



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 996**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/45** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05715335 .5**  
96 Fecha de presentación : **15.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1718328**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **Uso del Factor XIII para estimulación de la perfusión de tejido isquémico.**

30 Prioridad: **20.02.2004 EP 04003950**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.09.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.09.2009**

73 Titular/es: **CSL Behring GmbH**  
**Emil-von-Behring-Strasse 76**  
**35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es: **Inbal, Aida;**  
**Dardik, Rima;**  
**Leor, Jonathan y**  
**Dickneite, Gerhard**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

**ES 2 325 996 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

Uso del Factor XIII para estimulación de la perfusión de tejido isquémico.

5 El objeto de la presente invención es el uso de Factor XIII activado (FXIIIa) para la fabricación de un medicamento, preferiblemente en forma inyectable para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con perfusión alterada de la sangre del tejido después de isquemia transitoria o permanente.

10 La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos preexistentes y es un proceso esencial en el desarrollo embrionario, el crecimiento fisiológico normal, la curación de las heridas, y la expansión de los tumores. El proceso de angiogénesis consta de varias etapas, que incluyen la estimulación de células endoteliales por factores de crecimiento, degradación de la matriz extracelular por enzimas proteolíticas, migración y proliferación de células endoteliales, y, finalmente, formaciones de tubos capilares. La inhibición de la apoptosis de las células endoteliales para promover la supervivencia celular está considerada también como esencial para la angiogénesis. La migración y proliferación de células endoteliales son pasos críticos en el proceso angiogénico.

15 El Factor XIII (FXIII) es una transglutaminasa plasmática que estabiliza los coágulos de fibrina en las etapas finales de la coagulación de la sangre. FXIII activado por trombina cataliza la formación de reticulaciones covalentes entre residuos  $\gamma$ -glutamilo y  $\epsilon$ -lisilo de monómeros de fibrina adyacentes para producir el coágulo maduro. FXIII circula en el plasma como un heterotetrámero compuesto de dos subunidades A y dos subunidades B. la subunidad A contiene el sitio activo de la enzima y es sintetizada por hepatocitos, monocitos, y megacariocitos. La subunidad B sirve como vehículo para la subunidad catalítica A en el plasma y es sintetizada por el hígado.

20 El gen de la subunidad A de FXIII pertenece a la familia de las transglutaminasas, que comprende al menos 8 transglutaminasas tisulares. Estas enzimas reticulán diversas proteínas y están implicadas en muchos procesos fisiológicos y patológicos, tales como la hemostasis, la curación de las heridas, el crecimiento de los tumores, la formación de piel, y la apoptosis. De modo análogo a las transglutaminasas tisulares, FXIII participa en la remodelación de los tejidos y la curación de las heridas, como puede deducirse de un defecto en la reparación de las heridas observado en pacientes con deficiencia heredada de FXIII. FXIII participa también en la implantación del embrión durante la gestación normal; las mujeres homocigóticas para deficiencia de FXIII experimentan abortos recurrentes.

25 La curación de las heridas así como la implantación del embrión son procesos complejos que implican proliferación celular y angiogénesis.

30 Es sabido también que FXIII activado (FXIIIa) respalda la angiogénesis por intensificación de la migración, proliferación, y supervivencia de las células endoteliales. En un modelo de angiogénesis *in vitro*, FXIIIa intensifica significativamente la formación de tubos en Matrigel. Adicionalmente, en un modelo *in vivo* FXIIIa induce formación de nuevos vasos en una córnea de conejo. El efecto proangiogénico de FXIIIa está asociado con la regulación decreciente de trombospondina (TSP-1) (Dardik R., Solomon A., Loscalzo J., Eskaraev R., Bialik A., Goldberg I., Schiby G., Inbal A. Novel proangiogenic effect of Factor FXIII (FXIII) associated with suppression of thrombospondin 1 (TSP-1) expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23:1472-1477).

35 No se conoce con exactitud si el Factor XIII participa en la angiogénesis en el tejido isquémico. Se demostró que la transglutaminasa tisular recombinante humana intensifica la angiogénesis en una cámara de colgajo cutáneo dorsal de la rata.

40 Así pues, el problema a resolver era analizar el efecto del Factor XIII en la proliferación de nuevos vasos sanguíneos en tejido isquémico y examinar si dicho efecto podría ser utilizado o no para una nueva preparación terapéutica.

45 Se ha descubierto ahora que puede utilizarse una preparación inyectable de Factor XIIIa para la estimulación de la perfusión de tejidos isquémicos por la proliferación de nuevos vasos sanguíneos en donde el Factor XIII es activado *in vitro* por la adición de trombina para generar FXIIIa. Alternativamente, es posible la aplicación tópica de una preparación de FXIIIa a un área lesionada o isquémica.

50 Podrían esperarse efectos terapéuticos significativos por el uso de dicho concentrado de Factor XIIIa para el tratamiento de infartos de miocardio, enfermedades vasculares periféricas, derrames cerebrales isquémicos y heridas isquémicas incurables.

55 Así pues, las preparaciones de FXIIIa podrían utilizarse en todas aquellas enfermedades que están asociadas con perfusión sanguínea alterada del tejido después de isquemia transitoria o permanente. Ello incluye isquemias debidas a oclusión u obstrucción arterial o venosa de la microcirculación.

60 Los resultados terapéuticos de dicho concentrado de Factor XIIIa podrían demostrarse por los métodos y experimentos siguientes:

#### 65 Activación de FXIII

La fuente de FXIII fue un concentrado de FXIII, Fibrogamma-P® (Aventis Behring). Para obtener FXIII activado (FXIIIa) se incubaron 2 ml de FXIII reconstituido de 100 U/ml (aproximadamente 1000  $\mu$ g/ml) con trombina

inmovilizada sobre cuentas Affi-Gel 10. Un mililitro de volumen de cuentas compactado contenía 200 U de trombina. Se añadió  $\text{CaCl}_2$  10 milimolar, y la mezcla se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 horas. La activación de FXIII se monitorizó por medida de la actividad de FXIII utilizando un ensayo cromogénico (Berichrome, Dade Behring). La fuga de trombina de las cuentas a la solución de FXIII se excluyó por la ausencia de desarrollo de color después de la adición de un sustrato cromógeno específico de trombina (S2238, Chromogenix, Suecia). Se desactivó FXIIIa por tratamiento con 3 mmol/l de yodoacetamida (Sigma) durante 30 minutos a  $22^\circ\text{C}$  para bloquear la actividad de transglutaminasa; la yodoacetamida libre se separó luego por diálisis.

### 1. Modelo *in vivo* de vascularización de la córnea del conejo

Se utilizaron en este estudio conejos macho albinos de Nueva Zelanda (3,0 kg de peso). Se practicó anestesia general por inyección intramuscular de xilazina al 2% y quetamina.HCl. Se inyectaron subepitelialmente  $2\ \mu\text{l}$  que contenían  $20\ \mu\text{g}$  de FXIIIa o PBS en la córnea de los conejos utilizando una jeringuilla Hamilton. El sitio de la inyección se encontraba a 2 mm de distancia del limbo, en el sitio de unión del músculo recto superior. En cada uno de los cuatro conejos estudiados, se inyectó FXIIIa en la córnea derecha y un volumen similar de PBS (control negativo) en la córnea izquierda. El examen clínico de la córnea se realizó antes de la inyección, inmediatamente después de la inyección, y luego cada 24 horas hasta 96 horas después de observarse el efecto máximo. En esta etapa, se sacrificaron los conejos por inyección letal de pentobarbital. Se extirparon las córneas, se fijaron en paraformaldehído al 4%, y se tiñeron con hematoxilina-eosina para evaluación histológica por microscopía óptica y con GSLI-Isolectina B<sub>4</sub> para evaluación de los vasos sanguíneos.

La córnea normal no posee vaso sanguíneo alguno (Fig. 1A). En contraste con los ojos izquierdos tratados con PBS, la formación de vasos sanguíneos era evidente en los ojos derechos de los 4 conejos 48 después de la inyección de FXIIIa (Fig. 1B). A las 72 horas, podía observarse una red rica de vasos sanguíneos en los ojos derechos, que penetraban en la córnea hasta 4 mm hacia el centro (Fig. 1C). El desarrollo de la red vascular continuaba hasta 96 horas después de la inyección de FXIIIa. Se observaron resultados similares en los conejos tratados con bFGF. La sección histológica de la córnea que se muestra en la Figura 2B muestra la red rica de capilares desarrollada en la córnea de los ojos tratados con FXIII, en oposición a los tratados con PBS (Fig. 2A). La tinción de las secciones tratadas con FXIIIa de la córnea con el marcador de las células endoteliales isolectina B<sub>4</sub>, demostró la tinción positiva en los vasos sanguíneos (2C).

### 2. Angiogénesis en ratones con Factor XIII silenciado

Ratones de control (n = 6), ratones con FXIII silenciado (n = 6) y ratones con FXIII silenciado tratados con FXIII (n = 6) se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg). Se inyectó por vía subcutánea una mezcla estéril de Matrigel (Becton Dickinson) (0,5 ml) heparina (20 unidades/ml), y bFGF (200 ng/ml), con o sin FXIIIa (Fibrogammin®; 10-20 unidades). Al cabo de dos semanas se practicó la eutanasia a los ratones. El tapón de Matrigel se disecó del tejido subcutáneo y se analizó después de tinción con hematoxilina-eosina para evaluación histológica por microscopía óptica y con GSLI-Isolectina B<sub>4</sub> para evaluación de los vasos sanguíneos. Adicionalmente, se midió la hemoglobina de los vasos que se desarrollaban en la placa de Matrigel.

La actividad de FXIII en el plasma de ratones FXIII -/- medida por el ensayo Berichrom era indetectable. Los análisis histológicos de las secciones de Matrigel demostraban números significativamente incrementados de nuevos vasos en los ratones de control comparados con el de los ratones silenciados. En una imagen representativa que se muestra en Fig. 3, la cantidad de nuevos vasos formados en los animales de control estaba incrementada significativamente. El número de nuevos vasos en el grupo completo de ratones FXIII -/- estaba reducido significativamente comparado con el de los ratones de control:  $5,9 \pm 1,9$  frente a  $8,8 \pm 2,4$ , y el número aumentaba después del tratamiento con FXIII hasta  $7,4 \pm 2,9$  (p = 0,004) (Tabla 1). Los valores de hemoglobina medidos a partir del tejido vasos/Matrigel (que reflejaba el número de vasos sanguíneos que contenían glóbulos rojos) estaba incrementado significativamente en el grupo de control,  $4,6 \pm 2,5\ \mu\text{g}/\text{mg}$  Matrigel frente a  $1,3 \pm 1,0\ \mu\text{g}/\text{mg}$  Matrigel en los ratones con FXIII silenciado, y la hemoglobina aumentaba casi al doble en los ratones con FXIII silenciado tratados con concentrado de FXIII, p = 0,001 (Tabla 1).

### 3. Efecto pro-angiogénico del factor FXIII sobre el tejido isquémico (infarto de miocardio)

Después de ligación de la arteria coronaria de la rata, se inyectaron localmente solución salina, bFGF o 5 unidades de FXIIIa cada 7 días por medio de una cánula en el tejido suministrado por el vaso sanguíneo ligado como se ha descrito previamente. Tres semanas después, se sacrificaron los animales y el tejido cardíaco se sometió a análisis histológico y cuantificación del número de vasos sanguíneos. El tejido se fijó en paraformaldehído al 4%, se tiñó con hematoxilina-eosina para evaluación histológica por microscopía óptica y con GSLI-Isolectina B<sub>4</sub> para evaluación de los vasos sanguíneos.

Los experimentos realizados con 9 ratas (3 tratadas con FXIIIa, 3 tratadas con bFGF y 3 tratadas con solución salina) demostraron que después de la isquemia de miocardio, se observaba un aumento significativo en la formación de vasos nuevos en las ratas inyectadas con FXIIIa comparadas con las ratas inyectadas con solución salina:  $142 \pm 15/\text{mm}^2$  frente a  $64 \pm 15/\text{mm}^2$ ; respectivamente, p = < 0,001 (Tabla 2). El aumento en la formación de vasos nuevos en los animales tratados con bFGF (control positivo) era similar al observado en los ratones tratados con FXIIIa ( $144$

## ES 2 325 996 T3

$\pm 22/\text{mm}^2$ ;  $p = 0,6$ , Tabla 2). Una imagen representativa de la neovascularización de los animales tratados con FXIIIa, bFGF o solución salina se muestra en Fig. 4. Ninguno de los animales desarrolló efectos secundarios.

#### 4. El efecto del Factor XIII sobre la angiogénesis del corazón neonatal trasplantado en ratones singénicos

Se trasplantaron corazones neonatales de murino C57BL/6N (de 24 horas de edad) en el pabellón de la oreja (sic) de ratones hospedadores singénicos. Grupos tratados con FXIIIa ( $n = 15$ ) o de control (tratados con solución salina,  $n = 17$ ) se evaluaron una semana después del injerto por: 1 - ECG; 2 - medida & (sic) del área cardíaca de latido; 3 - recuento de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Al cabo de 10 días, se sacrificaron los ratones y se realizó el análisis histológico del tejido cardíaco trasplantado con hematoxilina-eosina para evaluación histológica por microscopía óptica y con GSLI-Isolectina B4 para evaluación de los vasos sanguíneos.

Treinta y dos ratones senescentes se sometieron a trasplante con corazones neonatales: 15 se trataron con FXIIIa y 17 recibieron inyecciones de solución salina. Como se muestra en la Tabla 3, el % del área de latido cardíaca trasplantada aumentaba significativamente en los animales tratados con FXIIIa:  $64,7 \pm 32$  frente a  $40,3 \pm 29,9$ , respectivamente,  $p < 0,001$ . Análogamente, el número de vasos nuevos era significativamente mayor en el grupo tratado con FXIIIa:  $31,7 \pm 3,3$  frente a  $21,2 \pm 5,7$ ,  $p < 0,01$ .

Adicionalmente, el número de ratones con  $> 80\%$  de área de latido era significativamente mayor en el grupo tratado con FXIIIa que en el grupo de control.  $46\%$  frente a  $17\%$ , respectivamente;  $p = 0,038$ . Las imágenes representativas de los nuevos vasos formados en solución salina de los corazones inyectados con FXIIIa se muestran en Fig. 5. No se observó efecto secundario alguno después de las inyecciones de FXIIIa.

De estos experimentos pueden deducirse las conclusiones siguientes:

- a) El efecto proangiogénico de FXIIIa en el tejido normal e isquémico es sustancial.
- b) La formación de vasos nuevos por FXIIIa en el tejido isquémico abre nuevas opciones terapéuticas para este compuesto con relación a situaciones clínicas en las cuales es crucial la perfusión por desarrollo de nuevos vasos, en términos generales, para todas aquellas enfermedades que están asociadas con perfusión sanguínea alterada del tejido después de isquemia transitoria o permanente debida a oclusiones venosas y arteriales y obstrucción de la microcirculación. Esto incluye infarto agudo de miocardio, enfermedad vascular periférica, derrame cerebral isquémico, ataque isquémico transitorio y para el tratamiento de heridas isquémicas incurables.
- c) FXIII está disponible comercialmente como el concentrado Fibrogamma<sup>®</sup> (Aventis Behring). Después de la inyección, FXIII puede ser activado por trombina endógena o puede inyectarse localmente en su forma activa después de activación *in vitro*. Así pues, la viabilidad y ausencia de efectos secundarios hacen que FXIII sea un agente terapéutico potencial atractivo.

TABLA 1

*Modelo Murino de Tapón de Matrigel*

	<b>Control N=6</b>	<b>FXIII<sup>-/-</sup> N=6</b>	<b>FXIII<sup>-/-</sup>+FXIIIa N=5</b>	<b>P ANOVA</b>
<b>Número de vasos nuevos/mm<sup>2</sup></b>	<b>8,8 ± 2,4</b>	<b>5,9 ± 1,9</b>	<b>7,4 ± 2,9</b>	<b>0,004</b>
<b>Hb (µg/mg matrigel)</b>	<b>4,6 ± 2,5</b>	<b>1,3 ± 1,0</b>	<b>2,4 ± 0,6</b>	<b>0,001</b>

TABLA 2

*Formación de vasos nuevos en corazón isquémico*

	<b>Sol. salina</b>	<b>B-FGF</b>	<b>FXIIIa</b>	<b>P</b>
<b>No. de vasos/mm<sup>2</sup></b>	<b>64±15*</b>	<b>144±22</b>	<b>142±15*</b>	<b>*&lt;0,01</b>

# ES 2 325 996 T3

TABLA 3

*Modelo de trasplante de aoinjerto cardiaco neonatal*

	<b>Control N=17</b>	<b>FXIIIa N=15</b>	<b>p</b>
<b>Número de vasos nuevos</b>	<b>21,1 ± 5,7</b>	<b>31,7 ± 3,3</b>	<b>&lt; 0,01</b>
<b>% de área cardiaca de latido</b>	<b>40,3 ± 29,9</b>	<b>64,7 ± 32</b>	<b>&lt;0,01</b>

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

## ES 2 325 996 T3

### REIVINDICACIONES

5 1. Uso de FXIIIa (FXIII activado) para la fabricación de un medicamento para la estimulación de la perfusión de tejidos isquémicos por la proliferación de nuevos vasos sanguíneos.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medicamento es una preparación inyectable.

3. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 para el tratamiento de un infarto de miocardio.

10 4. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 para el tratamiento de un derrame cerebral isquémico o ataque isquémico transitorio.

15 5. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 para el tratamiento de enfermedades u obstrucciones vasculares o veno-oclusivas de la microcirculación.

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el medicamento es para aplicación tópica.

20

25

30

35

40

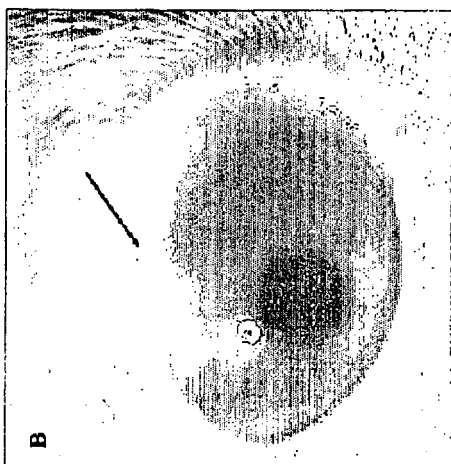
45

50

55

60

65



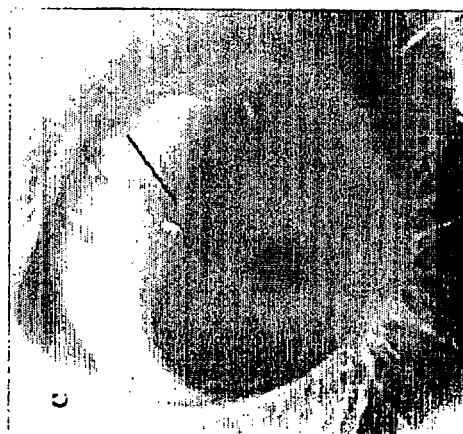
**FXIIIa;  
48 h**

**Fig.1B**



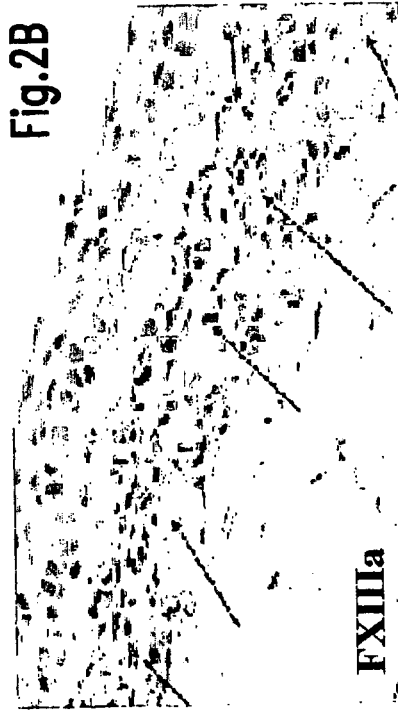
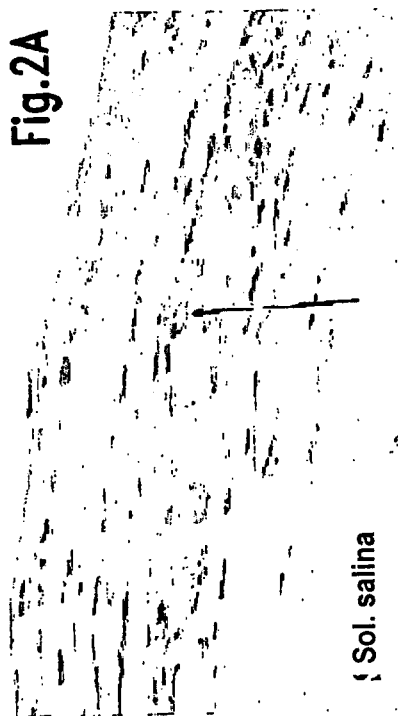
**Sol. salina**

**Fig.1A**



**FXIIIa;  
72 h**

**Fig.1C**



Tinción con hematoxilina-eosina



