-8811.

Schmidt, A-M et al. (1992) Isolation and characterization of binding proteins for AGEs from lung tissue which are present on the endothelial surface. *J. Biol. Chem.* 267:14987-14997.

Sell, D. y Monnier, V. (1989) Structure elucidation of senescence cross-link from human extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 264:21597-21602.

Vlassara, H. et al. (1994) Pathogenic effects of AGEs: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab. Invest.* 70:138-151.

Wyse, B. y Dulin, W. (1970) The influence of age and dietary conditions on diabetes in the Db mouse. *Diabetologia* 6:268-273.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente para la producción de un medicamento para mejorar la cicatrización de heridas en un sujeto diabético, en donde el agente es un polipéptido que comprende los dos tercios extracelulares del receptor para el producto final de la glucación avanzada.

2. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento se administra a través de inyección intralesional, intraperitoneal, intramuscular o intravenosa; infusión; distribución mediada por liposomas; o distribución tópica, nasal, oral, anal, ocular u ótica.

3. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento se administra a diario.

4. El uso de la reivindicación 1, en donde el agente se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

5. El uso de la reivindicación 4, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es desde 10 ng/día/kg de peso corporal hasta 500.000 ng/día/kg de peso corporal.

6. El uso de la reivindicación 5, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es desde 200 ng/día/kg de peso corporal hasta 200.000 ng/día/kg de peso corporal.

7. El uso de la reivindicación 6, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz es desde 150 ng/día/kg de peso corporal hasta 200.000 ng/día/kg de peso corporal.

8. El uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento se administra a diario desde el día de la herida hasta diez días después de la herida.

FIGURA 1

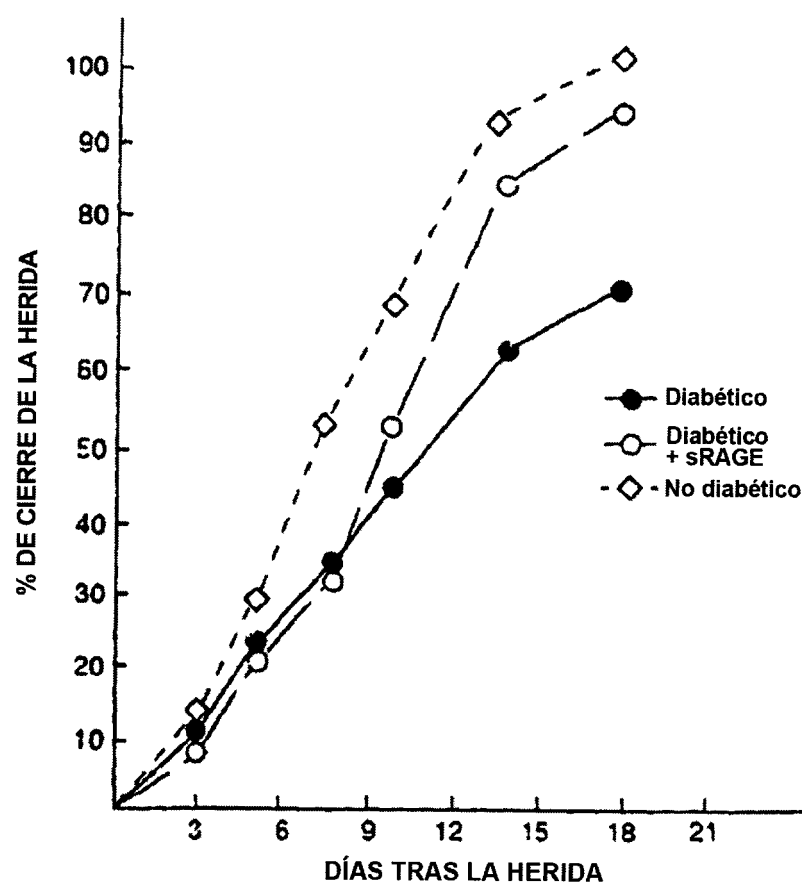


FIGURA 2

