(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 328 452**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C07K 14/19 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C12N 9/74 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **01973483 .9**
(96) Fecha de presentación : **25.09.2001**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1352070**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2003**

(54) Título: **Conjugado de unión fibrina/fibrinógeno.**

(30) Prioridad: **25.09.2000 US 669240**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2009

(73) Titular/es: **Baxter Innovations GmbH**
Industriestrasse 67
1221 Wien, AT
Baxter International Inc.

(72) Inventor/es: **Redl, Heinz;**
Fuerst, Walter;
Kneidinger, Rudolf;
Helgerson, Sam, L.;
Looker, Douglas, L.;
Inman, Elisabeth, M.;
Richards, Jane, P. y
Wong, Catalina

(74) Agente: **Aznárez Urbieta, Pablo**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Conjugado de unión fibrina/fibrinógeno.

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a conjugados que tienen una utilidad específica como depósitos para sustancias farmacéuticamente activas.

La provisión de medicamentos en depósito para una acción de liberación controlada es esencial para el tratamiento eficaz de aquellos pacientes que requieren una administración constante de determinadas sustancias farmacéuticamente activas, en especial cuando el medicamento tiene que administrarse en el interior del cuerpo. Un requisito previo para un depósito de medicamento adecuado es que la liberación de la sustancia farmacéuticamente activa desde tal depósito se pueda controlar mediante procesos de retardo específicos. Esto implica que la sustancia farmacéuticamente activa tiene que conectarse a la matriz del depósito, bien sea de modo reversible o irreversible.

La matriz a la que se une la sustancia farmacéuticamente activa tiene que tener no sólo afinidad por la sustancia activa, sino también propiedades biocompatibles. Preferentemente, tales matrices de depósito son biodegradables dentro del cuerpo del paciente, con lo cual el paciente no necesita un tratamiento adicional para eliminar el depósito vacío.

Debido a sus propiedades biológicas favorables, se han propuesto especialmente geles de fibrina como matrices de depósito para medicamentos preferentes (véase por ejemplo AT 369 900). Los geles de fibrina son fáciles de preparar, tienen buena biocompatibilidad y se puede regular su degradación biológica en el interior del cuerpo. Sin embargo, debido a la estructura hidratada y muy porosa de la fibrina, la difusión de sustancias farmacéuticamente activas se produce a una velocidad demasiado rápida para la mayoría de los propósitos, aunque el gel de fibrina esté altamente reticulado debido a la adición extra de su efector de reticulación, el factor XIII.

En experimentos preliminares realizados para la presente invención se puede demostrar que diferentes proteínas, tales como la β-galactosidasa, se liberan completamente desde un gel de fibrina en tres o menos días.

Por consiguiente, se proponen factores bioactivos de enlace covalente a una red de fibrina mediante la unión de un dominio de sustrato transglutaminasa a un factor bioactivo utilizando la actividad del factor XIIIa (W0 98/43686). Sin embargo, la unión covalente del fármaco de interés a la red de fibrina puede dar como resultado una unión demasiado fuerte como para permitir una liberación suficiente del medicamento al paciente. No todos los medicamentos son compatibles con la unión covalente. Además, el coágulo de fibrina puede llegar a ser inestable debido a que los sitios de reticulación son utilizados por los sustratos de transglutaminasa, que son esenciales para esta reacción.

Además, la EP 0 513 778 A2 describe un anticuerpo monoclonal híbrido bioespecífico que contiene una región variable y carece de dominios de región constante de cadena pesada, la WO 99/58569 describe agentes antifibrinolíticos, en concreto inhibidores de plasmita, con menor tendencia a producir trombosis de rebote, la WO 97/17435 describe composiciones y métodos para biomoléculas biotilinadas y la tecnología de afinidad biotina/avidina, y la WO 95/33492 describe métodos y composiciones para modular la acción cicatrizante.

Además, Yoshida Hisahiro y col., 2000 ("Novel drug Delivery System using autologous fibrin glue: Release properties of anti-cancer drugs", Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2000, 23(3): 371-374) describen estudios del comportamiento de liberación de una variedad de medicamentos anticancerosos que tienen diferentes propiedades físicas y Sahni A. y Francis C.W., 2000 ("Vascular endotelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endotelial cell proliferation", Blood, 2000, 96(12): 3772-3778) describen la investigación de posibles interacciones específicas entre VEGF y fibrinógeno que pueden desempeñar un papel en las respuestas vasculares a lesiones.

Ramakrishnan y col., 1996 ("Vascular Endotelial Growth Factor-Toxin Conjugate Specificaly Inhibits KDR/flk-1positive Endotelial Cell Proliferation *in Vitro* and Angiogenesis *in Vivo*", Cancer Research 56, 1324-1330, March 15, 1996) describen el uso potencial de conjugados de VEGF-toxina para inhibir la neovascularización.

Por tanto, un propósito de la presente invención es proporcionar un depósito para medicamentos de biocompatibilidad satisfactoria y vida media regulable en el cuerpo del paciente.

Otro propósito de la presente invención consiste en proporcionar un depósito para medicamentos alternativo a base de fibrina, sin alterar en especial la sustancia activa o usando la actividad enzimática para su enlace.

Otro propósito de la presente invención consiste en proporcionar un depósito para medicamentos con capacidad para retrasar de manera eficiente la difusión de la sustancia biológicamente activa en comparación con el tiempo de liberación de este medicamento mediante la difusión desde un gel de fibrina estándar.

Sumario de la invención

Estos propósitos se consiguen con un conjugado de unión fibrina/fibrinógeno que comprende una fracción de unión fibrina/fibrinógeno comprendiendo el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$, y una sustancia farmacéuticamente activa, donde dicha fracción de unión fibrina/fibrinógeno se une de forma covalente a dicha sustancia farmacéuticamente activa, siendo dicho conjugado una proteína de fusión recombinante.

Con el conjugado según la presente invención, para enlazar elementos de unión de sustancias farmacéuticamente activas a un gel de fibrina se emplean elementos de unión con afinidad por la fibrina o el fibrinógeno. Debido a estas fracciones de unión de fibrina o fibrinógeno, los conjugados se unen de manera suficiente a la matriz de fibrina, con lo cual no es posible la elución de la sustancia farmacéuticamente activa por simple difusión, sino que depende principalmente de la afinidad de unión de la fracción fibrina/fibrinógeno ala fibrina.

El término "fracción de unión fibrina/fibrinógeno " se refiere a una fracción de unión que puede unirse a (1) fibrina o a (2) tanto fibrinógeno como fibrina. Cuando la capacidad de unión es tanto para la fibrina como para el fibrinógeno, es posible formar el gel de fibrina con moléculas de fibrinógeno que ya están "cargadas" con el presente conjugado para permitir una formación homogénea del depósito para medicamentos y una distribución homogénea del conjugado, y, con ellos, del fármaco, por todo el depósito de medicamento de fibrina.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra el sistema ELISA-sándwich para la detección de la unión covalente (-) del anticuerpo TNF y la trombina, así como las afinidades de unión (:::) a fibrina/fibrinógeno y TNF, respectivamente.

Figura 2: muestra la unión de TNF a una matriz de fibrinógeno vía un anticuerpo TFN acoplado a trombina.

Figura 3: muestra el sistema ELISA-sándwich para la detección de la unión covalente (-) de un anticuerpo TNF y fibronectina y sus afinidades de unión (:::) a fibrina/fibrinógeno y TNF, respectivamente.

Figura 4: muestra la unión de TNF a una matriz de fibrinógeno vía un anticuerpo TFN acoplado a fibronectina.

Figura 5: muestra la retención de TNF usando el conjugado según la presente invención en comparación con la retención de TNF en presencia de fibronectina no acoplada y anticuerpo TNF.

Figura 6: muestra la estabilidad de los coágulos de fibrina en horas, con 3.000 KIU/ml de aprotinina libre o con 3.000 KIU/ml de aprotinina enlazada.

Figura 7: muestra la unión específica de fbe-GST sin GTS sólo con fibrinógeno.

Figura 8a: muestra la unión específica de un ADN bicatenario biotinilado (ds) y un ADN monocatenario (ss) a fibrinógeno pero no a BSA.

Figura 8b: muestra la unión de estreptavidina-peroxidasa (SV-POX) preincubada con ADN biotinilado a una matriz de fibrinógeno vía el ADN como fracción de unión de selladores de fibrina.

Figura 9: muestra la tasa de liberación de una albúmina biotinilada unida de forma covalente a trombina en comparación con la liberación de albúmina biotinilada libre de un coágulo de fibrina.

Figura 10: describe el esquema general de una proteína de fusión recombinante de unión a fibrina que comprende el dominio de unión a la fibrina C-terminal de VEGF165 enlazado a una proteína farmacéuticamente activa.

Figura 11: muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión leptina-VEGF165 C-terminal-His tag [SEQ ID No: 1].

Figura 12: representa el plásmido de expresión que contiene el cartucho que codifica la proteína de fusión de leptina-VEGF165 C-terminal-His tag.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un conjugado de unión fibrina/fibrinógeno que comprende una fracción de unión fibrina/fibrinógeno que incluye el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$, y una sustancia farmacéuticamente activa, donde dicha fracción de conjugado de unión fibrina/fibrinógeno se une de forma covalente a dicha sustancia farmacéuticamente activa, y donde dicho conjugado es una proteína de fusión recombinante.

Un depósito formado con este conjugado proporciona una liberación retardada de la sustancia farmacéuticamente activa en base a la cinética de liberación de la fracción de unión fibrina/fibrinógeno desde la fibrina, así como la disolución natural del coágulo de fibrina con el tiempo. En este caso, la sustancia farmacéuticamente activa mantiene su actividad incluso cuando permanece ligada de forma covalente a la fracción de unión fibrina/fibrinógeno.

Para el presente conjugado, las proteínas pueden utilizarse tanto en su forma fisiológica como en una forma procesada. Por ejemplo, tales elementos de unión fisiológicos pueden ser procesados mediante técnicas bioquímicas conocidas, con el fin de proporcionar como mínimo partes de unión fibrina/fibrinógeno de estas proteínas comprendiendo el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$. Alternativamente, también pueden proporcionarse las partes por unirse a la fibrina/fibrinógeno que comprenden el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$ mediante una tecnología de ADN recombinante. Para muchas proteínas de unión fibrina/fibrinógeno se describe o propone una estructura tridimensional que permite a cualquier experto en la materia seleccionar aquellas partes de estas proteínas que son relevantes para la unión fibrina/fibrinogeno comprendiendo el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$ para su utilización en la presente invención. Se pueden analizar los sitios de fibrina-fibrinógeno putativos de otras sustancias con afinidad de unión para fibrina/fibrinógeno que comprenden el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$ en base a modelos tridimensionales de las proteínas antes mencionadas, por ejemplo mediante análisis de secuencias, cuando tales sustancias son proteínas o derivados de proteínas o una selección por visualización de fagos.

Las sustancias farmacéuticamente activas preferentes para su utilización en el presente conjugado son antibióticos, factores de crecimiento, receptores para componentes tisulares, sustancias adhesivas tisulares, agentes antitumorales, sustancias de adhesión celular, proteínas plasmáticas, antiproteasas, inhibidores de la fibrinolisis, hormonas, heparinoides, sustancias de acción cicatrizante y mezclas de los mismos. Cuando la sustancia farmacéuticanente activa es un inhibidor de la fibrinolisis, tal como la aprotinina como parte del conjugado de la invención, el coágulo al que se une el conjugado va a durar más que un coágulo que sólo contiene aprotinina libre, que se difundiría fácilmente por el coágulo.

Estas sustancias pueden ser directamente farmacéuticamente activas o proporcionar una acción mejorada de otra sustancia farmacéuticamente activa, que puede aplicarse al mismo tiempo que el presente depósito para medicamentos o por separado. Por ejemplo, pueden administrarse receptores para componentes tisulares o sustancias adhesivas tisulares, lo que permite un mayor rendimiento del adhesivo tisular basado en fibrinógeno. Otros ejemplos que cambian las propiedades adhesivas de un adhesivo tisular son las sustancias que pueden ser proporcionadas con el presente conjugado. Cuando se administran junto con un adhesivo tisular "clásico", la presencia de tales sustancias farmacéuticamente activas que afectan en las propiedades de adhesión pueden influir en la capacidad de adhesión o no adhesión del adhesivo tisular de fibrinógeno a tejidos o células específicas.

Según una realización preferente de la presente invención, el conjugado se diseña para su incorporación en un sistema adhesivo tisular "clásico". Este sistema generalmente comprende una preparación que contiene fibrinógeno y trombina similar a un pegamento de "uno" o "dos" componentes, dando como resultado una formación de fibrina en el punto de aplicación o una preparación de fibrina preformada, por ejemplo una madeja de fibrina. El coágulo de fibrina o la madeja de fibrina formados permite, por ejemplo, cerrar heridas o la adhesión de tejidos. Otros ingredientes de este sistema son, por ejemplo, Factor XIII (como reticulante), inhibidores de la fibrinolisis, etc. (véase, por ejemplo, Fibrin Sealing in Surgical and Non-Surgical Fields, Schlag G., Redl H. editors, vols. 1-9).

El conjugado de unión fibrina/fibrinógeno se basa en el descubrimiento de los presentes inventores de que el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$ es el responsable de la capacidad de unión a la fibrina de esa molécula. Aquí, el término "dominio C-terminal de $VEGF_{165}$" se refiere a los residuos aminoácidos C104 -R165 que se muestran en la US 5.332.671, figuras 10a y 10b (Ferrara y Leung). $VEGF_{165}$ también se describe en Tischer y col., J. Biol. Chem. (1991) 266: 11947-11954; Sahni y col., Blood (2000) 96: 3772-3778, y Houck y col., J. Biol. Chem. (1992) 267: 26031-26037). El dominio de unión a la fibrina de este conjugado no se limita a la secuencia natural de aminoácidos codificada para los exones 5, 7 y 8, como se ilustra en la figura 10 del presente documento. Las propiedades de unión a la fibrina de la proteína de fusión resultante pueden modificarse con el fin de aumentar o disminuir la cinética de liberación del depósito de fibrina mediante adición, deleción o mutación de residuos aminoácidos específicos en el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$. $VEGF_{165}$ también contiene un sitio de división de plasmina natural al comienzo de su dominio C-terminal. Por tanto, puede utilizarse el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$ para formar una proteína de fusión con una sustancia farmacéuticamente activa, sin necesidad de una "fracción de unión a sustancia " entre la fracción de unión a fibrina y la sustancia farmacéuticamente activa. Cuando el conjugado se incorpora a un coágulo de fibrina en una herida, el plasminógeno natural del plasma del paciente que se introduce en la herida se convierte en plasmina, lo que a su vez escinde la proteína de fusión para liberar la sustancia farmacéuticamente activa, permitiendo su difusión desde el coágulo. Otro mecanismo de liberación se basa en la tasa de disociación del dominio C-terminal de $VEGF_{165}$ desde la fibrina; según este mecanismo, se libera el conjugado completo y se difunde desde el coágulo, permitiendo que la sustancia farmacéutica actúe en el punto de la herida, fuera del coágulo. Los siguientes son ejemplos de sustancias farmacéuticamente activas que se pueden fusionar con la fracción C-terminal del $VEGF_{165}$:

- citoquinas, factores de crecimiento y sustancias de acción cicatrizante tales como leptina (Frank y col., J. Clin. Invest. (2000) 106: 501-509; Sierra-Honigmann y col., Science (1998) 281: 1683-1686), IL-8, MCP-1, y PF-4.

- péptidos antibióticos tales como magaininas, defensinas y granulisina.

- inhibidores de la fibrinolisis tales como aprotinina y dominios de Kunitz de inhibidores de la coagulación asociados a lipoproteínas humanas (LACI-D1; Markland y col., Biochemistry (1996) 35: 8045-8057).

La sustancia farmacéuticamente activa así liberada puede servir para controlar el crecimiento, la migración y diferenciación de tipos celulares específicos, mejorando así la cicatrización de heridas y la neovascularización durante la reparación de tejidos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para formar un depósito para una sustancia farmacéuticamente activa que comprende un adhesivo tisular basado en fibrinógeno y un conjugado según la presente invención. El conjugado se puede facilitar por separado listo para ser mezclado antes de su uso médico. La mezcla "lista para el uso" de adhesivo tisular basado en fibrinógeno y el conjugado según la presente invención pueden administrarse por medios y métodos ya conocidos en el estado de la técnica para los adhesivos titulares "clásicos", especialmente con el componente de fibrinógeno de tales adhesivos. Este componente de fibrinógeno puede mezclarse de manera conocida con un componente que tiene actividad para transformar fibrinógeno en fibrina, preferentemente una preparación de trombina.

Por tanto, un kit según la presente invención también puede contener los dispositivos adecuados para administrar el adhesivo tisular y el conjugado y, opcionalmente, la actividad de transformación de fibrinógeno a fibrina. Ejemplos de tales dispositivos se describen en la EP 0 037 393 A, EP 0 315 222 A, EP 0 156 098 A, EP 0 210 160 A y EP 0 292 472 A.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la utilización de un conjugado según la presente invención en la fabricación de un medicamento para producir un depósito de una sustancia farmacéuticamente activa, mediante la administración de dicho conjugado en un sitio de depósito junto con una preparación de fibrinógeno, permitiendo transformar dicho fibrinógeno en fibrina, gracias a lo cual se forma un coágulo de fibrina, y permitiendo también unir el conjugado a dicho fibrinógeno o al coágulo de fibrina formado.

La transformación de fibrinógeno a fibrina puede llevarse a cabo por la trombina ya presente en el lugar de administración o mediante una actividad de transformación de fibrinógeno añadida de manera exógena. Además de trombina o proteasas derivadas de trombina, se pueden emplear otras proteasas, tales como estreptilasas, proteasa III y proteasas de veneno de serpiente, por ejemplo baxotropina, para escindir la molécula de fibrinógeno. La unión del conjugado a fibrina/fibrinógeno puede tener lugar después de la formación del coágulo de fibrina. Sin embargo, es preferible permitir este proceso de unión en una fase anterior, por ejemplo durante la fase de transformación de fibrinógeno o (especialmente) incluso antes, de modo que la unión del conjugado según la presente invención tenga lugar a nivel del fibrinógeno. Esto da como resultado un depósito de fibrina con una distribución homogénea de conjugado por todo el depósito. Por otro lado, si se pretende colocar el conjugado principalmente en la superficie del depósito de fibrina, la unión del conjugado debe permitirse después de la formación del coágulo de fibrina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un depósito para una sustancia farmacéuticamente activa que comprende un conjugado según la presente invención y fibrina (por ejemplo, una matriz de fibrina adecuada). Tal depósito se puede obtener, por ejemplo, mediante la administración de un conjugado según la presente invención en una base de red de fibrina.

Por tanto, se proporciona un depósito de la sustancia farmacéuticamente activa con propiedades de liberación adecuadas que permite el tratamiento adecuado del paciente con la sustancia farmacéutica, sin tener que proporcionar esta sustancia de manera continua y por separado.

A continuación se explica la invención con más detalle mediante los ejemplos y figuras ilustrativas.

Ejemplos

En los presentes ejemplos el factor de necrosis tumoral (TNF), como ejemplo de cualquier sustancia farmacéuticamente activa, se acopla vía un anticuerpo de TFN comercial a una sustancia de unión a fibrina. Como ejemplos de sustancias que tienen una fracción de unión fibrina/fibrinógeno, se seleccionan trombina y fibronectina. El acoplamiento del anticuerpo a la trombina y la fibronectina se ha llevado a cabo con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Con este tipo de reacción, se activan los grupos carboxilo de un componente de acoplamiento con EDC; estos grupos carboxilo reaccionan con los grupos amino del otro componente. Debido a que las propiedades de las fracciones pueden ser diferentes dependiendo de qué componente se activa en primer lugar, siempre se investigan ambas posibilidades o variaciones. En los ejemplos siguientes, conjugado A-B significa que el componente A es el componente que se activa en los grupos carboxilo y el componente B se une vía su grupo amino. La prueba de un acoplamiento y una detección satisfactorios de las afinidades de unión individuales (anticuerpo-TFN, trombina/fibronectina-fibrina) se analizó mediante ELISA-sándwich.

Ejemplo 1

Acoplamiento del anticuerpo TNF a trombina - Ejemplo de Referencia

Un anticuerpo TFN comercial se acopló a la trombina vía EDC. La prueba de acoplamiento y las afinidades de unión individual de los conjugados se detectaron mediante ELISA-sándwich (fig. 1). Brevemente, se revistió una placa microtitulada con fibrinógeno y posteriormente se incubó con un complejo (anticuerpo trombina-TFN o anticuerpo TNF-trombina), con TNF, con un anticuerpo TNF secundario y con un conjugado enzimático que reconoce el anticuer-

po secundario. Esta enzima transforma un sustrato incoloro en un compuesto coloreado que luego se puede detectar. El cambio del sustrato sólo es posible si ambos componentes (anticuerpo y trombina TNF) se han acoplado de manera covalente por la reacción de EDC y se han conservado ambas afinidades de unión. Trombina-anticuerpo TNF, así como anticuerpo TNF-trombina dan reacción positiva en este sistema (fig. 2). El anticuerpo TNF sin modificar utilizado como control no pudo unir TNF a la matriz de fibrinógeno.

Ejemplo 2

Acoplamiento del anticuerpo TNF a fibronectina - Ejemplo de Referencia

Un anticuerpo TFN comercial se acopló a fibronectina usando EDC. La prueba de acoplamiento y las afinidades de unión individual de los conjugados se realizaron mediante ELISA-sándwich (fig. 3) como en el Ejemplo 1. El anticuerpo TNF-fibronectina, así como el anticuerpo TNF-fibronectina mostraron reacción positiva en el presente sistema (fig. 4). Una mezcla del anticuerpo TNF y la fibronectina como control mostraron únicamente poca unión de TNF a la matriz de fibrinógeno.

Ejemplo 3

Liberación retardada del TNF de un coágulo de adhesivo tisular - Ejemplo de Referencia

La prueba para el retardo efectivo de TNF en un coágulo de adhesivo tisular a base de fibrinógeno se llevó a cabo mediante la adición de TNF y un complejo anticuerpo TNF-fibronectina, tal como se describe en el Ejemplo 2, al componente de fibrinógeno de un sellador de fibrina. En experimentos de control, se añadieron TNF y una mezcla de fibronectina y anticuerpos TNF a este componente de fibrinógeno. Los coágulos de fibrina se elaboraron con tales componentes de fibrinógeno modificados y se transfirieron a PBS 60 minutos después de la coagulación. Los coágulos se incubaron después a 37ºC y los sobrenadantes de PBS se sustituyeron por PBS fresco en períodos de tiempo definidos. Se detectó el contenido de TNF en estos sobrenadantes (fig. 5). Después de 12 días, los coágulos se lisaron con uroquinasa y se detectó el contenido en TNF del lisado.

La adición del complejo anticuerpo TNF-fibronectina al componente de fibrinógeno del adhesivo tisular dio como resultado un retraso significativo de la liberación de TNF en comparación con la adición de una mezcla de anticuerpo TNF-fibronectina. Esto se demostró mediante una liberación inicial reducida en los sobrenadantes de PBS (días 1-3), así como por un mayor contenido en TNF en el coágulo lisado después de 12 días de incubación en PBS (fig. 5). Dado que los coágulos de fibrina sólo se incubaron en PBS y no se expusieron a una digestión proteolítica, la liberación del TNF detectado se debió principalmente a la difusión desde el coágulo de fibrina. La incubación con la adición de proteasas (por ejemplo uroquinasa) da como resultado una liberación continua de TNF durante un período más largo de tiempo.

Ejemplo 4

Unión de aprotinina vía fibronectina - Ejemplo de Referencia

En base a la unión covalente de una sustancia activa, en este caso un inhibidor de fibrinolisis, a un anclador de unión a fibrina, en este caso fibronectina, se puede demostrar la liberación retardada del inhibidor de fibrinolisis de un coágulo de fibrina al medio circundante.

Se formó un conjugado fibronectina-aprotinina tal como se ha descrito anteriormente. Este conjugado se disolvió en el componente de fibrinógeno antes de la mezcla con trombina para garantizar una distribución homogénea del conjugado por el coágulo de fibrina. Los coágulos se incubaron en un tampón fosfato salino (PBS) a 37ºC. Los sobrenadantes de PBS se cambiaron varias veces y se comprobó la persistencia del coágulo visualmente o bien se determinó mediante la medición de la concentración de proteína en los sobrenadantes de PBS.

El conjugado de aprotinina-fibronectina aumentó la persistencia del coágulo en comparación con los coágulos de fibrina complementados con la misma actividad de aprotinina no conjugada. Este aumento en la persistencia del coágulo puede ser debida por una disminución de la liberación del conjugado del coágulo al PBS en comparación con la aprotinina no conjugada (fig. 6).

Ejemplo 5

Proteína de unión a fibrina bacteriana fbe- Ejemplo de referencia

Otro ejemplo de anclaje de unión a fibrina es la proteína bacteriana fbe de *Streptococcus epidermidis*. Esta proteína se expresa como una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) como parte activa. Los lisados de bacterias que expresan la proteína de fusión fbe-GST o sólo GST se ajustaron para contener la misma actividad de GST y se aplicaron a fibrinógeno o a placas ELISA recubiertas con BSA. El GST unido fue detectado por un anticuerpo antiGST. La proteína de fusión fbe-GST se une específicamente al fibrinógeno vía su dominio fbe. La proteína de fusión no se une a la seroalbúmina bovina (BSA), que sirve como control para la interacción proteína-proteína no específica. Solo el GST sin dominio fbe no se unió al fibrinógeno (fig. 7).

Ejemplo 6

ADN como anclador de fibrina/fibrinógeno - Ejemplo de Referencia

El ADN se une fuertemente a la fibrina/fibrinógeno. Por tanto, se embebió una parte de ADN en una matriz de sellador de fibrina y su afinidad a la fibrina/fibrinógeno originó una liberación lenta, aunque constante, de ADN durante un largo período de tiempo. Para los fines de la presente invención, preferentemente el ADN se utiliza en cualquier forma, lo que quiere decir ADN monocatenario o bicatenario, ADN lineal o circular, como una fracción de unión a fibrina/fibrinógeno. Para el presente experimento, se sintetizó un oligodesoxinucleótido monocatenario biotinilado (20 b) y un ADN bicatenario biotinilado (700 b). Las moléculas de ADN biotilinadas se mezclaron con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa para formar un complejo basado en la afinidad. Los complejos se aplicaron en placas de fibrinógeno o en placas ELISA recubiertas con BSA y se midió la actividad de de unión peroxidasa. La peroxidasa se unió de manera específica a los pocillos recubiertos de fibrinógeno vía el ADN como una fracción de unión fibrina/fibrinógeno. No se observó unión al BSA y, para evitar falsos resultados positivos debido a una unión no específica de estreptavidina-peroxidasa al ADN, se realizó un experimento control con ADN no biotinilado, no mostrando ninguna señal (fig. 8a y 8b).

Ejemplo 7

Trombina como anclador de fibrina/fibrinógeno - Ejemplo de Referencia

La trombina tiene actividad de escisión de fibrinógeno y una actividad de unión fibrina/fibrinógeno. Las dos actividades se encuentran en diferentes sitios de la molécula.

Para el presente experimento, se mezcló albúmina biotinilada con un coágulo de fibrina, bien como tal (= forma libre) o unido a través de un anclaje de trombina-PPACK (= D-Phe-Pro-Arg-clorometil cetona) (= forma unida de manera covalente). Se usó biotina como marcador para medir la liberación de ambas formas de la albúmina.

Como se muestra en la Figura 9, la albúmina unida de manera covalente se retardó en los coágulos selladores de fibrina durante 4 días, mientras que la albúmina libre se liberó en un 1 día.

Ejemplo 8

Proteína de Fusión Recombinante de Unión a Fibrina

La Figura 11 muestra la proteína de fusión recombinante producida para este ejemplo [SEQ ID NO: 1]. La parte C-terminal de $VEGF_{165}$, que es la parte de unión a fibrina de esta proteína de fusión, se funde en leptina, que es un ejemplo de sustancia farmacéuticamente activa. La proteína de fusión contiene un sitio de escisión de plasmina natural derivado de $VEGF_{165}$. En C146, el residuo final en la leptina de longitud completa se solapa al primer Cys del dominio C-terminal de $VEGF_{165}$.

El constructo de ADN que codifica la proteína de fusión leptina-$VEGF_{165}$ se insertó en el plásmido que se muestra en la figura 12 usando los sitios de restricción HindIII y PacI. El plásmido se transfectó después a *E. coli* y las bacterias expresaron la proteína de fusión.

La proteína de fusión se limpió de bacterias usando técnicas bien conocidas en el estado de la técnica de la ingeniería genética. La proteína de fusión se incorporó después al coágulo de fibrina, donde la fracción C-terminal de $VEGF_{165}$ se une a la fibrina del coágulo. El coágulo resultante forma un depósito para la liberación controlada de leptina, que se sabe que ayuda a la cicatrización de heridas. Cuando el coágulo se coloca en una herida, el plasminógeno natural del plasma del paciente que entra en la herida se transforma en plasmina, lo que a su vez escinde la proteína de fusión, liberando así la fracción de leptina para difundirse desde el coágulo con el fin de actuar sobre la cicatrización. Otro mecanismo de liberación se basa en la tasa de disociación del dominio C-terminal de $VEGF_{165}$ de fibrina; según este mecanismo, el conjugado completo se libera y difunde desde el coágulo, permitiendo a la fracción de leptina actuar en la herida, fuera del coágulo.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de unión fibrina/fibrinógeno que comprende una fracción de unión fibrina/fibrinógeno que comprende el dominio C-terminal de $VEGF_{165}$, y una sustancia farmacéuticamente activa, donde dicha fracción de unión fibrina/fibrinógeno se une de manera covalente a dicha sustancia farmacéuticamente activa siendo dicho conjugado una proteína de fusión recombinante.

2. Conjugado según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha sustancia farmacéuticamente activa se selecciona de entre el grupo formado por antibióticos, factores de crecimiento, receptores para componentes tisulares, sustancias adhesivas tisulares, proteínas plasmáticas, hormonas, heparinoides y sustancias de acción cicatrizante.

3. Kit para formar un depósito de una sustancia farmacéuticamente activa que comprende un adhesivo tisular basado en fibrinógeno y un conjugado de unión fibrina/fibrinógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

4. Kit según la reivindicación 3, que comprende además un componente que contiene un agente capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina.

5. Kit según la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicho componente que contiene un agente capaz de transformar el fibrinógeno en fibrina es una preparación de trombina.

6. Kit según la reivindicación 3, **caracterizado** porque comprende además dispositivos para administrar dicho adhesivo tisular y dicho conjugado a un sitio de depósito.

7. Utilización de un conjugado de unión fibrina/fibrinógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento en la producción de un depósito de una sustancia farmacéuticamente activa, mediante la administración de dicho conjugado a un sitio de depósito junto con una preparación de fibrinógeno, lo que permite transformar dicho fibrinógeno en fibrina, gracias a lo cual se forma un coágulo de fibrina, y permite unir dicho conjugado a dicho fibrinógeno dentro de dicho coágulo de fibrina.

8. Utilización de un conjugado de unión fibrina/fibrinógeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento en la producción de un depósito de una sustancia farmacéuticamente activa, mediante la administración de dicho conjugado a un sitio de depósito junto con una preparación de fibrinógeno, lo que permite transformar dicho fibrinógeno en fibrina, gracias a lo cual se forma un coágulo de fibrina, y permite unir dicho conjugado a dicho coágulo de fibrina.

9. Utilización según la reivindicación 8, **caracterizada** porque dicha transformación de dicho fibrinógeno en fibrina se lleva a cabo mediante la adición de un agente capaz de transformar tal fibrinógeno en fibrina.

10. Utilización según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicho agente es una trombina exógena.

11. Depósito para una sustancia farmacéuticamente activa que comprende fibrina y el conjugado de unión fibrina/fibrinógeno según la reivindicación 1 ó 2.

12. Depósito para una sustancia farmacéuticamente activa según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dicho depósito se obtiene mediante la administración de dicho conjugado a un sitio de depósito junto con una preparación de fibrinógeno, lo que permite transformar dicho fibrinógeno en fibrina, gracias a lo cual se forma un coágulo de fibrina, y permite la unión de dicho conjugado a dicho fibrinógeno o dicho coágulo de fibrina.

Figura 1

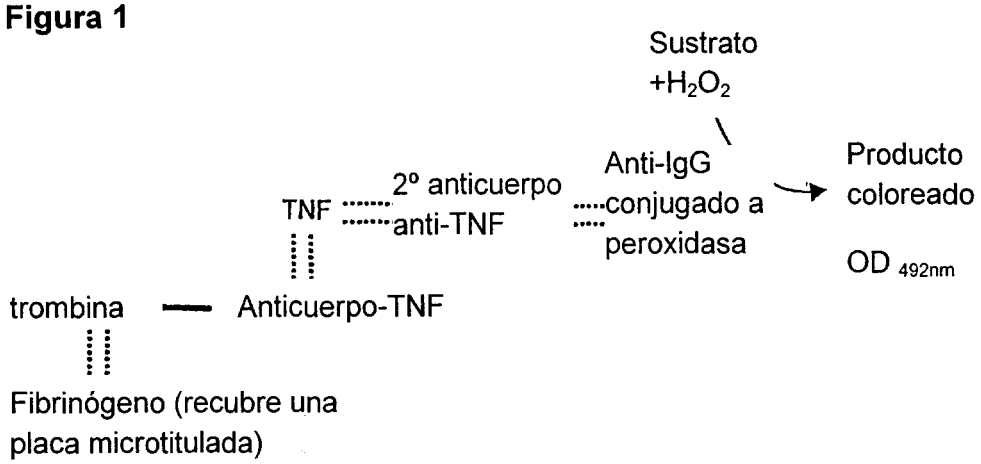

Sustrato
+H2O2
Anti-IgG
conjugado a
peroxidasa
Producto
coloreado
OD 492nm
2º anticuerpo
anti-TNF
TNF
trombina
Anticuerpo-TNF
Fibrinógeno (recubre una
placa microtitulada)

Figura 2

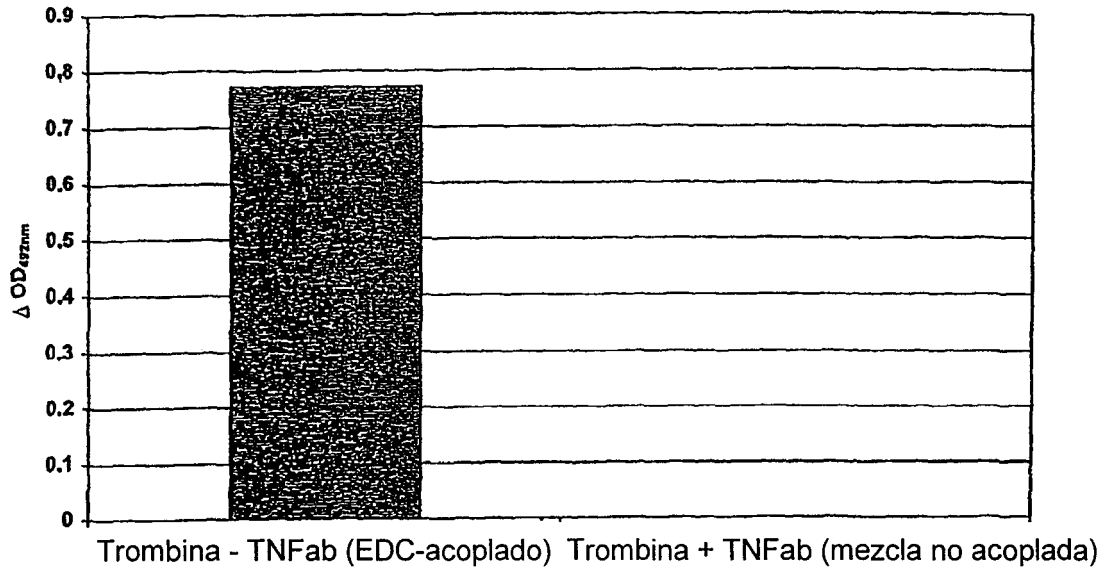

0.9
0,8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Δ OD492nm
Trombina - TNFab (EDC-acoplado)
Trombina + TNFab (mezcla no acoplada)

Figura 3

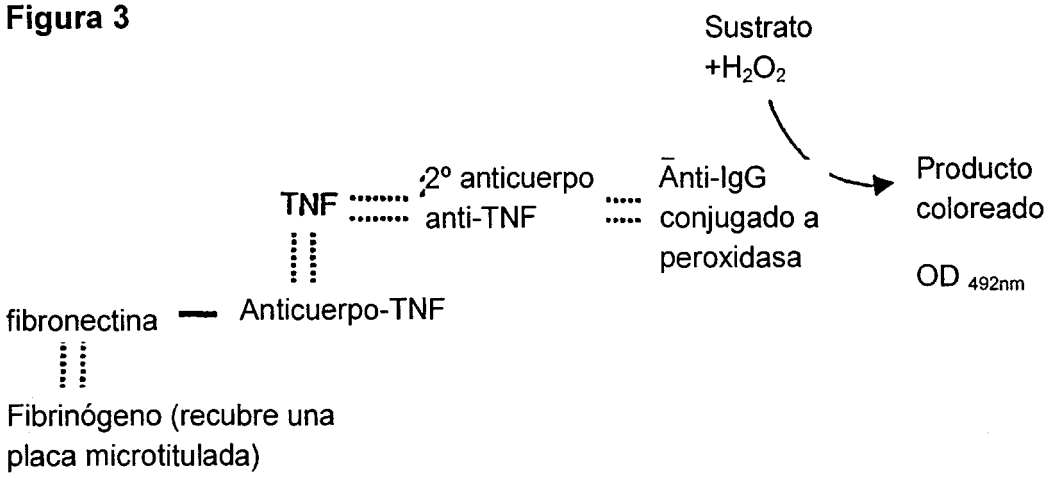

Sustrato
+H2O2
TNF
2º anticuerpo
anti-TNF
Anti-IgG
conjugado a
peroxidasa
Producto
coloreado
OD 492nm
fibronectina
Anticuerpo-TNF
Fibrinógeno (recubre una
placa microtitulada)

Figura 4

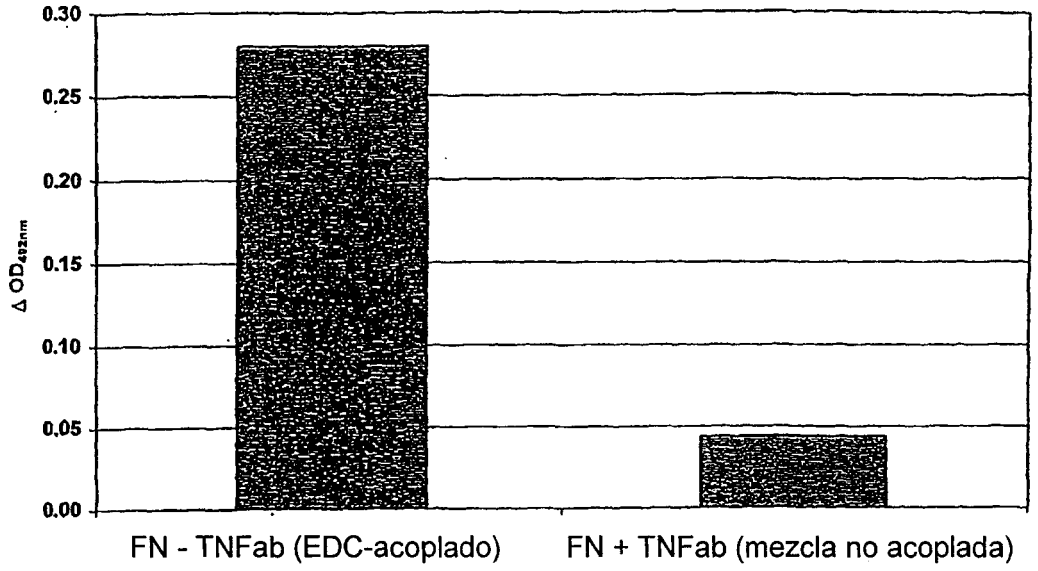

0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Δ OD492nm
FN - TNFab (EDC-acoplado)
FN + TNFab (mezcla no acoplada)

Figura 5

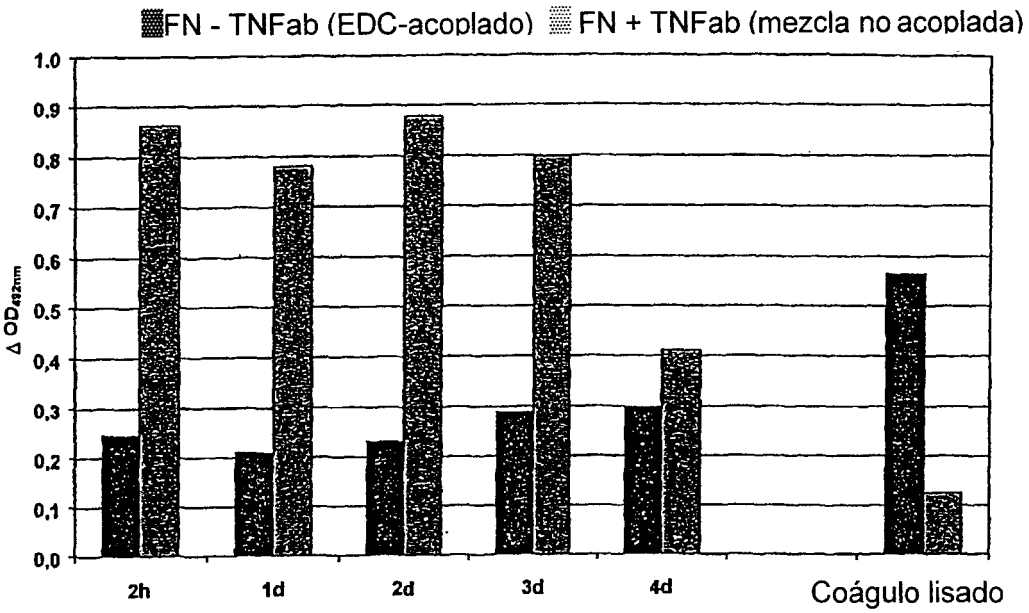

FN - TNFab (EDC-acoplado)
FN + TNFab (mezcla no acoplada)
1.0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
Δ OD492nm
2h
1d
2d
3d
4d
Coágulo lisado

Figura 6

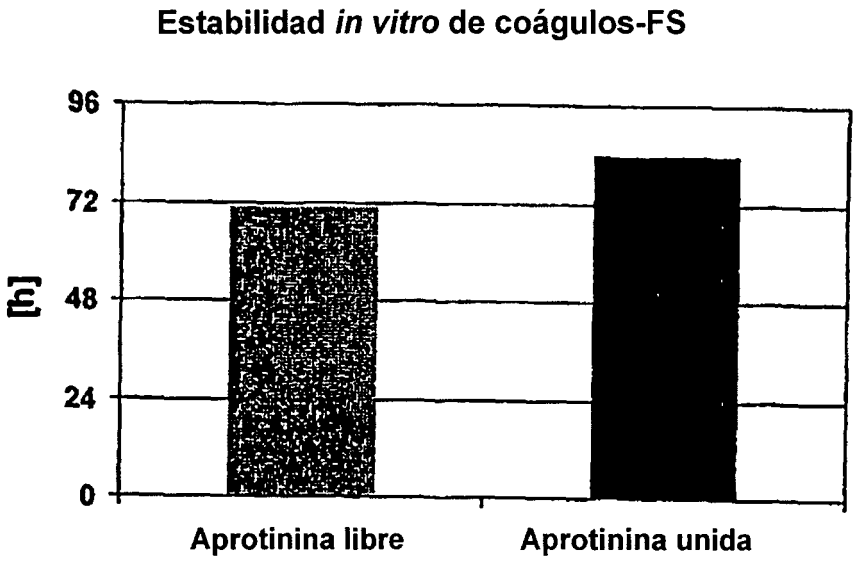

Estabilidad *in vitro* de coágulos-FS
96
72
48
24
0
[h]
Aprotinina libre
Aprotinina unida

Figura 7

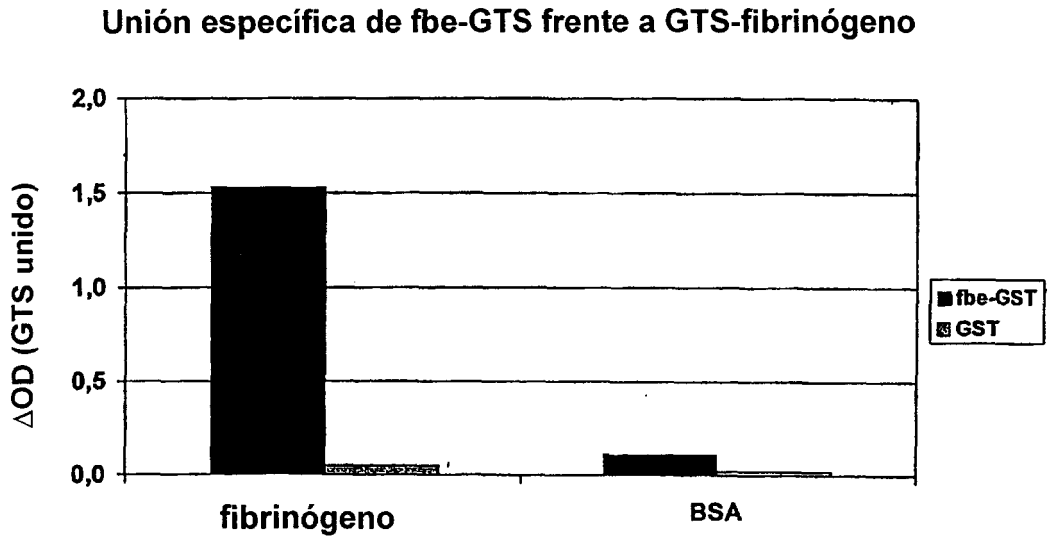

Unión específica de fbe-GTS frente a GTS-fibrinógeno
ΔOD (GTS unido)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
fibrinógeno
BSA
fbe-GST
GST

Figura 8a

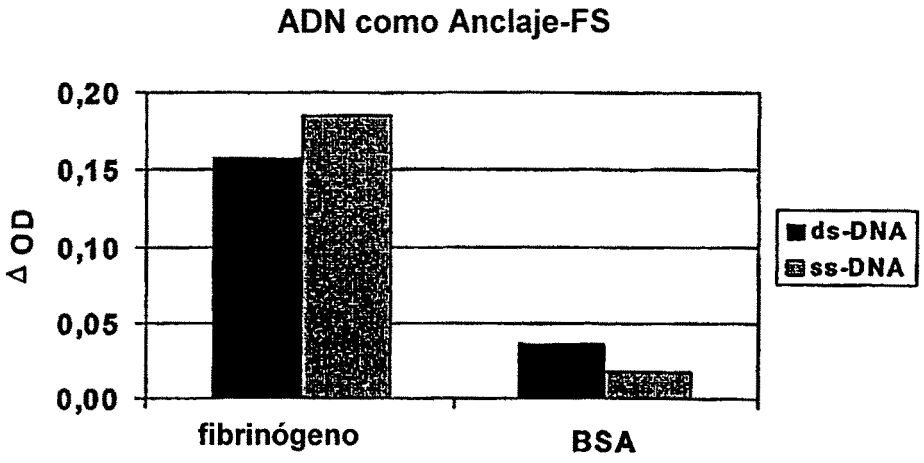

ADN como Anclaje-FS
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Δ OD
fibrinógeno
BSA
ds-DNA
ss-DNA

Figura 8b

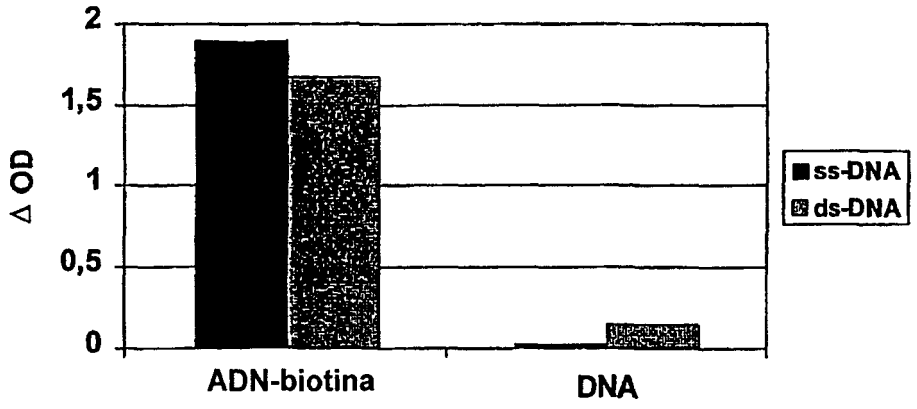
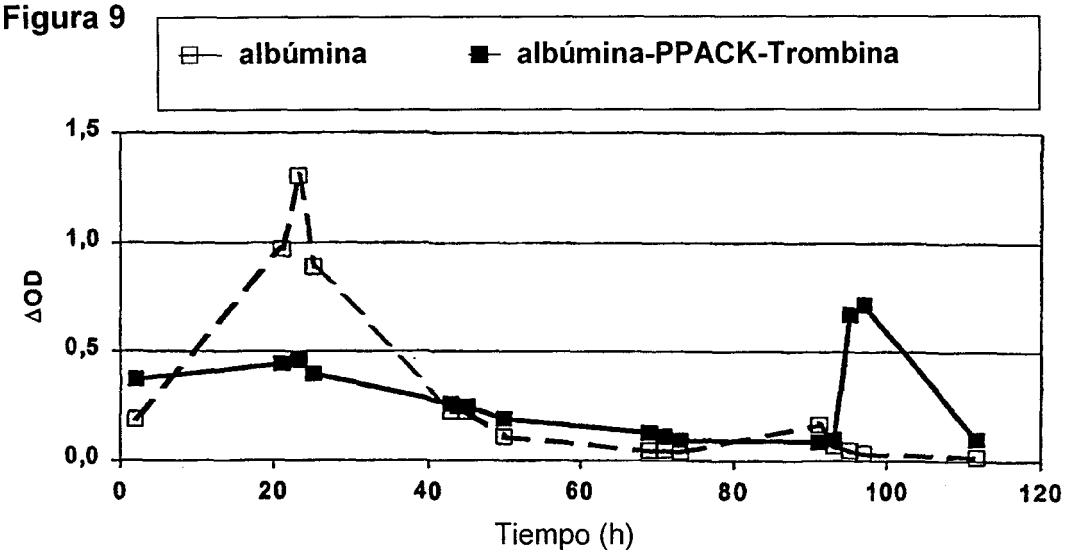


Figura 9


albúmina
albúmina-PPACK-Trombina
1,5
1,0
0,5
0,0
ΔOD
0
20
40
60
80
100
120
Tiempo (h)

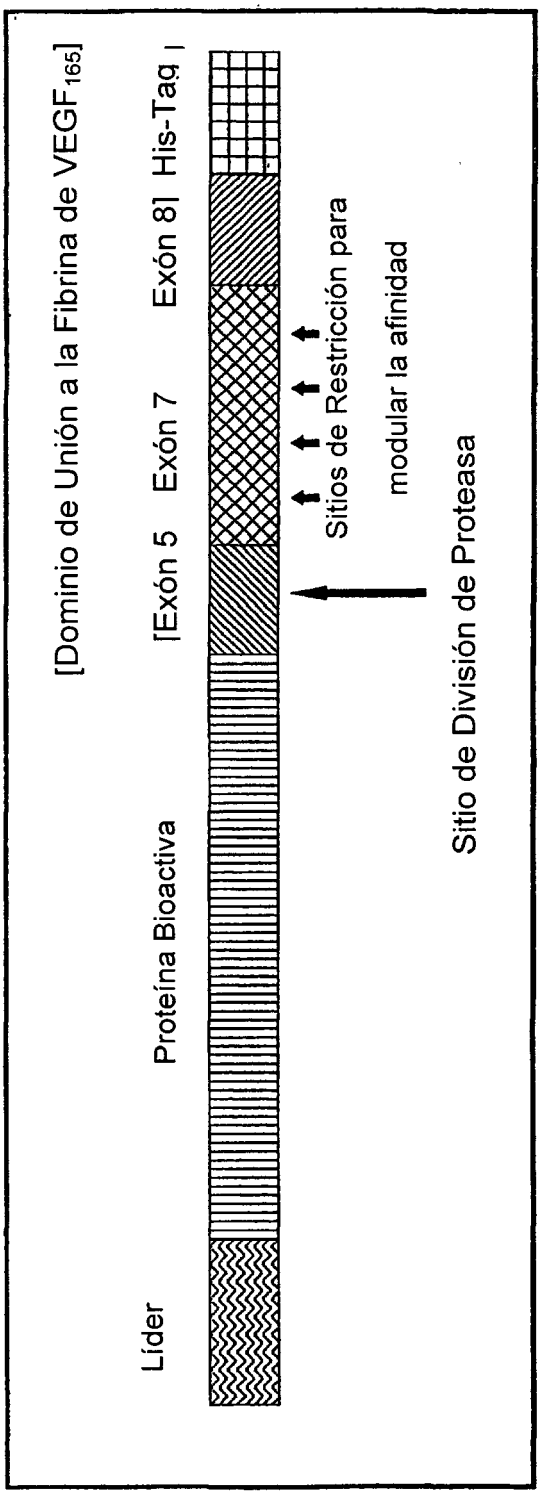

Proteína de Fusión Recombinante de Unión a Fibrina (Sistema de Expresión E. coli)
[Dominio de Unión a la Fibrina de VEGF165]
Líder
Proteína Bioactiva
[Exón 5
Exón 7
Exón 8]
His-Tag
Sitios de Restricción para modular la afinidad
Sitio de División de Proteasa

Figura 10

Figura 11

Proteína de Fusión de Leptina – VEGF – HisTag

(M)$^{+1}$VPIQKVQDDTKTLIKTIVTRINDISHTQSVSSKQKVT

GLDFIPGLHPILTLSKMDQTLAVYQQILTSMPSRNVIQIS

NDLENLRDLLHVLAFSKSCHLPEASGLETLDSLGGVLEAS

GYSTEVVALSRLQGSLQDMLWQLDLSPGCRPKKDR|ARQEN

PCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNE

RTCRCDKPRRHHHHHH^{+214}

Leyenda:

( ) Iniciador de metionina en posición – 1

□ Mutación W100

O Residuo de cisteína superpuesto – unión entre leptina y VEGF

| Sitio de división de plasmita

— Hist Tag

ES 2 328 452 T3

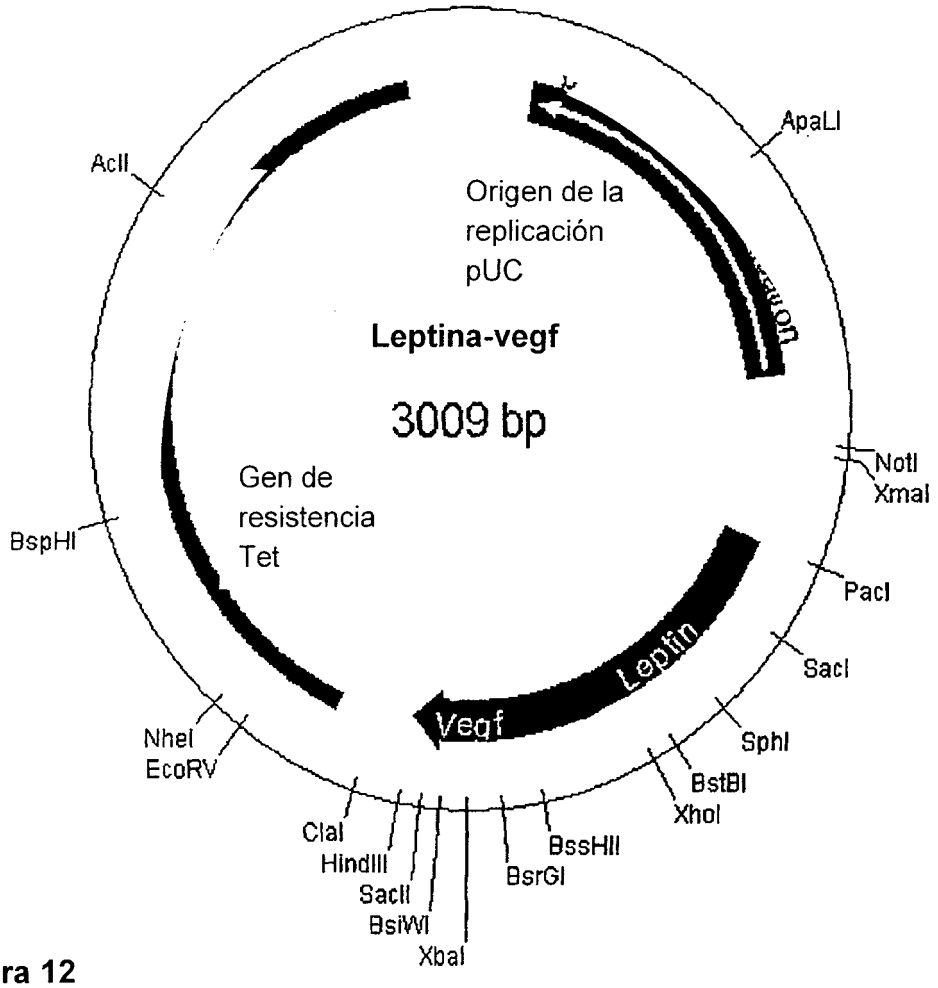

ApaLI
AclI
Origen de la
replicación
pUC
Leptina-vegf
3009 bp
Gen de
resistencia
Tet
NotI
XmaI
BspHI
PacI
SacI
Leptin
Vegf
SphI
NheI
EcoRV
BstBI
XhoI
ClaI
HindIII
SacII
BsiWI
BssHII
BsrGI
XbaI

Figura 12