



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 136 618**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **92907214 .8**
86 Fecha de presentación : **30.03.1992**
87 Número de publicación de la solicitud: **0585242**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.03.1994**

54 Título: **Curación de heridas.**

30 Prioridad: **28.03.1991 GB 9106678**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.12.1999**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **16.10.2007**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **16.10.2007**

73 Titular/es: **Renovo Limited**
Manchester Incubator Building
48 Grafton Street
Manchester M13 9XX, GB

72 Inventor/es: **Ferguson, Mark, W.J.;**
Foreman, David M. y
Shah, Mamta

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 136 618 T5

ES 2 136 618 T5

DESCRIPCIÓN

Curación de heridas.

5 La presente invención concierne a la curación de heridas, así como a unos agentes y unas técnicas para facilitar la reparación y la curación de tejido animal, en particular, pero no de manera exclusiva, de la piel o de otros tejidos epiteliales que han resultado dañados por ejemplo por heridas resultantes de lesiones después de un accidente, operación quirúrgica u otro traumatismo. La invención concierne en particular a la curación de heridas en el ser humano y en otros vertebrados.

10 Como es bien conocido, la curación de heridas en tejidos tales como la piel implica generalmente, al menos en el ser humano adulto y en otros mamíferos, un proceso de biosíntesis de una matriz extracelular (ECM), una reconstitución y una organización que dan lugar generalmente a la producción de cicatrices bajo la forma de tejido conjuntivo fibrótico y a una pérdida que resulta de las funciones del tejido normal.

15 En el dominio quirúrgico, la formación y la contracción de los tejidos cicatrizadores representan un problema clínico principal para el cual no existen en el momento actual soluciones completamente satisfactorias. Del mismo modo, la cicatrización y la formación de un tejido fibrótico después de quemaduras accidentales o de otras lesiones o traumatismos en particular en los niños tienen a menudo consecuencias graves, dando lugar a una alteración de la función, a un crecimiento futuro defectuoso y a unos efectos antiestéticos y de nuevo un problema destacado.

20 En lo que concierne a los efectos antiestéticos debido a las cicatrices, una necesidad conectada a un tratamiento o a unas operaciones estéticas para intentar eliminar estas desfiguraciones con el fin de mejorar la apariencia se manifiesta igualmente de manera general. Además, una necesidad similar asociada a un tratamiento cosmético sobreviene en el contexto de tatuajes no deseados y de otro tipo de pieles deterioradas. Sin embargo, en el momento actual, es difícil, casi imposible, proceder a un tal tratamiento o a tales operaciones estéticas de manera satisfactoria, dado que la cirugía interviene en general para una cierta parte, esta siendo ella misma susceptible de dar lugar a unas heridas generando un tejido cicatrizador fresco antiestético.

30 En el ser humano adulto y en otros mamíferos vertebrados, la curación de heridas en tejidos tales como el tejido cutáneo es generalmente un proceso reparador, contrariamente a un proceso de tipo regenerativo que parece ocurrir en la curación del tejido fetal y del tejido embrionario. La iniciación de un proceso de reparación de heridas muestra estar sometido a la influencia de un cierto número de factores diferentes, incluyendo a la vez parámetros intrínsecos, por ejemplo la oxigenación del tejido, como parámetros extrínsecos, por ejemplo los apósitos utilizados para las heridas. Sin embargo, se dispone de pruebas suficientes que indican que el proceso global de la curación y de la reparación de tejidos deteriorados por heridas, incluyendo la comunicación intercelular necesaria, está regulada de una manera coordinada en los seres humanos adultos y en otros mamíferos por un cierto número de factores de crecimiento solubles específicos que son liberados en el entorno de la herida (en particular mediante plaquetas teniendo un efecto de degranulación y mediante nuevos macrófagos) y que, entre otros, muestran inducir una neovascularización, una quimiotaxia de los leucocitos, una proliferación de los fibroblastos, una migración y un depósito de colágeno y de otras moléculas de matriz extracelular en el interior de las heridas. Unos factores tales de crecimiento, que se han podido identificar y aislar, son unas proteínas o unos polipéptidos solubles generalmente especializados e incluyen el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, etc.), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento I y II análogos a la insulina (IGFI e IGFI), así como unos factores de crecimiento fibroblásticos de tipo ácido y básico (FGF ácido y FGF básico). Un gran número de estos factores de crecimiento han sido ya obtenidos por ingeniería genética utilizando la tecnología del ADN recombinante.

50 Conceptos generales acerca de estos factores de crecimiento se hallan descritos en unos artículos de Mary H McGrath en *Clinics in Plastic Surgery*, volumen 17, número 3, julio 1990, páginas 421-432, y de George A Ksander en *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 1989, capítulo 24 (publicado por Academia Press, Inc.).

55 Publicaciones citadas en referencia a los artículos 54 (3) y 54 (4) Convenio de Patente Europea son WO 91/04748, WO 91/10727 y WO 92/13553.

60 En el documento WO 91/04748, se describe la inhibición del TGF- β (incluyendo tanto los miembros fibróticos como los no fibróticos de la familia) para impedir la acumulación de la matriz extracelular, es decir para impedir la cicatrización. Sin embargo, no se detallan unas composiciones anticicatrizantes comprendiendo unos agentes que inhiben unos factores de crecimiento únicamente fibrótico.

65 El documento WO 91/10727 concierne a la inhibición de factores de regulación de las células, incluyendo "los cinco TGF- β ". Ninguna propiedad particular (promoción o inhibición de la cicatrización) es atribuida a cualquier TGF- β .

El documento WO 92/13553 concierne a la administración de moduladores de la curación de heridas para el tratamiento de una disfunción de la curación de una herida. Los moduladores utilizados dan lugar a una inflamación de los tejidos en el lugar de inhibir la cicatrización.

ES 2 136 618 T5

El hecho de haber admitido la importancia del papel de tales factores de crecimiento en el campo de la curación de las heridas se ha traducido en un gran número de propuestas para su utilización y para su aplicación clínica a título de agentes exógenos destinados a los factores de crecimiento en unos tratamientos pensados para acelerar y favorecer la curación de las heridas, en particular en el caso de estados deficientes de curación de heridas (ver por ejemplo Sporn y colaboradores, *Science* (1983) 219, 1329-1331; Brown y colaboradores, *J. Exp. Med.* (1986) 163, 1319-1324; Mustoe y colaboradores, *Science* (1987) 237, 1319-1324) y ha constituido el incitante principal para intentar de poner a punto unas aplicaciones terapéuticas de los conocimientos adquiridos concerniendo estos factores de crecimiento.

Conforme a la presente invención, se aporta el uso de una cantidad eficaz, inhibidora de la actividad, de un agente que neutraliza el factor de crecimiento, específico únicamente contra PDGF, en la fabricación de un medicamento para ser empleado en el tratamiento de heridas para inhibir la formación de tejidos cicatrizadores durante la curación.

Se piensa por ejemplo que la familia de factores de crecimiento TGF- β juega un papel de regulación particularmente importante en la reparación de las heridas, en particular en animales adultos a título de estimulante de infiltración de los macrófagos, de la migración de los fibroblastos y de la síntesis de la matriz extracelular, en particular del depósito y síntesis de colágeno vía unos fibroblastos que están implicados en la producción de tejidos cicatrizadores. Otros factores de crecimiento, por ejemplo PDGF, son igualmente importantes en este proceso y, hasta un cierto punto, son considerados como actuando en cooperación mutua en el proceso complejo de regulación global que interviene en la curación de heridas. De hecho en la solicitud PCT/US90/05566, se describe la utilización general de anticuerpos dirigidos contra las TGF- β para reducir la fibrosis en un modelo de riñón de rata, inducido mediante nefrosia renal. Sin embargo, se sabe ahora que todos los factores de crecimiento TGF- β no son de tipo fibrótico y que el hecho de suprimir la actividad del TGF-3 en particular es contraproducente.

En la solicitud PCT/US90/05566, se menciona el hecho que el TGF- β 1 y el TGF- β 2 tienen como función aumentar la producción de la matriz extracelular, pero no se sugiere el hecho que cualquier TGF particular no tenga tal efecto.

De acuerdo con la invención, el agente que neutraliza el factor de crecimiento puede ser un anticuerpo que neutraliza el factor de crecimiento, por ejemplo unos anticuerpos dirigidos contra PDGF.

El agente que neutraliza el factor de crecimiento puede ser utilizado conjuntamente con un soporte farmacéuticamente aceptable. El soporte farmacéuticamente aceptable puede comprender una crema, un gel o un polvo estéril neutro con unos fines de aplicación local o aún una solución estéril con unos fines de inyección, de irrigación o de inhalación o aún un aerosol o bien puede comprender un apósito estéril para recubrir localmente una herida, por ejemplo un polímero biodegradable/absorbible o bien puede presentarse bajo la forma de un comprimido o de una cápsula con unos fines de administración por vía enteral o bien el soporte puede comprender un emplastro de biopolímero/polímero o un dispositivo de liberación lenta susceptible de implantación.

El agente inhibidor o la mezcla de agentes inhibidores utilizados para esta finalidad comprende un anticuerpo o unos anticuerpos de neutralización específicos para PDGF o para unos precursores de tales factores de crecimiento. De manera ventajosa, un tal anticuerpo o cada uno de los citados anticuerpos es un anticuerpo monoclonal obtenido vía unas técnicas del ADN recombinante. Sin embargo, se puede utilizar igualmente como variante, de manera totalmente satisfactoria, como ya ha sido el caso en lo destacado de las búsquedas experimentales preliminares, unos anticuerpos policlonales purificados por ejemplo mediante cromatografía por afinidad a partir de un antiserum preparado mediante inyección de uno o varios factores de crecimiento pertinentes en un huésped apropiado. Si se desea, se pueden utilizar igualmente, en lugar de anticuerpos completos, unos fragmentos de estos últimos (Fab) que conservan las características específicas de enlace con el antígeno y unos fragmentos de este tipo están destinados a entrar en el ámbito del término "anticuerpos" tal como se utiliza aquí en la presente especificación.

En lo que concierne a los precursores de estos factores de crecimiento, es conocido que, en un buen número de casos, los factores de crecimiento están presentes en un primer tiempo en estado inactivo bajo la forma de una parte de una molécula proteínica más grande o bajo la forma de un ligando enlazado a esta última y que están separados por ejemplo por la acción enzimática, en el momento de su liberación bajo su forma activa. El enlace de un agente de neutralización tal como un anticuerpo con precursores proteínicos inactivos de este tipo puede, como consecuencia, impedir o inhibir la acción proteolítica y la liberación de factores de crecimiento activos, lo que dará lugar a un efecto de neutralización global y a una inhibición de la actividad de la misma manera que el proceso alternativo consistente en conectar directamente un agente inhibidor a las propias moléculas activas del factor de crecimiento o a emplazamientos receptores celulares de tales factores de crecimiento.

En lugar de utilizar unos anticuerpos que neutraliza el o los factores de crecimiento, el agente inhibidor o la mezcla de agentes inhibidores puede estar constituida por uno o varios péptidos sintéticos que pueden tener un efecto antagonista o de bloqueo sobre la actividad del factor de crecimiento, por ejemplo bloqueando el enlace del o de los factores de crecimiento a los emplazamientos receptores celulares sin iniciar un respuesta cualquiera intracelular del "segundo mensajero". Tales agentes peptídicos de "bloqueo" podrían revelarse ventajosos en el sentido que están exentos de efectos inmunógenos nefastos potenciales y que pueden pasar a través de las barreras membranas más fácilmente que los anticuerpos, de manera que serían muy apropiados para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas destinadas a una aplicación local. Estos péptidos de "bloqueo" pueden ser concebidos fácilmente a partir del conocimiento que se dispone relativo a la secuencia de aminoácidos de factores de crecimiento implicados y concerniendo a la proporción de esta secuencia que está implicada en el enlace a los receptores celulares, dado que

ES 2 136 618 T5

estos péptidos deberán “imitar” esta porción de enlace de la secuencia. Aunque no forma parte de la invención, es conocido por ejemplo, que en el caso del TGF- β 1, es la región de la extremidad C-terminal de la molécula la que está implicada en el enlace al receptor. Del mismo modo, la o las regiones implicadas en el enlace del receptor a TGF- α representan la región situada entre cys 33 y cys 42; para el enlace al EGF, son las regiones situadas entre cys 20 y cys 31, entre tirosina 14 y cys 31, y entre leucina 15 y arginina 53, las que están implicadas. Para los FGF, la región crítica del enlace al receptor es aquella situada entre los amino ácidos 105 y 115.

A título de posibilidad suplementaria, el agente o los agentes inhibidores que neutralizan el o los factores de crecimiento pueden estar constituidos por otras entidades moleculares que actúan enlazándose directamente a uno o varios factores de crecimiento o a uno o varios de sus precursores para inactivarlos.

Aunque la utilización de un anticuerpo o de otro agente poseyendo un efecto de neutralización solamente respecto a PDGF pueda revelarse totalmente suficiente para impedir cualquier cantidad importante de producción de tejido cicatrizador, en algunos casos, una administración combinada de dos o más anticuerpos diferentes u otros agentes inhibidores poseyendo un efecto de neutralización frente a dos factores de crecimiento diferentes o más implicados puede revelarse aún más eficaz, en particular para heridas bajo la forma de excisiones relativamente importantes, por ejemplo. En este caso, los diferentes agentes inhibidores o los otros agentes inhibidores pueden ser administrados tanto separadamente como de manera simultánea o secuencial o bien pueden ser transformados en una mezcla o en un “cocktail” en una única formulación farmacéutica.

Aunque se considera que una serie de estos factores de crecimiento, incluyendo al menos los de la familia TGF- β y el PDGF, actúan normalmente en cooperación mutua de manera orquestada para regular el proceso global de curación de las heridas, e incluso las etapas que dan lugar a la producción de tejido cicatrizador, el efecto sobre la producción de tejido cicatrizador de la actividad de reducción o de neutralización de cualquier factor de crecimiento parece variar en función de la naturaleza o de la identidad de este factor de crecimiento y en función de la forma del perfil resultante del factor de crecimiento activo. Así, aunque la inhibición de la actividad de PDGF pueda generalmente ser muy eficaz en este caso, una inhibición de la actividad de ciertos otros factores de crecimiento puede, al menos en sí, ser menos eficaz en unas condiciones similares para la reducción de la formación del tejido cicatrizador, incluso si estos otros factores de crecimiento siguen siendo eventualmente necesarios o pueden tener un efecto benéfico en el sentido de favorecer la curación de las heridas.

Consecuentemente, una posibilidad suplementaria de puesta en funcionamiento de la invención puede residir en el hecho de utilizar un agente o unos agentes inhibidores o de neutralización eficaces para reducir la actividad de PDGF, jugando un papel destacado en la formación del tejido cicatrizador en combinación con un agente o un factor de crecimiento exógeno diferente que no favorece de manera independiente la formación de tejido cicatrizador en un grado cualquiera significativo, pero que al mismo tiempo puede favorecer de manera independiente la curación de la herida o procurar un efecto benéfico en lo relativo a la calidad de la curación. Al menos en ciertos casos, otros factores de crecimiento exógenos suplementarios de este tipo a utilizar en combinación con uno o unos agentes de neutralización de PDGF por ejemplo pueden ser administrados por unos factores de crecimiento fibroblásticos (FCF). Así, procurando una preparación farmacéutica poseyendo un rendimiento de los FDG conteniendo unos citoquinas activos al agente o a los agentes que neutralizan PDGF, se puede obtener una preparación que no sólo impide la cicatrización de una herida, sino que acelera igualmente el proceso global de curación de la herida.

Se podría emitir la hipótesis que cualquier tratamiento destinado a reducir o a impedir la formación de tejido cicatrizador manifiesta su eficacia máxima cuando se aplica en un estado relativamente tardío de la curación a lo largo de la fase de remodelado o de reorganización de tejido que ocurre después de la formación del tejido de granulación que reemplaza la fibrina producida en un primer momento a lo largo de las primeras fases de la curación. Sin embargo, contrariamente a esta expectativa, se revela de manera sorprendente que aplicando la presente invención, el tratamiento en el cual se utiliza el agente o los agentes que neutralizan el o los factores de crecimiento deberá eventualmente realizarse en una fase precoz de la curación para ser eficaz. En general, el tratamiento se implementa mejor antes y/o a lo largo de la fase de granulación, mientras que la fibrina está aún presente, es decir antes de que la fibrina haya sido reemplazada completamente por el tejido de granulación. Se tratará habitualmente de un período correspondiente a alrededor de 14 días después de la aparición inicial de una herida. Sin embargo, preferentemente, se iniciará el tratamiento más pronto dentro de los 7 días o, cuando sea posible en un lapso de tiempo de 3 días o menos después de la aparición de la herida. De hecho, a menudo puede resultar lo más ventajoso comenzar el tratamiento el día correspondiente a la aparición de la herida o al menos el día siguiente y, en el caso de heridas quirúrgicas, la iniciación de este tratamiento, por ejemplo mediante la aplicación por vía local o por vía parenteral del agente o de los agentes que neutraliza el o los factores de crecimiento en una formulación farmacéutica aplicada sobre la zona herida, puede muy bien integrarse en la operación quirúrgica de la que formará parte integral y será aplicada antes de que la operación finalice o inmediatamente después del fin de la operación principal o aún antes o después la suturación.

Se ha encontrado igualmente, de nuevo de manera algo sorprendente, que el tratamiento no debe necesariamente ser repetitivo y ser continuado a lo largo de todas las fases de la curación de la herida. Para ser eficaz, a menudo puede ser suficiente administrar el agente o los agentes que neutralizan el o los factores de crecimiento en una posología apropiada una sola vez o solamente algunas veces como máximo a lo largo de las primeras fases de la curación de la herida. Este aspecto se entiende de particular importancia en el caso en que los agentes implicados son unas proteínas que pueden tener tendencia a provocar unas reacciones inmunológicas; además, se obtienen igualmente otras ventajas prácticas y económicas.

ES 2 136 618 T5

Aunque sea posible, en ciertos casos, que el período de tiempo total para obtener la curación completa de una herida resulte prolongado ligeramente cuando se aplica este tratamiento, cualquier aumento de tiempo de curación global resultará compensado de manera más que adecuada por la calidad mejorada de la herida curada. Sin embargo, una característica notable y aún otra vez sorprendente del trabajo experimental realizado hasta ahora reside en el hecho que no se observa ningún aumento realmente significativo del tiempo de curación global, ni un incremento de la resistencia de la herida después de la curación. En efecto, en lo que concierne a este último punto, se constatará que la resistencia de la herida es incluso susceptible de ser mejorada por el hecho que la orientación observada de las nuevas fibrillas o de las nuevas fibras de colágeno que se han formado a lo largo de la curación, al menos en el caso de heridas dérmicas debidas a una incisión, las cuales se parecen más estrechamente a las de un tejido sano en el cual son generalmente paralelas a la superficie externa de la piel en lugar de formar un ángulo importante o de ser generalmente perpendiculares a la superficie externa, como se puede observar normalmente cuando las heridas de este tipo se curan normalmente con formación de un tejido cicatrizador.

A título de descripción y de explicación de base ulterior de la invención, se presentan seguidamente unos ejemplos dados con fines de ilustración de un cierto número de ensayos realizados, así como de los resultados obtenidos a lo largo de la puesta a punto de la invención, a partir de los cuales el experto en este campo estará en condiciones de comprender su naturaleza y de poner la invención en práctica.

En primer lugar, seguidamente se detallan en forma breve o resumida los procesos y las técnicas que se han utilizado en general, excepto indicaciones ulteriores en sentido contrario, en las búsquedas y en los ejemplos dados con fines de ilustración a los cuales se hace referencia.

El trabajo experimental preliminar realizado a lo largo de estas búsquedas ha sido realizado utilizando unos ratones a título de animales experimentales modelos, pudiendo sin embargo aplicarse los resultados en general al ser humano y a otros animales.

Se anestesian unos ratones machos adultos de origen Sprague-Dawley, pesando entre 200 y 250 gramos por inhalación de halotano/óxido nitroso/oxígeno. Después de haber pinzado la piel, se practican cuatro incisiones lineales sobre todo el espesor de una longitud de 10 mm sobre la piel dorsal del animal en posición equidistante respecto a la línea mediana y en posición adyacente a sus cuatro patas.

En cada animal, se deja una herida tal cual (testigo), se inyecta en una herida un anticuerpo no pertinente (testigo ficticio), se inyecta en una herida (el testigo positivo) un factor de crecimiento detallado anteriormente y se inyecta en una herida (la herida experimental) una preparación de uno o de varios anticuerpos apropiados que neutraliza el o los factores de crecimiento. Se procede a las experiencias sobre estos animales repartidos en grupos y, en función del grupo implicado, se procede a unas inyecciones cotidianas (100 μ l respectivamente), ya sea durante un período de 3 días consecutivos, ya durante un período de 7 días consecutivos empezando, el día correspondiente a la aparición de la herida, o el día siguiente, o, en algunos grupos, en una fase muy tardía, por ejemplo 7 días o 19 días después de la aparición de la herida.

En cada grupo, se sacrifican habitualmente al menos dos animales (por sobredosis de cloroformo) en los días 7, 14, 28 y 42 posteriores a la aparición de la herida y, en ciertos casos igualmente, en los días 70, 112 y 168 ulteriores a la aparición de la herida. Se les provoca cuatro heridas por escisión dejando un margen de 0,5 cm a cada lado, inmediatamente después de la muerte de cada animal y se les somete a un análisis tisular vía unas técnicas convencionales de tipo inmunohistoquímico, de coloración histológica y de tipo bioquímico.

En general, para la puesta en práctica de este análisis, se corta cada herida en dos para obtener dos muestras, que son o bien congeladas o bien fijadas y tratadas con fines de coloración inmunocitoquímica utilizando unos anticuerpos dirigidos contra los colágenos I, III, IV, contra la lámina y contra la fibronectina, o procesados para examen histológico de rutina utilizando una variedad de tejidos conjuntivos de diverso origen o se liofilizan inmediatamente con fines de análisis bioquímicos después de la disección en el microscopio.

En los análisis inmunohistoquímicos, se utilizan unos anticuerpos primarios y secundarios para la inmunocoloreación indirecta, como se indica en las tablas siguientes.

ES 2 136 618 T5

TABLA 1

Anticuerpos primarios

Dirigidos contra	Huésped	Fuente	Disolución	Ac.secundaria (ver tabla.2)
Fibronectina humana	Cordero	<u>a</u>	1:100	1
Laminina de ratón	Conejo	<u>b</u>	1:50	2
Colágeno de tipo I de rata	Conejo	<u>b</u>	1:50	2
Colágeno de tipo III de rata	Conejo	<u>b</u>	1:50	2
Colágeno de tipo IV de rata	Conejo	<u>b</u>	1:100	2
Macrófagos de rata	Ratón	<u>a</u>	1:200	3 y 4
Monocitos y macrófagos de rata	Ratón	<u>a</u>	1:200	3 y 4
Factor humano VIII	Conejo	<u>c</u>	1:200	2

TABLA 2

Anticuerpos secundarios

Dirigidos contra	Huésped	Fuente	Disolución	Ver tabla 1
IgG de cordero	Asno	<u>a</u>	1:40	1
IgG de conejo	Cerdo	<u>c</u>	1:40	2
IgG de ratón	Cordero	<u>d</u>	1:200	3
Streptavidina		<u>d</u>	1:100	4

Significación de los códigos de fuente:

a SEROTEC LTD; Oxford, Reino Unido.

b Instituto Pasteur de Lyon, Francia

c DAKOPATTS, Copenhague, Dinamarca

d AMERSHAM, INTERNATIONAL Plc, Amersham, Reino Unido

Nota: Los anticuerpos secundarios 1, 2 y 4 han sido conjugados con FITC (marcados con isotiocinato de fluoresceína) para la medida y la detección mediante inmunofluorescencia; 3 ha sido biotilino.

ES 2 136 618 T5

Durante la puesta en práctica de la inmunocoloración indirecta, se incuba el anticuerpo primario durante 1 hora, después se enjuaga tres veces en una solución salina tamponada con fosfato (PBS). La incubación con unos antiserum secundarios conjugados con FITC tiene lugar durante 1 hora y está seguida de tres enjuagamientos suplementarios con PBS. La inmunocoloración para macrófagos y para monocitos implica la técnica utilizando la biotina-estreptavidina, es decir, que después de la incubación primaria y el enjuagamiento, se incuban las secciones con IgG anti-ratón de oveja biotinilada durante 1 hora, se enjuaga tres veces con PBS, se incuban con estreptavidina de fluoresceína durante 20 minutos y se lava finalmente tres veces con PBS. Se montan las secciones en un medio de no-coloración, DARCO (1,4-diazo-biciclo-(2,2,2)-octano) y se fotografía utilizando un microscopio Dialuz de Leitz y una película Ektachrome de 400 ASA de Kodak.

Para cada anticuerpo primario y para cada herida, se coloran unas secciones testigos reemplazando el anticuerpo primario por PBS.

Durante la puesta en práctica de la coloración histológica de rutina, se estudia la estructura celular de las heridas mediante coloración de secciones tisulares sometidas a una criogenización (fijadas anteriormente en líquido de Bouin) con la hematoxilina de hemato de Harris y eosino, y se evoluciona el depósito de colágeno en las heridas mediante coloración de secciones sometidas a una criogenización con unos colorantes tricrómicos de Masson y con la modificación de Hughesdon de los colorantes tricrómicos de Mallory.

Para los análisis bioquímicos, se extraen muestras de las heridas mediante disección en el microscopio conjuntamente con un trozo de piel dorsal exenta de herida para cada herida y se las somete inmediatamente a una liofilización hasta que se obtiene un peso constante. Se homogeneiza el tejido en 1 ml de clorhidrato de guanidina 1 M, acetato de sodio 0,15 M, EDTA 0,01 M, pH 5,8, durante 24 horas a 4°C para extraer los glicosaminoglicanos. Se centrifuga el producto de homogeneización a 18.000 g durante 1 hora. Se lava la pastilla dos veces con 0,5 ml de agua y se añaden los productos de lavado al producto sobrenadante. Se dializa el producto perdurante contra un tampón de fosfato 100 mM con EDTA 5 mM, pH 6,5, después se pone a digerir con papaína a razón de 2,5 mg/ml. Se precipitan los glicosaminoglicanos con CPC de 2% y se separan utilizando el proceso de Cappelletti y colaboradores, 1979.

Después del lavado, se ponen las pastillas a digerir con la pepsina a razón de 100 µg/ml en el ácido acético 0,5 M a 4°C durante 24 horas. Seguidamente, se centrifuga a 18.000 g durante 1 hora. Se somete la pastilla así obtenida a un ensayo con hidroxiprolina, del modo descrito por Stegman y Stadler (1987); se utiliza igualmente una cierta cantidad de producto sobrenadante para este ensayo. A fin de medir el rendimiento de los colágenos de tipos I/III, se somete el producto sobrenadante a una electroporesis sobre gel de poliacrilamida con laurilsulfato de sodio utilizando el proceso de Sykes y colaboradores (1976).

Los factores de crecimiento utilizados en estas experiencias son unos reactivos disponibles en el mercado obtenibles de R & D Systems (Minneapolis, U.S.A) o dirigiéndose a British Biotechnology (Reino Unido) o también dirigiéndose a Serotec (Reino Unido) e incluyen:

1. El factor de crecimiento beta-1 (TGF-β1) transformante derivado de plaquetas de cerdos - dosis 10 ng/inyección.
2. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) proviniendo de plaquetas de cerdos - dosis 10 ng/inyección.
3. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) derivado de glándulas salivarias de ratones - dosis 10 ng/inyección.
4. El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) derivado de cerebros vacunos - dosis 10 ng/inyección.
5. El factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF) derivado de cerebros vacunos - dosis de 10 ng/inyección.

Los anticuerpos que neutralizan los factores de crecimiento utilizados en estos experimentos han sido igualmente unos reactivos disponibles en el mercado (ver los detalles seguidamente) y su potencia de neutralización es conocida. Incluyen:

1. El anticuerpo que neutraliza los TGF beta (activado en los conejos contra el TGF-β1 no desnaturalizados de plaquetas porcinas - neutraliza a la vez el TGF-β1 y el TGF-β2) - dosis 50 µg/inyección.
2. El anticuerpo que neutraliza el PDGF (activado en las cabras contra el PDGF humano no desnaturalizado) - dosis 20 µg/inyección.
3. El anticuerpo que neutraliza el EGF (anticuerpo policlonal enderezado en los ratones contra el EF humano) - dosis 10 µg/inyección.
4. El anticuerpo que neutraliza el FGF básico (activado en los conejos contra el FGF básico no desnaturalizado de cerebro vacuno) - dosis 30 µg/inyección.

5. El anticuerpo que neutraliza el FGF ácido (enderezando en los conejos contra el FGF ácido no desnaturado de cerebro vacuno) - dosis 30 μg /inyección.

Los anticuerpos no pertinentes utilizados para las heridas testigo ficticias son ya, sea el IgG del conejo, ya el IgG de cabra en función de huésped en el cual se activa el anticuerpo de neutralización dirigido contra el factor de crecimiento. La dosis del anticuerpo no pertinente es similar a la del anticuerpo de neutralización.

Resumen de los resultados

En todos los experimentos realizados, no se ha detectado ninguna diferencia entre las heridas testigo y las heridas testigo ficticias en uno cualquiera de los momentos en los que se han examinado las heridas, lo que indica la ausencia de todo efecto destacado producido por la introducción de proteínas extrañas. Igualmente, ninguna herida manifiesta problemas de curación y la rapidez de epitelización es similar en todos los tratamientos.

Sin embargo, al menos en el caso de las heridas experimentales tratadas con los anticuerpos de neutralización dirigidos contra PDGF, se obtienen unos efectos más destacados a condición de iniciar el tratamiento cuando las heridas son aún recientes, preferentemente en el momento correspondiente a la aparición de la herida o poco tiempo después, antes o durante la fase de granulación. Así, aunque no se observe ninguna diferencia destacada entre las heridas testigos y las heridas experimentales cuando no se inicia el tratamiento antes del 19º día ulterior a la aparición de la herida, en otros casos, en particular cuando se inicia el tratamiento el día correspondiente a la aparición de la herida o el día siguiente, las heridas experimentales contienen mucho menos colágeno I y colágeno III comparados con otras tres heridas en cualquier animal y en cualquier momento. Se constata una separación mucho más grande entre las fibrillas de colágeno, pero su orientación es prácticamente idéntica a la de una piel normal. En efecto, en las heridas tratadas con anticuerpos de neutralización, es a menudo difícil detectar el emplazamiento de la herida (excepto en el caso de pérdida de los folículos pilosos extodérmicos). Esto se opone claramente a otras heridas que manifiestan una cicatriz distinta comportando unas fibrillas de colágeno orientadas en vertical, paralelas y muy compactas. Estos efectos son más destacados en el dermo papilar y en los tejidos sub-cutáneos. Las heridas tratadas con los anticuerpos de neutralización dirigidas contra PDGF manifiestan igualmente una reducción acusada del contenido en fibronectina, en particular en el dermo reticular con un modelo de orientación similar al de las fibrillas de colágeno. Aunque la coloración de la fibronectina manifiesta una reducción acusada a través de toda la herida, queda siempre muy clara a la unión dermo/epidermo. El tratamiento con unos anticuerpos de neutralización contra PDGF disminuye igualmente el número de vasos sanguíneos, unos monocitos y unos macrófagos en la herida en curso de curación. En cambio, las heridas testigo positivas tratadas con PDGF manifiestan un aumento destacado de la acumulación de la matriz extracelular, de la densidad de tasa de la matriz extracelular y del número de vasos sanguíneos, de monocitos y de macrófagos. La cicatrización es más destacada en estas heridas tratadas con los factores de crecimiento, comparado con los testigos.

Estos resultados demuestran la aptitud de los anticuerpos de neutralización dirigidos contra unos factores de crecimiento seleccionados para reducir de manera notable la formación de tejido cicatrizador durante la curación de heridas dérmicas en el adulto. De manera realmente importante, este efecto ventajoso no se acompaña de problemas dependientes de una curación de heridas retardadas o de una epitelización retardada y de una resistencia débil de la herida.

Se observa igualmente una cierta mejora de la reducción de la formación de tejidos cicatrizadores después de la administración de anticuerpos de neutralización dirigidos contra los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF) incluso si, en el trabajo experimental preliminar, esta mejora se revela menos destacada que en el caso de la neutralización de PDGF. De manera interesante, parece que el FGF ácido o básico exógeno mejora en cuanto a la cicatrización. Sin embargo, se piensa que se puede obtener unos resultados similares a los que conciernen a los TGF- β y el PDGF, aunque eventualmente en una medida un poco inferior, con unos agentes de neutralización dirigidos contra otros factores de crecimiento, administrados a una posología apropiada en unas condiciones apropiadas.

Al menos en el caso de los TGF- β que se muestran muy activos en el ámbito de la producción y de la organización de colágeno, en particular de colágeno I, dando lugar a la formación de tejidos cicatrizadores, se aconseja que normalmente después de la lesión inicial, el contenido de estos factores de crecimiento en los alrededores inmediatos de la herida sea susceptible de aumentar muy rápidamente sobre la base de un efecto en cascada autocatalítica. Así, no solamente los TGF- β presentes en una herida inicial a partir de la degradación plaquetaria hacen la función de quimioattractivos para los monocitos, para los macrófagos y para los fibroblastos en unas concentraciones crecientes, sino que se realimentan igualmente sobre su propio promotor para estimular su propia síntesis, aunque se constata rápidamente un contenido elevado. Las células inflamatorias, en particular los macrófagos, liberan los TGF- β y manifiestan este efecto autoinductor sobre la síntesis de los TGF- β . Los TGF- β estimulan igualmente la síntesis y la liberación de otros factores de crecimiento tales como los TGF- β , el PDGF, el EGF. Los TGF- β y estos otros factores de crecimiento estimulan la síntesis de las moléculas de la matriz extracelular, por ejemplo los colágenos y los glicosaminoglicanos, vía los fibroblastos de la herida e influyen igualmente el grado de restablecimiento proteolítico y de organización de estas moléculas de la matriz extracelular. Dado que el callo fibrinoso inicial es denso, los fibroblastos proviniendo de la piel normal adyacente migran en un primer tiempo hacia arriba y hacia abajo entre el callo y el margen de la herida en una dirección sustancialmente perpendicular a la membrana basal. El colágeno y otras moléculas de la matriz extracelular se depositan igualmente en esta orientación anormal y esto da finalmente nacimiento a la cicatriz.

ES 2 136 618 T5

Se puede emitir la hipótesis de que una curación normal de una herida en un adulto es optimizada por vía filogenética en cuanto a la rapidez del cierre en unas condiciones de curación desfavorables. En consecuencia, las cantidades del factor de crecimiento liberadas son generalmente excesivas, aunque la rapidez del proceso de curación tiene un efecto tapón considerable frente a factores externos nocivos, pero con el inconveniente a largo término de una cicatrización. Los procesos modernos puestos en práctica para curar las heridas, por ejemplo la utilización de vendas, y la reducción de los peligros de infecciones, han eliminado en gran margen la necesidad de esta “aceleración” del factor de crecimiento, aunque puede contemplarse un tratamiento para disminuir el perfil activo del factor de crecimiento y el mismo minimizará la cicatrización ulterior.

Así, la cascada autocatalítica de acontecimientos descritos anteriormente para los TGF- β está sometida a una reducción cuando se procede a un tratamiento en una fase precoz con un agente de neutralización. Sin embargo, este último no será aplicado en una cantidad suficiente para neutralizar la totalidad de este factor de crecimiento dejando subsistir, la cantidad aplicada una cantidad suficiente para que la curación de la herida pueda desarrollarse sin inhibición importante. Una explicación similar puede igualmente aplicarse al menos al PDGF.

Utilización práctica

Se comprende que los resultados obtenidos a partir de las búsquedas realizadas en la puesta a punto de la presente invención tienen una implicación práctica directa en la utilización clínica para dominar la formación de tejidos cicatrizadores en el momento de la curación de heridas, ya sea en el dominio terapéutico, ya sea en el dominio estético. Para una utilización práctica, en general una cantidad apropiada del anticuerpo o de los anticuerpos del o de los factores de crecimiento o aún de otro agente o de otros agentes inhibidores del o de los factores de crecimiento, constituyendo la materia eficaz para la neutralización y/o para la modificación del perfil de los factores de crecimiento pertinentes activos y responsables de la formación de tejidos cicatrizadores durante la curación de heridas, será elaborada vía uno cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacológica bajo la forma de una formulación o de una preparación farmacéutica con fines de administración de cualquier materia apropiada a un paciente que tiene necesidad de un tratamiento relacionado con una herida. Además, se pueden proponer unas formulaciones o unas preparaciones farmacéuticas de este tipo, no solo a título individual para una utilización clínica, sino igualmente bajo la forma de componentes necesarios de primeros auxilios, por ejemplo para unas utilidades de urgencia al exterior de la clínica.

A título de ejemplo en lo que concierne a PDGF, en general se administrarán el anticuerpo o los anticuerpos o aún otro agente u otros agentes de neutralización (al menos para unas heridas resultantes de incisiones) de manera que se obtenga una neutralización eficaz entre 1 pg - 1 μ g de PDGF (pero preferentemente en una cantidad entre 100 pg y 10 ng) por cm de incisión lineal y por administración. Como se ha indicado preferentemente, la aplicación en una fase precoz a lo largo del proceso de curación de la herida es esencial. Normalmente, se actuará en un momento situado antes, durante o bien antes y durante la fase de la formación del tejido de granulación, en un período de tiempo de alrededor de 14 días, pero preferentemente en un período de tiempo de 7 o de 3 días o menos, después de la aparición de la herida.

Las preparaciones farmacéuticas pueden, según es común, ser administradas por vía local aplicándolas sobre la superficie alrededor de la herida bajo una forma líquida, bajo una forma de gel, de un aerosol, de una crema o de un polvo o también bajo la forma de un apósito, de un emplastro biodegradable o de un dispositivo implantable de liberación controlada en el momento de la aparición de la herida o poco tiempo después. La administración por vía parenteral, en particular la inyección subcutánea puede igualmente ser a menudo preferida, aunque el anticuerpo o los anticuerpos de neutralización o también otros agentes de neutralización pueden ser introducidos directamente en el medio ambiente de la herida para obtener una eficacia máxima. A tal efecto, las formulaciones farmacéuticas preparadas pueden comprender unas preparaciones líquidas estériles (por ejemplo en una solución salina tamponada con fosfato) de una cantidad predeterminada de la materia activa, por ejemplo del anticuerpo o de los anticuerpos pertinentes, presentados bajo una forma posológica unitaria y dispuesta en unas ampollas selladas listas para empleo. Sin embargo, para el modo de administración por vía local dado como alternativa, que se preferirá en algunos casos, las formulaciones pueden realizarse disponiendo la materia activa en asociación o en mezcla íntima con al menos otro ingrediente constituyendo un soporte, un disolvente o un excipiente compatible farmacéuticamente aceptable con el fin de obtener una composición tal como una crema, un gel, un urgente o análogos, que es más apropiada para la aplicación por vía local. La formulación puede ser aplicada sobre un apósito estéril, sobre unos apósitos o unos emplastos absorbibles biodegradables para la aplicación por vía local o también en unos sistemas de implantes de liberación lenta con una liberación inicial importante que disminuye para acabar en una liberación lenta.

La formulación puede igualmente consistir en un agente de neutralización, por ejemplo un anticuerpo o unos anticuerpos pertinentes fijos a un soporte, por ejemplo un biopolímero de colágeno o de ácido hialurónico o también un polímero, por ejemplo del PVC del que puede ser liberado rápidamente en un primer tiempo y más lentamente a lo largo del tiempo cuando se aplica sobre o cuando se implanta en el vacío tisular o en el vacío dejado para la herida.

REIVINDICACIONES

5 1. La utilización de una cantidad eficaz inhibidora de la actividad, de al menos un agente neutralizante del factor de crecimiento, específico únicamente contra PDGF, en la fabricación de un medicamento para ser utilizado en el tratamiento de heridas para inhibir la formación de tejidos cicatrizadores durante su curación.

2. La utilización de un agente que neutraliza el factor de crecimiento según la reivindicación 1, en la que el agente que neutraliza el factor de crecimiento es un anticuerpo que neutraliza el factor de crecimiento.

10 3. La utilización de un agente que neutraliza el factor de crecimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de manera conjunta con un soporte farmacéuticamente aceptable.

15 4. Composición para utilizar en el tratamiento de heridas con el fin de inhibir la formación de tejidos cicatrizadores durante la curación, comprendiendo una cantidad eficaz inhibidora de la actividad, de al menos un agente que neutraliza el factor de crecimiento específico contra el factor de crecimiento fibrótico PDGF.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65