



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 196**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98930651 .9**

96 Fecha de presentación : **26.06.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1005361**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2000**

54

Título: **Uso de FVIIa o FVIIai para el tratamiento de disfunción endotelial y para la inhibición de angiogénesis, respectivamente.**

30

Prioridad: **18.07.1997 DK 879/97**

73

Titular/es: **Novo Nordisk Health Care AG.**
Andreasstrasse 15
8050 Zürich, CH

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2010

72

Inventor/es: **Kongsbak, Lars;**
Bergenheim, Niels;
Petersen, Lars, Christian;
Thastrup, Ole y
Foster, Don

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2010

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 339 196 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 de FVIIa o FVIIai para el tratamiento de disfunción endotelial y para inhibición de angiogénesis, respectivamente.

5 **Campo de invención**

Se ha descrito un nuevo factor VII (FVII) intracelular señalando actividad de coagulación en células expresando factor tisular (TF). La presente invención se refiere al uso de FVIIa u otro agonista del TF, o FVIIai u otro antagonista de TF para la preparación de un medicamento para la modulación de la activación inducida por FVIIa de la vía de señalización MAPK en un paciente.

10 **Antecedentes de la invención**

15 La vía extrínseca de coagulación sanguínea se inicia cuando el FVIIa que circula en el plasma se enlaza con la proteína de membrana integral, el factor tisular (TF). El papel del TF en la coagulación sanguínea se ha estudiado de forma extensiva (Camerer, E., A. B. *et al.* *Thromb. Res.* 81: 1-41; (1996)). La implicación de FVIIa como una enzima proteolítica en la cascada de la coagulación sanguínea se cree que está reducida al folíolo extracelular de las células expresando el TF. Una actividad intracelular de FVIIa se implicó en primer lugar cuando la secuencia del TF mostró homología con la superfamilia de los receptores de citocina/interferón o hematopoyéticos (Bassoon, J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6934-6938; (1990)). La subclase I de la familia del receptor hemotopoyético incluye receptores para la hormona del crecimiento, la prolactina, las interleukinas 1 a 7, factores estimulantes de colonias de granulocitos macrófagos, la eritropoítina y la trombopoítina. La subclase II incluye TF y receptores para el interferón α y β (Wells, J.A., y De Vos, A.M. *Annu. Rev. Biomol. Struct.* 22: 329-351; (1993)).

25 La similitud del TF con esta clase de receptores se corroboró con el aspecto de la estructura cristalina (Harlos, K., D. M. A. *et al.* *Nature* 370: 662-666; (1994), Mueller, Y. A., M. H. *et al.* *Biochemistry* 33: 10864-10870 (1994)). Es característico de esta clase de receptores de citoquina que incluyen receptores para interferón β y γ y IL-10 (Mott, H. R. and Campbell, I. D. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 114-121; (1995)) es que su activación lleva a una rápida fosforilación de tirosina de los receptores mismos, al igual que un subconjunto de proteínas intracelulares. En unos minutos tras de la fosforilación de la tirosina inicial se activa un conjunto de kinasas activadas con mitógeno (Ser/Thr) (MAPK) (Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. *J. Mol. Med.* 74:589-607; (1996)). Estas kinasas están dispuestas en diferentes vías de señalización paralelas (David, M. *et al.* *Science* 269, 1721 (1996); *Current opin. immunol.* 8, 402-11 (1996)). Estudios profundos de la capacidad de señalización putativa intracelular de FVIIa han mostrado que éste induce a la movilización del calcio libre intracelular (Ca^{2+}) en la línea celular del carcinoma de la vejiga humana, J82, que expresa constitutivamente TF y en células endoteliales de la vena umbilical que se pretrataron con interieukin-1 para expresar el TF (Rottingen, J.-A. *et al.* *J. Biol. Chem.* 270: 4650-4660; (1995), pero no ha mostrado ninguna activación de tipo citoquina de tirosinas kinasas intracelulares (Camerer, E., *et al.* *J. Biol. Chem.* 271: 29034-29042; (1996)). En conclusión se cree que FVIIa, en una manera dependiente de TF, que induce a la movilización de Ca^{2+} intracelular mediante la activación de la fosfolipasa C (Camerer, E., *et al.* *J. Biol. Chem.* 271: 29034-29042; (1996)). El mecanismo mediante el cual FVIIa activa la fosfolipasa C no se conoce, pero Camerer *et al.* excluyó específicamente la activación de la tirosina kinasa.

30 **Resumen de la invención**

45 La presente invención se refiere al uso de FVII y/o FVIIa y/o otro TF agonista y/o FVIIai y/o otro TF antagonista para la producción de una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento terapéutico de condiciones patológicas que pueden estar relacionadas con o tratadas por la activación específica o la inhibición de la vía de señalización intracelular mediada por FVIIa.

50 Conforme a la presente invención se ha demostrado que la unión de FVIIa con su receptor TF induce a la activación de la vía de la proteína kinasa activada por mitógeno (kinasa MAP) incluyendo la fosforilación de tirosinas en MAPK/Erk1. El TF se conoce por jugar un papel pertinente en la patogénesis de varios estados de enfermedad donde la interferencia reguladora en el nivel intracelular se cree provechosa.

55 Así, los estados de enfermedad que pueden tratarse son condiciones patológicas tales como la herida mecánica de vasos sanguíneos, aterosclerosis, isquemia/reperfusión, infección bacteriana, deposición de tumor, o estímulos inducidos por "factores de estrés" tales como citoquinas, fumar, presión sanguínea alta, niveles altos de lípidos o glucosa, productos finales de glicosilación avanzada, y lipopolisacáridos bacterianos.

60 **Lista de figuras**

La Figura 1 muestra el efecto de iones de zinc en la actividad del factor VIIa estimulado por TF que se muestra en ausencia (control) y en presencia de 0,2 mM de cistin dihidroxamato. La actividad del factor VIIa se midió con el sustrato cromogénico S2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-p-nitroanilida). La actividad de 10 nM de FVIIa en presencia de 50 nM de TF_{1-218} (Dr W. Kiesel, Universidad de Nuevo Méjico, Albuquerque, NM) se midió en un tampón conteniendo 50 mM de TrisCl a pH 7.4, 0,1 M de NaCl, 1 mM de $CaCl_2$, 0,05% de Tween 20 y 0,4 mM de S2288. La actividad se midió a temperatura ambiente como el cambio de absorbencia a 405 nm.

ES 2 339 196 T3

Las Figuras 2A e 2B muestran la activación de la expresión del gen indicador SRE inducida por FVIIa al unirse con TF humano.

La Figura 3 muestra la estimulación de células BHK-TF/KZ136 estimuladas con FVIIa con y sin un tratamiento previo con el inhibidor MEK1/2 PD98059. PB98059 se mantuvo a 50 μ M a lo largo de todo el experimento.

Las Figuras 4A y 4B muestran la activación específica del factor transcripcional Elk1:

4A) La superposición de la imagen luminosa transmitida y la imagen fluorescente mostrando la eficiencia de la transfección.

4B) Los LCPS obtenidos a partir de BHK-TF células transitoriamente modificadas con los dos sistemas híbridos con Gal4-Elk1 y gal4-luciferasa.

Las Figuras 5A e 5B muestran la activación de MAPK p44/42: línea celular BHK TF 103 #11-2; Filas 3-8: Estimulación con 100 nM de FVIIa durante el período de tiempo indicado.

Las Figuras 6A e 6B muestran la activación de MAPK p44/42: línea celular ECV-304 (ATCC CRL-1998); células IL-1 β estimuladas (Filas 2-5) y no estimuladas (filas 7-9) expuestas a 20 nM de FVIIa durante el período de tiempo indicado.

Las Figuras 7A e 7B muestran la activación de MAPK p44/42: línea celular MDCK (ATCC CCL-34) expuesta a 10 nM de FVIIa (Filas 1-5) y 10 nM de FVIIai (Fila 6) durante el período de tiempo indicado.

La Figura 8 ilustra la competencia experimentada entre FVIIa y FVIIai en las células BHK-TF/KZ136.

Las Figuras 9A e 9B muestran la activación transitoria de MAPK p44/42. La Figura 10 muestra una señalización inducida por FVIIa a través de la vía MAPK usando TF truncado (TF carente del extremo C-terminal).

30 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de FVII o FVIIa u otro agonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para inducir o mejorar la activación de la vía de señalización MAPK en el tratamiento de heridas conduciendo a disfunción endotelial en un paciente, en particular donde la fosforilación de MAPK/Erk1/2 conduce a la activación del factor de transcripción Elk1.

La presente invención también se refiere al uso de FVII, FVIIa u otro agonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para mejorar la activación inducida por FVIIa de la vía de señalización MAPK en el tratamiento de heridas conduciendo a disfunción endotelial en un paciente.

En otro aspecto ulterior la presente invención se refiere al uso de FVIIai u otro antagonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para la inhibición de la angiogénesis.

En otro aspecto ulterior la presente invención se refiere al uso de FVIIai u otro antagonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para la inhibición de la angiogénesis.

En una forma de realización de la presente invención se refiere al uso de FVIIa u otro agonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de la re-endotelización, la revascularización colateral en la isquemia/reperfusión en la microangiopatía diabética del infarto miocárdico.

En una forma de realización particular la cantidad eficaz es una dosificación diaria de aproximadamente 5 μ g/kg/día hasta aproximadamente 500 μ g/kg/día.

En otra forma de realización el antagonista de TF comprende un zinc quelador que se enlaza con FVIIa.

La presente invención proporciona un mecanismo para una actividad intracelular de FVII y/o FVIIa que se refiere a la estimulación de la vía de señalización MAPK. Tal mecanismo proporciona la base para establecer la implicación de FVII y/o FVIIa en condiciones patológicas en las cuales participan células de expresión de TF tales como células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, células de músculo liso y monocitos/macrófagos. La invención además proporciona la base para identificar objetivos específicos farmacológicos dentro de la vía de señalización intracelular mediada por FVIIa que es útil para la intervención terapéutica.

Así, la presente invención se refiere al uso de FVII y/o FVIIa y/o FVIIai para la producción de una composición farmacéutica para el uso en el tratamiento terapéutico de condiciones patológicas que puede relacionarse con o tratarse por activación específica o inhibición de la vía de señalización intracelular mediada por FVIIa.

Conforme a la presente invención se ha demostrado que la unión de FVIIa con su receptor de TF induce a la activación de la vía de kinasa de la proteína activada por mitógeno (kinasa MAP) incluyendo la fosforilación de

tirosinas en MAPK/Erk1/2 conduciendo a la activación del factor de transcripción TFC/Elk1. TF se conoce por jugar un papel pertinente en la patogénesis de varios estados de enfermedad donde la interferencia reguladora en el nivel intracelular se cree provechosa.

5 La modulación de la señalización inducida por FVIIa puede ser particularmente útil en sitios vasculares donde la herida en su sentido más amplio conduce a la disfunción endotelial. Tal daño puede incluir herida mecánica, aterosclerosis, isquemia/reperfusión, infección bacteriana, deposición de tumor, o estímulos inducidos por “factores de tensión” tales como citoquinas, fumar, presión sanguínea alta, niveles altos de glucosa o de lípidos, productos finales de glicosilación avanzada, lipopolisacáridos bacterianos, etc. Todos conduciendo a complicaciones vasculares y disfunción
10 endotelial caracterizada en el nivel celular por una interacción complicada entre células inflamatorias, células vasculares y componentes del sistema de coagulación, el sistema del complemento y el sistema fibrinolítico. El reclutamiento de leucocitos para tales sitios de endotelio disfuncional es un componente importante de la respuesta huésped para la herida extravascular. En la ubicación, liberación y expresión de superficie de varios productos de leucocitos se ayuda a coordinar la respuesta inflamatoria. La expresión local de TF en diferentes células, incluyendo monocitos, macrófagos, fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales y células de tumor se conoce la contribución significativa
15 para el desarrollo de esta respuesta, y TF se ha implicado como un receptor regulador importante en el desarrollo de diferentes estados de enfermedad.

20 Generalmente, los componentes de la sangre que participan en lo que se ha referido como la “cascada” de coagulación son proenzimas o zimógenos, proteínas enzimáticamente inactivas, que se convierten en enzimas proteolíticas por la acción de un activador, mismamente un factor de coagulación activado. Factores de coagulación que han experimentado tal conversión y generalmente referidos como “factores activos”, y se designan por la adición de la letra “a” al nombre del factor de coagulación (p. ej. factor VIIa).

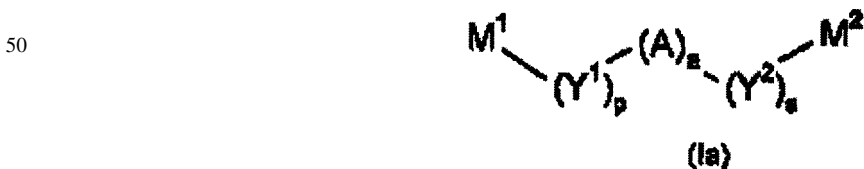
25 El término “zinc quelador” se destina a comprender un compuesto que se enlaza con el factor VIIa e induce a la sustitución de iones de calcio por iones de zinc dentro del factor VIIa, inhibiendo de ese modo la actividad del factor VIIa o del complejo factor tisular-factor VIIa (TF-FVIIa).

30 Un antagonista de TF adecuado según la invención puede ser un compuesto quelante de zinc, p. ej. un dihidroxamato o una dihidracida con los grupos de hidroxamato o de hidracida localizados en relación entre sí en tal posición que estos son capaces de quelar un ión de zinc. El compuesto quelante de zinc actúa en combinación con FVIIa. Los iones de Zn^{2+} ejercen su acción inhibitoria en competencia con un efecto estimulador de iones de Ca^{2+} . Se predice que los iones de Zn^{2+} desplazan los iones de Ca^{2+} de uno o más sitio(s) de unión de calcio dentro de FVIIa. Compuestos
35 quelantes de zinc, p. ej. hidroxamatos e hidrazidas, son capaces de actuar como potentes soportes para unir iones de zinc en competencia con iones de calcio. Compuestos específicos potencian de ese modo la inhibición de zinc de la actividad del complejo factor VIIa/factor tisular. La actividad del factor VIIa en complejo con factor tisular puede inhibirse por un mecanismo en el cual un zinc quelador se enlaza con factor VIIa y facilita la sustitución de Ca^{2+} por Zn^{2+} . Por esta acción el quelador ejerce un efecto modulador en el TF en la concentración normal de iones libres de Ca^{2+} y Zn^{2+} en la sangre.

40 *Demostración de que un quelador adecuado potencia la inhibición de zinc de la actividad del factor VIIA/factor tisular*

45 La Figura 1 muestra que el efecto de los iones de zinc para abolir la formación del complejo FVIIa-TF se potencia profundamente por el zinc quelador, cistindihidroxamato.

En una forma de realización, el zinc quelador es un compuesto de la fórmula general Ia



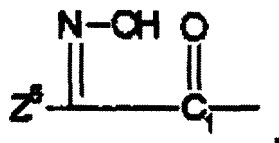
donde

60 M^1 es heteroarilo, un grupo de la fórmula



o un grupo de la fórmula

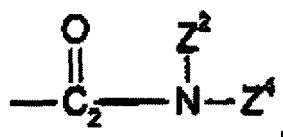
5



10

M² es heteroarilo, o un grupo de la fórmula

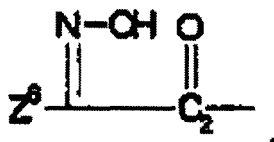
15



20

o un grupo de la fórmula

25



30

35 Z¹, Z², Z³ y Z⁴ independientemente el uno del otro son hidrógeno, C₁₋₄alquil, hidroxi, amino o un enlace de valencia fijado a A,

Z⁵ y Z⁶ representan un >C=O, que se fija a A,

40 Y¹ y Y² independientemente el uno del otro son un grupo de la fórmula -X¹~X²~X³-, donde - independientemente el uno del otro significan un enlace único o doble, y X¹ representa >C=O, >CHR⁵, >CH₂, >CH- o un enlace de valencia, donde R⁵ es hidrógeno, alquilo C₁₋₄, amino, alquil-amino C₁₋₄, o di(C₁₋₄ alquil)amino, X² representa -NH-, >N-, >CH₂ o >CH-, y X³ representa S, >CH₂, >CH- o un enlace de valencia,

45 A es arilo o heteroarilo,

p, a y s independientemente el uno del otro son 0 o 1;

o una sal derivada farmacéuticamente aceptable;

50

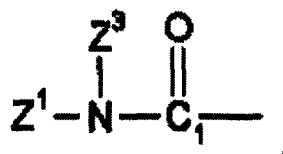
con las condiciones de que a+p+s sea al menos 1.

55 En una forma de realización del compuesto anterior de la fórmula general Ia, M¹ y M² son independientemente el uno del otro piridinilo, tal como piridin-2-il. En una forma de realización preferida sólo uno de M¹ y M² son piridinilo, tal como piridin-2-il.

60

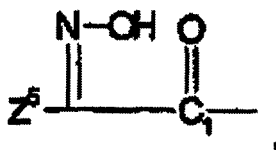
En una segunda forma de realización del compuesto anterior de la fórmula general Ia, M¹ es un grupo de la fórmula

65

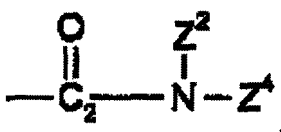


ES 2 339 196 T3

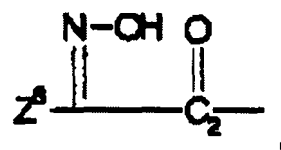
donde Z^1 y Z^3 independientemente el uno del otro son tal y como se han definido anteriormente, o un grupo de la fórmula



donde Z^5 es un $>\text{C}=\text{O}$ fijado a A.



del compuesto anterior de la fórmula general Ia, M^2 es un grupo del donde Z^2 y Z^4 independientemente el uno del otro son tal y como se han definido anteriormente, o un grupo de la fórmula



donde Z^6 es un $>\text{C}=\text{O}$ fijado a A.

En otra forma de realización del compuesto anterior de fórmula general Ia, la distancia entre C_1 y C_2 es de aproximadamente 0,37 nm hasta aproximadamente 0,47 nm.

En otra forma de realización más del compuesto anterior de la fórmula general Ia, la distancia entre C_1 y C_2 es de aproximadamente 0,47 nm hasta aproximadamente 0,57 nm.

En otra forma de realización del compuesto anterior de la fórmula general Ia, la distancia entre C_1 y C_2 es de aproximadamente 0,57 nm hasta aproximadamente 0,67 nm.

En otra forma de realización más del compuesto anterior de la fórmula general Ia, la distancia entre C_1 y C_2 es de aproximadamente 0,67 nm hasta aproximadamente 0,77 nm.

En otra forma de realización del compuesto anterior de la fórmula general Ia, la distancia entre C_1 y C_2 es de aproximadamente 0,37 nm hasta aproximadamente 0,77 nm, preferiblemente de aproximadamente 0,40 nm hasta aproximadamente 0,70 nm, más preferiblemente de aproximadamente 0,40 nm hasta aproximadamente 0,65 nm.

En otra forma de realización más del compuesto anterior de la fórmula general Ia, Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 son independientemente unos de otros hidrógeno, metilo, hidroxilo, amino o un enlace de valencia fijado a A. Preferiblemente Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 son independientemente unos de otros hidrógeno, hidroxilo, amino o un enlace de valencia fijado a A.

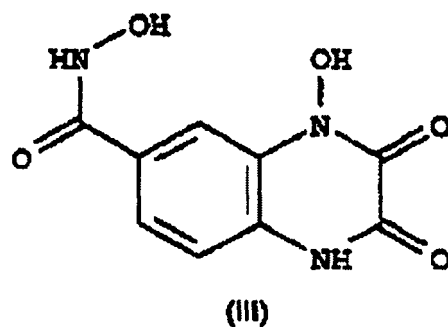
En otra forma de realización del compuesto anterior de la fórmula general Ia, Y^1 y Y^2 son independientemente unas de otras un grupo de la fórmula $-\text{X}^1 \sim \text{X}^2 \sim \text{X}^3$, donde \sim independientemente una de otra significan un enlace único o doble, y X^1 representa $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{CHR}^5$, $>\text{CH}_2$, $>\text{CH}$ - o un enlace de valencia, donde R^5 es hidrógeno, metilo, amino, metilamino, o di- metilamino, X^2 representa $-\text{NH}-$, $>\text{N}-$, $>\text{CH}_2$ o $>\text{CH}-$, y X^3 representa S, $>\text{CH}_2$, $>\text{CH}$ - o un enlace de valencia. Preferiblemente X^1 es $>\text{C}=\text{O}$, $>\text{CHR}^5$ o un enlace de valencia, donde R^5 es amino, X^2 es $-\text{NH}-$ o $>\text{CH}_2$ y X^3 es $-\text{S}-$ o un enlace de valencia.

En otra forma de realización más del compuesto anterior de la fórmula general Ia, A es fenilo, 1,2,3-triazolilo, 1 triazolilo, o pirazolilo.

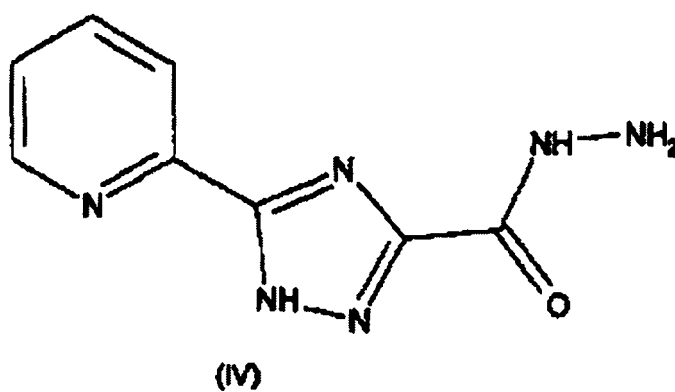
ES 2 339 196 T3

En una forma de realización particular del compuesto anterior de la fórmula general Ia, el compuesto se selecciona a partir de:

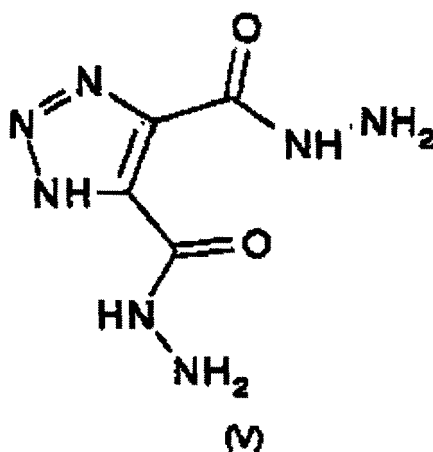
1-hidroxí-7-hidroxicarbamoilquinoxalina-2,3(1H,4H)-dion, teniendo la fórmula III



5-(2-piridil)-1,2,4-triazol-3-carbohidrazida, teniendo la fórmula IV



1,2,3-triazol-4,5-dicarbohidrazida, teniendo la fórmula

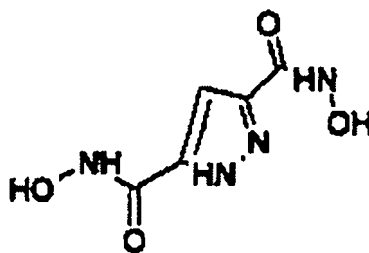


Pirazola-3,5-ácido dicarbohidroxámico, teniendo la fórmula VI

5

10

15

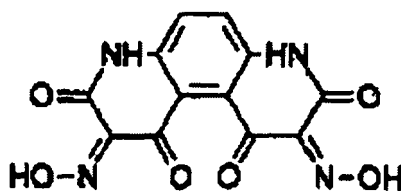


(VI)

4,7-Dihidro-[4,7]fenantrolina-1,2,3,8,9,10-hexaon-2,9-dioxime, teniendo la fórmula VII

20

25



(VII)

30

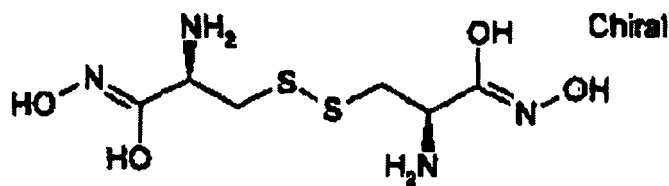
o

L-Cistina dihidroxamato, teniendo la fórmula VIII

35

40

45



(VIII)

50

Definiciones

El término "FVII" significa factor de coagulación VII de "cadena única"

55

El término "Factor VIIa", o "FVIIa" significa factor VII de coagulación activado "bicatenario" dividido por rotura específica en el enlace peptídico Arg152-Ile153. FVIIa, puede purificarse a partir de sangre o producirse por medios recombinantes. Es evidente que la práctica de los métodos descritos aquí es independiente de como se deriva el factor VIIa purificado y, en consecuencia, la presente invención se contempla para cubrir el uso de cualquier preparación de factor VIIa adecuada para su uso aquí. Se prefieren los FVIIa humanos.

60

El término "FVIIai" se destina a significar FVIIa teniendo al menos una modificación en su centro catalítico, cuya modificación inhibe sustancialmente la capacidad del FVIIa modificado para activar FX y FIX. Tal modificación incluye la sustitución de aminoácidos de uno o más de los residuos de la tríada catalítica Ser344, Asp142 y su 193, y también incluye la modificación de los residuos de la tríada catalítica con inhibidores de serina proteasa tales como compuestos organofosforados, sulfanilfluoruro, cetona de halometilo peptídico o azapéptidos. FFR ck FVIIa es un ejemplo de un derivado de FVIIai obtenido bloqueando el centro activo de FVIIa con el inhibidor irreversible, cetona de clorometilo de D-fenilalanina-L-fenilalanina-L-argininina.

65

ES 2 339 196 T3

El término “proteína kinasa” se destina a indicar una enzima capaz de fosforilizar serina y/o treonina y/o tirosina en péptidos y/o proteínas.

5 El término “vía de señalización MAPK” se destina a significar una cascada de eventos intracelulares que median la activación de Mitoógeno-Activado-Proteína-Kinasa (MAPK) y homólogos de la misma en respuesta a diferentes estímulos extracelulares. Se han identificado tres grupos diferentes de kinasas MAP en células mamíferas: 1) kinasa regulada extracelular (Erk), 2) kinasa de N-terminal c-Jun (JNK) y 3) kinasa p 38. La vía de kinasa MAP de Erk implica la fosforilación de Erk 1 (p 44) y/o Erk 2 (p 42). Las kinasas MAP activadas Erk translocan al núcleo donde éstas fosforilan y activan factores de transcripción incluyendo (Elk 1) y transductores de señal y activadores de transcripción (Stat).
10

El término “activación inducida por FVIIa de la vía de señalización de MAPK” se destina a indicar que FVIIa se enlaza con TF en una célula mamífera y de ese modo induce la activación de los factores de transcripción Elk1 y los elementos Stat en una célula mamífera mediante la fosforilación de MAPK/Erk1/2.
15

El término “vía de señalización intracelular mediada por FVIIa” se destina a indicar una cascada de eventos intracelulares que implican la activación de Erk1/2 MAPK.

20 El término “fármaco candidato” se destina a indicar cualquier muestra que tenga una función biológica o ejerza un efecto biológico en un sistema celular. La muestra puede ser una muestra de un material biológico tal como un extracto microbiano o de planta, o puede ser una muestra conteniendo un compuesto o mezcla de compuestos preparados por síntesis orgánica o técnicas genéticas.

25 El término “agonista de TF” comprende compuestos induciendo a

- a) transducción de señal por unión directa con TF (p. ej. FVIIa),
- b) estimulación de cascada de MAPK,
- 30 c) revocamiento de la inhibición de MAPK (p. ej. inhibidores PTPase),

cuyos agonistas son fármacos candidatos tal y como se ha definido anteriormente.

35 El término “antagonista de TF” comprende

- a) reactivos que compiten con FVIIa para unirse con TF sin transmisión, p. ej. FVIIai,
- b) reactivos que enlazan con FVIIa y previenen la unión con TF, p. ej. Zn hidroxamato,
- 40 c) reactivos que inhiben la transducción de señal interfiriendo con elementos de la cascada de MAPK,

cuyos antagonistas son fármacos candidatos tal y como se ha definido anteriormente.

45 El término “objetivos farmacológicos” se destina a indicar una proteína que puede alterar la actividad de la vía de señalización intracelular mediada por FVIIa.

El término “gen indicador” se destina a indicar un constructo de ADN que, al transcribirse, produce una proteína que puede detectarse.

50 El término “factor de transcripción TFC/Elk1” o “factor de transcripción Elk1” se destina a comprender Elk1 (también conocido como factor de complejo de ternario p62, TFC) es un factor de transcripción relacionado con Ets que media la estimulación del factor de crecimiento del promotor c-fos. Elk1 se enlaza con el ADN en parte mediante la interacción con el Factor de Respuesta al Suero. Elk1 es un sustrato Erk auténtico. La fosforilación SAPKs de Elk1 puede mediar la activación transcripcional del promotor fos en respuesta a una variedad de tensiones.
55

El término “elemento promotor SRE” significa una secuencia de ADN que enlaza factores de transcripción inducidos por componentes presentes en el suero.

60 El término “célula de expresión de TF” significa cualquier célula mamífera, que expresa TF.

El término “fosforilación de proteína” se destina a indicar la fosforilación de serina y/o treonina y/o tirosina en péptidos y/o proteínas.

65 La modulación de la activación inducida por FVIIa de la vía de señalización de MAPK en un paciente se define como la capacidad de FVIIa u otro agonista TF, o FVIIai u otro antagonista de TF para 1) o bien aumentar o reducir la actual, normal o anormal, transducción de señal, 2) iniciar una transducción de señal normal, e 3) iniciar una transducción de señal anormal.

ES 2 339 196 T3

En este contexto, el término “tratamiento” se entiende por incluir tanto la prevención de una condición adversa, tal como restenosis, y la regulación de una condición que ya está ocurriendo, tal como una infección bacteriana, con el propósito de inhibir o minimizar la condición. La administración profiláctica de FVIIa u otro agonista de TF, o FVIIai u otro antagonista de TF se incluye así en el término “tratamiento”.

En este contexto, el término “una unidad” se define como la cantidad de factor VII presente en 1 ml de plasma normal, correspondiente a aproximadamente 0,5 μg de proteína. Después de la activación 50 unidades corresponden a aproximadamente 1 μg de proteína.

En este contexto, el término “paciente” se define como cualquier animal, en particular mamíferos, tal como seres humanos, sufriendo una condición que puede tratarse por inhibición o activación de la vía de señalización de MAPK.

Abreviaturas

TF	factor tisular
FVII	factor VII en su forma monocatenaria inactivada
FVIIa	factor VII en su forma activada
rFVIIa	factor recombinante VII en su forma activada
FVIIai	factor VII modificado

Administración farmacéutica

El régimen para cualquier paciente a tratar con FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF tal y como se menciona aquí debería determinarse por expertos en la técnica. La dosis diaria a administrar en terapia puede determinarse por un médico y depender del compuesto empleado en particular, en la forma de administración y en el peso y la condición del paciente. Una cantidad eficaz es adecuadamente una dosificación diaria de aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, preferiblemente de aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ hasta 300 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, más preferiblemente de aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ hasta 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, de la forma más preferida de aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ hasta 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$.

El FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF debería administrarse en una dosis individual, pero también puede darse preferiblemente en múltiples dosis con intervalos de 4-6-12 horas dependiendo de la dosis dada y la condición del paciente.

El FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF puede administrarse por vía intravenosa o puede administrarse por infusión continua o pulsátil. FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF se administra preferiblemente mediante inyecciones intravenosas y en una cantidad de aproximadamente 100-100.000 unidades por kg de masa corporal, y preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 250-25.000 unidades por kg de masa corporal correspondiente a aproximadamente 5-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, una dosis que puede tener que repetirse 2-4 veces por cada 24 horas.

Composiciones farmacéuticas

Técnicas convencionales para preparar composiciones farmacéuticas que pueden usarse según la presente invención están, por ejemplo, descritas en las Ciencias Farmacéuticas de Remington (Remington's Pharmaceutical Sciences), 1985.

Las composiciones usadas según esta invención se preparan por métodos conocidos *per se* por el trabajador experto en la técnica.

En resumidas cuentas, las preparaciones farmacéuticas adecuadas para el uso según la presente invención se hacen mediante la mezcla de FVII, FVIIa u otro agonista de TF o FVIIai u otro antagonista de TF, preferiblemente en forma purificada, con adyuvantes adecuados y un portador adecuado o diluyente. Soportes o diluyentes fisiológicos aceptables adecuados incluyen agua estéril y solución salina. Adyuvantes adecuados, a este respecto, incluyen calcio, proteínas (p. ej. albúminas), u otros péptidos inertes (p. ej. glicil-glicina) o aminoácidos (p. ej. glicina, o histidina) para estabilizar el factor purificado. Otros adyuvantes fisiológicos aceptables son azúcares no reducidos, polialcoholes (p. ej. sorbitol, manitol o glicerol), polisacáridos tales como dextrinas de peso molecular bajo, detergentes (p. ej. polisorbato) y antioxidantes (p. ej. bisulfito y ascorbato). Los adyuvantes están generalmente presentes en una concentración de entre un 0,001 a un 4% de p/v. La preparación farmacéutica también puede contener inhibidores de proteasa, p. ej. apronitina, y agentes conservantes.

Las preparaciones pueden esterilizarse por, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, incorporando agentes esterilizantes en las composiciones, irradiando las composiciones, o calentando las composicio-

nes. También pueden producirse en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio estéril adecuado para inyección antes de o inmediatamente antes del uso.

La presente invención se ilustra con mayor detalle con los ejemplos siguientes, no obstante, no se deben interpretar como limitando el alcance de la protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden, ambas separadamente y en cualquier combinación de las mismas, ser material para entender la invención en diferentes formas de la misma.

Ejemplos

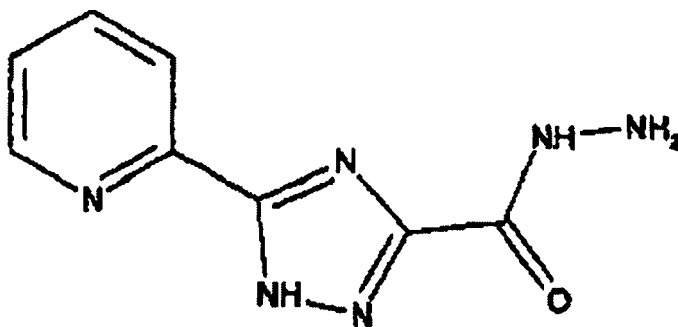
Preparación del compuesto

El Factor VIIa humano purificado adecuado para el uso en la presente invención se hace preferiblemente mediante tecnología recombinante de ADN, p. ej. como se describe por Hagen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 83: 2412-2416, 1986 o como se describe en la patente europea n°. 200.421 (ZymoGenetics). El Factor VIIa producido por tecnología recombinante puede ser factor VIIa auténtico o un factor VIIa más o menos modificado a condición de que tal Factor VIIa tiene sustancialmente la misma actividad biológica para la coagulación sanguínea como Factor VIIa auténtico. Tal Factor VIIa modificado puede producirse modificando la secuencia de ácidos nucleicos codificando el Factor VII o bien alterando los codones del aminoácido o eliminando algunos de los codones del aminoácido en el ácido nucleico codificando el FVII natural por medios conocidos, p. ej. por mutagénesis específica puntual.

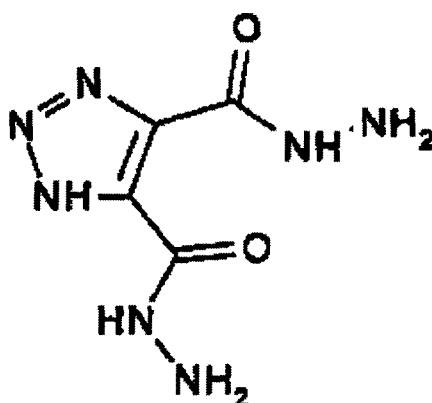
El Factor VII también puede producirse por los métodos descritos por Broze y Majerus, J. Biol. Chem, 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, J. Clin. Invest, 71: 1836-1841, 1983. Estos métodos producen factor VII sin cantidades detectables de otros factores de coagulación sanguínea. Otra preparación más de factor VII purificado puede obtenerse incluyendo una filtración en gel adicional como la fase de purificación final. El factor VII se convierte después en FVIIa activado por medios conocidos, p. ej. por diferentes proteínas plasmáticas, tales como factor XIIa, IX a o Xa. De forma alternativa, como se describe por Bjoem *et al.* (Research Disclosure, 269 Septiembre de 1986, págs. 564-565), el factor VII puede activarse pasando a través de una columna de cromatografía de intercambio de iones, tal como Mono Q® (Pharmacia fine Chemicals) o similar.

Los siguientes compuestos se obtienen a través de las compañías o universidades indicadas:

5-(2-piridil)-1,2,4-triazol-3-carbohidrazida (obtenido a través de Maibridge Chemicals LTD (SEW 00446)

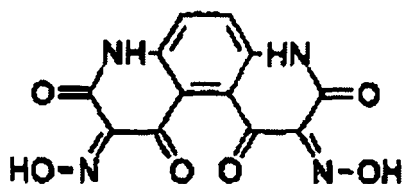


1,2,3-triazol-4,5-dicarbohidrazida (obtenido a través de la Universidad de Odense; también se describe en Farmaco, 50,(2) 1995, 99-106)



ES 2 339 196 T3

4,7-Dihidro-[4,7]fenantrolina-1,2,3,8,9,10-hexaon-2,9-dioxima (obtenido a través de Labotest bajo el número (LT-2 AM36))



Ejemplo 1

Preparación de 1-Hidroxi-7-hidroxicarbamoilquinoxalina-2,3(1H,4H)-dion

a) 4-Etoxalilamino-3-ácido nitrobenzóico

Se añadió anhídrido trietilamina (22,6 ml, 0,162 mol) a una solución de 4-amino-3-ácido nitrobenzóico (14,4 g, 0,081 mol) en una mezcla de tetrahidrofurano seco (300 ml) y N,N-dimetilformamida seca (100 ml). Entonces se añadió una solución de etil oxalilcloruro (18 ml, 0,162 mol) en 100 ml de tetrahidrofurano seco gota a gota a 0°C. La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y el hidrocloreto de trietilamina se eliminó por filtración. El filtrado se evaporó a sequedad y el residuo se trituró con agua. El producto bruto se aisló por filtración y se recristalizó a partir de etanol para obtener 14,4 g del compuesto base que se usó sin purificación adicional en la reacción de la ciclización posterior reductiva. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 1,35 (t, J = 7 Hz, 3H, CH₃), 4,36 (q, J = 7 Hz, 2H, CH₂), 8,2-8,6 (m, 3H, ArH), 11,6 (s, 1H, NH).

b) 7-Carboxi-1-hidroxi-quinoxalina-2,3(1H,4H)-dion

Una solución de 4-etoxalilamino-3-ácido nitrobenzóico (14,0 g, 49,6 mmol) en 800 ml de N,N-dimetilformamida se hidrogenó a temperatura ambiente y presión atmosférica en presencia de 1,3 g de un 5% de platino en carbono durante 2,5 h. El catalizador se filtró y lavó con N,N-dimetilformamida. El filtrado se evaporó a sequedad y el residuo se trituró con 500 ml de agua y se filtró. El producto bruto se disolvió en 900 ml de 1M de tampón de fosfato de dihidrogeno de potasio (pH 7.4), se filtró y se reprecipitó con 6 M de ácido clorhídrico para producir 7,7 g (70%) del compuesto base. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 7,25 (d, J = 9 Hz, 1H, ArH), 7,75 (dd, J = 9 Hz, 2 Hz, 1H, ArH), 7,98 (d, J = 2 Hz, 1H, ArH), 12,3 (br.s, 1H, intercambiable).

c) 1-Benziloxi-7-carboxiquinoxalina-2,3(1H,4H)-dion

7-Carboxi-1-hidroxi-quinoxalina-2,3(1H,4H)-dion (2,22 g, 10 mmol) se disolvió en una mezcla de 50 ml de 1 M de tampón de fosfato de dihidrogeno de potasio (pH 7.4) y 25 ml de etanol calentando suavemente. A la mezcla enfriada se le añadió 1,19 ml (10 mmol) de bencilbromuro y la mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El precipitado se aisló por filtración y se lavó con etanol. El producto bruto se trituró con 4M de ácido clorhídrico y se lavó con agua y se secó al vacío para obtener 1,56 g (50%) del compuesto base. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 5,22 (s, 2H, CH₂), 7,2-7,9 (m, 8H, ArH), 12,35 (s, 1H, intercambiable), 13,05 (br.s, 1H, intercambiable).

d) 1-Benziloxi-7-(benziloxicarbamoil)quinoxalina-2,3(1H,4H)-dion

Para una solución congelada de 1-Benziloxi-7-carboxiquinoxalina-2,3(1H,4H)-dion (422 mg, 1,35 mmol) en 10 ml de N,N-dimetilformamida se añadió 1-hidroxibenzotriazolona (218 mg, 1,48 mmol) seguido de 1-(3-dimetilamino-propil)-3-hidrocloreto de etilcarbodiimida (272 mg, 1,42 mmol). La agitación se continuó durante 30 min a 0°C y se añadió O-hidrocloreto de benzilhidroxilamina (237 mg, 1,49 mmol) y trietilamina seca (0,21 ml, 1,5 mmol). La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente, después se enfrió y se filtró. El sólido aislado se lavó sucesivamente con agua, hidrogenocarbonato de sodio saturado acuoso y agua. La recristalización a partir de etanol obtuvo 290 mg (51%) del compuesto base. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 4,95 (s, 2H, CH₂), 5,19 (s, 2H, CH₂), 7,2-7,8 (m, 13H, ArH), 11,8 (br.s, 1H, intercambiable), 12,3 (br.s, 1H, intercambiable).

e) 1-Hidroxi-7-hidroxicarbamoilquinoxalina-2,3(1H,4H)-dion

Una suspensión de 1-Benziloxi-7-(benziloxicarbamoil)quinoxalina-2,3(1H,4H)-dion (250 mg, 0,6 mmol) en 50 ml de etanol se hidrogenó a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 1 h en presencia de 50 mg de un 5% de paladio en carbono. Agua (20 ml) y 4 ml de 2 N de hidróxido sódico se añadieron para disolver el producto y el catalizador se eliminó por filtración. El filtrado se acidificó con 4 ml de 4M de ácido clorhídrico, se evaporó a aproximadamente 10 ml y se filtró para obtener un sólido blanco. El lavado con una pequeña cantidad de agua fría y

ES 2 339 196 T3

etanol produjo 109 mg (70%) del compuesto base. ¹H-NMR (DMSO-d₆): 7,21 (d, J = 8 Hz, 1H, ArH), 7,60 (dd, J = 8 Hz, 2 Hz, 1H, ArH), 7,90 (d, J = 2 Hz, 1 H, ArH), 9,05 (br.s, 1H, cambiabile), 11,35 (br.s. 1H, cambiabile), 11,82 (br.s, 1 H, intercambiabile), 12,35 (br.s, 1H, intercambiabile).

5

Ejemplo 2

Síntesis de pirazol-3,5-ácido dicarbohidroxámico (28-3028) en fase sólida

10 a) Síntesis del enlace 1: a) Se dilató resina Sasrin® (10,0 g, 0,73 mmol/g) en diclorometano (40 ml) y diisopropitilamina (40 ml), y se enfrió a 0°C. Se añadió una solución de cloruro de metanosulfonilo (5,0 ml, 7,40 g, 64,6 mmol) en diclorometano (20 ml) gota a gota mientras se agitaba bajo argón, y se continuó agitando durante 30 min a 0°C y durante 45 min a 25°C. Posteriormente, la resina se drenó y lavó con diclorometano (3 partes de 80 ml) y N-metilpirrolidinona (NMP; 3 partes de 80 ml), b) en un matraz de 500 ml equipado con un agitador mecánico, se
15 disolvió N-hidroxifitalimida (23,8 g, 146 mmol) en NMP (280 ml), y se añadió carbonato de cesio (27,7 g, 73 mmol). La resina mesilada se añadió en partes pequeñas a 25°C, y se agitó de forma continua durante 30 min a 25°C y durante 16 h a 80°C. La mezcla reactiva de color marrón chocolate se virtió en un embudo Buchner y se lavó extensamente con metanol, agua, metanol, diclorometano, hasta que la resina se hizo incolora, c) La resina se suspendió en etanol (70 ml), se añadió anhídrido hidracina (8 ml), y la mezcla se agitó a 25°C durante 16 h. La resina se lavó extensamente
20 con metanol, diclorometano, metanol y se secó; producción de 9,50 g (95%).

b) Fijación de pirrol-3,5-ácido dicarboxílico a la resina preparada arriba: 0,10 g de la resina sintetizada arriba se lavaron con N-metilpirrolidona (1,5 ml). Posteriormente, se añadieron pirrol-3,5-ácido dicarboxílico (155 mg, 1,0 mmol), NMP (0,90 ml), 4-N,N-dimetilaminopiridina (20 mg) en NMP (0,10 ml) y diisopropilcarbodiimida (78 µl, 0,5 mmol), y la mezcla se agitó a r.t. durante 120 min. Posteriormente, la mezcla se lavó con NMP (4 partes de 2 ml).

c) Se añadió una solución de PyBOP® (0,5 mmol, 260 mg) en NMP (250 µl) a la resina. Para ello, se añadió una solución de hidrocloreuro de hidroxilamina (70 mg, 1 mmol) en NMP (0,80 ml)/N-metilmorfolina (0,20 ml), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, la resina se lavó con dimetilformamida (3 partes de 2 ml) y dicloroetano (5 partes de 2 ml).

d) Clivage: la resina se lavó con dicloroetano (2 ml), y se añadió una mezcla de un 25% de ácido trifluoroacético en dicloroetano (1,0 ml).

35 La mezcla se agitó a r.t. durante 15 min. La resina se filtró, el filtrado se recogió, y la resina se lavó con acetonitrilo (2 partes de 0,80 ml). Los solventes se evaporaron al vacío, y las muestras crudas se sometieron a ensayo.

Lit.: L.S. Richter, M.C. Desai, Tetrahedron Lett. 1997, 38, 321.

40

Ejemplo 3

Tratamiento de la aterosclerosis

45 Estudios histoquímicos sugieren que TF es un determinante más importante de la actividad pro-trombótica de lesiones ateroscleróticas humanas (Fernandez-Ortiz, a. *et al.* J. Am. Cardiol. 1562-1569; (1994)). La iniciación de la cascada de coagulación resultando en una generación de trombina es importante para la deposición de fibrina y la aterogénesis de la placa. Es posible que también la respuesta celular provocada por la señalización dependiente de TF descrita en la presente invención tenga implicaciones importantes para la aterogénesis y el desarrollo de la
50 placa.

Ejemplo 4

Tratamiento de angina e infarto miocárdial

TF se expresa en células de macrófagos/espuma asociadas a placas ateroscleróticas, y la rotura de estas estructuras son eventos clave en la patogénesis de angina inestable e infarto miocárdial. Se ha descubierto que la concentración de antígeno de TF y la actividad en placas de pacientes con angina inestable o infarto miocárdial fue significativamente superior que en los pacientes con angina estable (Ardissino, D. *et al.* The Lancet 349: 769-771; (1997)).

Es deseable ser capaz de interferir con y modular los efectos biológicos de la expresión de TF para prevenir una espiral viciosa implicando TF, si esto se provoca activando el sistema de coagulación o es un resultado de señalización celular y reacciones consecutivas.

65

Ejemplo 5

Tratamiento de cáncer/angiogénesis

5 TF se expresa en células endoteliales y células tumorales en el cáncer de mama, pero no en las mismas células en enfermedad fibrocística benigna de la mama (Contrino, J., Nature Med. 2: 209-215; (1996)). La exposición local de TF en la superficie de células específicas en tumores parece ser crucial para la vascularización y el crecimiento de tumores (Folkman, J. Nature Med. 2: 167-168, 1996)). Estudios recientes han mostrado que bloquear el suministro de sangre a los tumores con los inhibidores de la angiogénesis, angiostatin (O'Reilly, M. S. *et al.* Cell 79, 315-328(1994);
 10 Folkman, J. Nature Med. 1, 27-31(1995), W09641194-A1) y endostatin (O'Reilly, M. S. *et al.* Cell 88, 277-285(1997), o focalizando TF de forma dirigida por anticuerpos (Huang, X. *et al.*, Science 275: 547-550; (1997)) puede detener el tumor o incluso causar la regresión del tumor. La señalización y orquestación celular de sustancias transmisoras celulares es un aspecto importante de vascularización y biología tumoral, y TF es posible que sea de central importancia en estos procesos. Reactivos que modulen la señalización inducida por FVIIa es posible que trabajen por un mecanismo
 15 claramente diferente y puedan proporcionar una alternativa para los inhibidores angiogénicos actualmente conocidos.

Ejemplo 6

20 *Tratamiento contra la restenosis tras la compensación de los vasos ateroscleróticos bloqueados por procedimientos quirúrgicos*

La herida mecánica de la pared del vaso resulta en la exposición local de TF importante para la hemostasis y la posterior reparación del tejido. Esto es de interés inmediato en relación a la compensación de los vasos ateroscleróticos
 25 bloqueados por procedimientos quirúrgicos tales como la angioplastia, la endarterectomía, la arterectomía de reducción o el injerto de baipás. Estos procedimientos resultan en heridas de vasos serias, exposición a TF, formación de trombos y reacciones posteriores a la curación. La proliferación de células de músculo liso (SMCs) en la pared del vaso es un aspecto importante de estos eventos. La herida del vaso va seguida por la proliferación y la migración de SMC medial en la íntima, que de forma característica ocurre dentro de las primeras pocas semanas y hasta seis meses después de la
 30 herida y se detiene cuando la capa endotelial de revestimiento se establece. En aproximadamente el 30% o más de los pacientes tratados por angioplastia, endarterectomía o injertos de baipás, la trombosis y/o la proliferación de SMC en la íntima causa la reoclusión del vaso y el consecuente fallo de la cirugía reconstructiva. Este cierre del vaso después de la cirugía se conoce como restenosis. El factor VIIa modificado (FVIIai) ha mostrado suprimir eficazmente el proceso de la restenosis (cf. WO 92/15686, título: FVII modificado). Este efecto puede deberse a una inhibición de la formación
 35 de coágulos y la generación de trombina inicialmente después del tratamiento del vaso constreñido. No obstante, la presente invención muestra que además de ser un fármaco antitrombótico, FVIIai es también un inhibidor de la señalización celular dependiente de TF. Por ello la supresión de la restenosis por FVIIai puede ocurrir como resultado de un efecto en la proliferación de SMC u otras actividades celulares, y fármacos que trabajan como efectores de la señalización inducida por FVIIa podrían por tanto representar una nueva y mejor estrategia para el tratamiento contra
 40 la restenosis.

Ejemplo 7

45 *Respuesta del gen indicador: Activación de la expresión del gen indicador SRE inducida por FVIIa sobre la unión con el TF humano*

Las células BHK con y sin TF establemente modificado se modificaron de forma estable con KZ136 (constructo
 50 indicador codificando 2x(STAT1,3), 2x(STAT4,5,6) y un elemento de respuesta al suero (SRE) de flujo ascendente hasta un gen indicador de la luciferasa) se estimularon con FVIIa. Sólo la expresión de células de TF respondió a FVIIa de una manera dependiente de la dosis. La Fig. 2A muestra que 20 nM de FVIIa indujo a una respuesta que fue aproximadamente dos veces superior al nivel de antecedentes. Un respuesta de FVIIa máxima inducible, tres veces superior al nivel ya registrado, se alcanzó con 100 nM de FVIIa. La Fig. 2B muestra que las células BHK no expresando TF no respondieron a la adición de FVIIa. La receptividad del sistema indicador se controló por la adición
 55 de un 15% de FCS que mostró un aumento de 3 veces en la actividad de la luciferasa sobre las células no estimuladas.

Ejemplo 8

60 *Control de la vía de señalización inducida sobre la unión FVIIa-TF: El enfoque del gen indicador*

Un conjunto de vectores indicadores se modificaron de forma estable por selección en células BHK ya modificadas de forma estable con un constructo conduciendo la expresión de TF. Los constructos fueron KZ131, codificando un
 65 elemento de respuesta al suero en flujo ascendente para un gen indicador de la luciferasa, KZ134, codificando un cásete de dos STAT1,3 elementos y dos elementos STAT4,5,6 en flujo ascendente para un gen indicador de la luciferasa, KZ136, codificando un cásete de dos STAT1,3 elementos, dos STAT4,5,6 elementos y un elemento de respuesta del suero en flujo ascendente para un gen indicador de la luciferasa, y KZ142, codificando el promotor c-jun en flujo ascendente para un gen indicador de la luciferasa. Las células modificadas con KZ131, KZ134 y KZ136 respondieron

ES 2 339 196 T3

a la adición de FVIIa a las células pero las células modificadas con KZ142 no lo hicieron. Puesto que la vía MAPK p44/42 estimula elementos de respuesta al suero y elementos STAT estos resultados indican que TF sobre la unión de FVIIa activa la vía MAPK p44/42. La clásica MAPK p44/42 no activa el promotor c-jun.

5

Ejemplo 9

Control de la vía de señalización inducida sobre la unión FVIIa-TF: El enfoque del inhibidor MEK1/2

10 PD98059 es un inhibidor específico de MEK1, una kinasa específicamente implicada en la cascada de MAPK p44/p42. Las células BHK modificadas de forma estable con TF y el constructo indicador KZ136 tratado previamente con 50 μ M de PD98059 durante una hora antes de la estimulación con 100 nM de FVIIa no tuvo respuesta. Las células no tratadas previamente con PD98059 no respondieron bien (Fig. 3) mostrando que TF está señalizando a través de la vía MAPK p44/42.

15

Ejemplo 10

Control de la vía de señalización inducida sobre la unión FVIIa-TF: Los dos enfoques híbridos

20

En este enfoque se controla la activación específica del factor transcripcional Elk1. Las células BHK modificadas de forma estable con TF se co-modificaron con los vectores siguientes pFR-luc (20 μ g) (el constructo indicador), pFA-Elk1 (0,5 μ g) (el vector de expresión de quimera Gal4-Elk1), pFCdbd (14,4 μ g) (ADN portador) y pEGFP-N1 (3 μ g) (plásmido indicador para controlar las eficiencias de la transfección) (Clontech). pFRluc, pFA-Elk1 y pFCdbd son componentes del sistema PatDetect, Stratagene). Una eficiencia de la transfección de aproximadamente el 50% se basó en el número de células expresando GFP (proteína fluorescente verde) (Fig. 4A). Esta mezcla de células modificadas y no modificadas se estimularon con 100 nM de FVIIa y se evaluaron por la expresión de luciferasa. Las células estimuladas con 100 nM de FVIIa mostraron una expresión de la luciferasa 5,1 veces mayor que el nivel anteriormente registrado de una desviación típica del 3-5% (Fig. 4B) demostrando que Elk1 se activa sobre la unión de FVIIa con la superficie celular de TF.

30

Ejemplo 11

35 *Control de la vía de señalización inducida sobre la unión FVIIa-factor tisular: El enfoque de los anticuerpos*

En este conjunto de experimentos con las líneas celulares BHK, ECV-304 y MDCK modificadas con TF se usaron dos anticuerpos dirigidos contra MAPK, uno focalizando las formas activadas así como las formas no activadas de MAPK, y otro, focalizando sólo la forma activada (fosforilada) de MAPK.

40

Las células BHK modificadas de forma estable con TF humano se maduraron al 90% de confluencia y dejaron de alimentarse en DMEM con un 0.1% de FCS durante 24 horas antes de la estimulación con FVIIa. Muestras para la transferencia Western se probaron a los 0, 3, 5, 7, 10, 20 y 40 minutos después de la adición de 100 nM de FVIIa. El resultado se muestra en la Fig. 5A y B. La cantidad total de MAPK fue esencialmente constante, mientras que el anticuerpo contra la forma activada de MAPK mostró una activación del temporal de MAPK p44/42 con una activación máxima a los 3-7 minutos. Durante los siguientes 10 minutos la respuesta no llegó a alcanzar el nivel anteriormente registrado aproximadamente a los 20 minutos después de la adición de FVIIa.

45

Las células endoteliales humanas inmortalizadas (ECV-304) se maduraron en un 90% de confluencia y se dejaron de alimentar en medio 199 durante 24 horas. En algunos experimentos las células se expusieron a IL-1 durante horas cinco para seguir aumentando la expresión de la superficie celular de TF antes de la adición de FVIIa (Fig. 6A y B).

50

Las muestras para la transferencia de Western se tomaron a los 0, 5 y 40 minutos después de la adición de 20 nM de FVIIa para las células IL-1 estimuladas y no estimuladas. La cantidad total de MAPK fue esencialmente constante durante el experimento mientras que la forma activada de MAPK mostró una activación temporal con una activación máxima a los 5 minutos en ambas células estimuladas y no estimuladas.

55

Una línea celular epitelial MDCK (Madin-Darby Cabube Kidney) se maduró al 100% de confluencia y se dejó de alimentar en DMEM durante las 48 horas anteriores al ensayo. Se extrajeron muestras para la transferencia Western a los 0, 5, 20 40 y 80 minutos después de la adición de 10 nM de FVIIa. Se recogió una muestra adicional estimulada con 10 nM de FVIIai después de 40 minutos. Los resultados se muestran en la Fig. 7A y B. La cantidad total de MAPK fue esencialmente constante mientras que la forma activada de MAPK mostró una activación temporal con fosforilación máxima a los 20 minutos con un descenso gradual a los 40 y los 80 minutos. No se observó ninguna fosforilación significativa de MAPK con FVIIai después de 40 minutos de exposición.

60

Estos ejemplos muestran que FVIIa es capaz de inducir la fosforilación de MAPK/Erk 1/2 en diferentes líneas celulares expresando TF de diferentes especies. Además FVIIai no es capaz de activar la misma fosforilación en células MDCK.

65

ES 2 339 196 T3

Ejemplo 12

Experimentos sobre la competencia entre FVIIa y FVIIai

5 Las células BHK modificadas de forma estable con el TF humano y el plásmido indicador KZ136 se maduraron al 90% de confluencia, se dejaron de alimentar en DMEM con un 0,1% de FCS durante 16 horas y entonces se estimularon con FVIIa o FVIIai (Fig. 8). 100 nM de FVIIai no indujeron una respuesta al suero a diferencia de 20 nM y 100 nM de FVIIa que aumentaron significativamente la respuesta. También se mostró en la Fig. 8 un experimento donde se estudió la competencia entre FVIIa y FVIIai. Se añadió FVIIai a las células 1 hora antes de la estimulación con 20 nM de FVIIa. La respuesta inducida por 20 nM de FVIIa se inhibió en un 27%, 59%, 77%, y 91% por la adición de 20 nM, 50 nM, 100 nM, y 500 nM de FVIIai, respectivamente. Esto mostró que FVIIai no podría inducir la señalización, y también que FVIIai podría prevenir la señalización inducida por FVIIa supuestamente compitiendo con FVII por un sitio de unión mutuo en TF.

15 Ejemplo 13

Caracterización de la vía de señalización inducida sobre la unión de FVIIa con factor tisular

20 En este conjunto de experimentos con líneas celulares BHK modificadas con TF usamos un anticuerpo fosfoespecífico contra la MAPK p44/42 fosforilada (Thr202/Tyr204) y un anticuerpo focalizando la MAPK p44/42 total (New England Biolabs, Beverly, MA).

25 Las células BHK modificadas de forma estable con TF humano se maduraron al 90% de confluencia y se dejaron de alimentar en DMEM con un 0,1% de FCS durante 24 horas antes de la estimulación. En la Fig 9A las células se estimularon con 100 nM de FVIIa durante 0, 3, 5, 7, 10 y 40 minutos antes de lisar las células y tomar las muestras para la transferencia Western. Los resultados en la Fig. 9A (panel inferior) muestran que la cantidad total de MAPK fue esencialmente constante, mientras que los resultados con el anticuerpo contra la forma activada de MAPK (panel superior) mostraron una activación transitoria de MAPK p44/42 con una activación máxima a los 3-7 minutos que declinó durante los siguientes 40 minutos.

30 Se realizó un experimento similar con células BHK(-TF) no modificadas. En estas células de control el MAPK no se activó por FVIIa pero se obtuvo una respuesta MAPK fosforilada con suero (resultados no mostrados). Los resultados mostrados en la Fig 9B se obtuvieron cuando las células BHK(+TF) se expusieron a 100 nM de FVII, FVIIa, FVIIai, [Ala344]FVII o FXa durante 5 min. No se observó ningún efecto en la cantidad total del nivel de MAPK p44/42 (panel inferior) mientras que se vio una activación profunda con FVIIa, menor que con FVII, y no se indujo ninguna activación significativa por FVIIai, [Ala344]FVII o FXa (panel superior). Esto sugiere fuertemente que se necesitaba actividad de FVIIa. Puesto que FXa no produjo ningún aumento significativo en la fosforilación de p44/42, una generación de FXa putativa mediada por FVIIa podría no responder a la activación de MAPK p44/42 con FVIIa. Un lavado breve de EDTA supuso eliminar posibles cantidades de trazas de factores de coagulación dependiente de vitamina K de la superficie celular antes de la exposición a FVIIa se incluyó en algunos experimentos. Esto fue sin ninguna reducción en la fosforilación de MAPK, portando nuevamente la noción de que las reacciones de coagulación de flujo descendente no estaban implicadas. En conclusión este ejemplo muestra que FVIIa/TF induce a una fosforilación transitoria de la MAPK p44/42 y que la actividad central catalítica de FVIIa se requiere para esta fosforilación inducida por FVIIa. Además concluimos que una vía de señalización indirecta implicando una activación de FX mediada por FVIIa es improbable.

50 Ejemplo 14

La cola de C-terminal del factor tisular no se requiere para la señalización inducida por FVIIa a través de la vía MAPK

55 El ADNc codificando una versión truncada de TF comprendiendo los residuos 1-247 se clonó en el vector de expresión mamífero Zem219b y se modificó en las células BHK. Este TF truncado sin la cola citoplasmática de C-terminal se expresó como un cofactor completamente funcional para activación de FX mediante FVIIa. Usamos el anticuerpo fosfo-específico contra la MAPK p44/42 fosforilada (Thr202/Tyr204) y un anticuerpo focalizando la MAPK p44/42 total (New England Biolabs, Beverly, MA) para controlar la fosforilación de MAPK.

60 Las células BHK modificadas de forma estable con TF humano (1-247) se maduraron al 90% de confluencia y se dejaron de alimentar en DMEM con un 0,1% de FCS durante 24 horas antes de la estimulación. Las células se estimularon después con 100 nM de FVIIa durante 10 minutos antes de lisar las células y tomarse las muestras para la transferencia Western. Los resultados se muestran en la Fig. 10. La cantidad total de MAPK fue esencialmente constante (panel superior), mientras que la forma activada de MAPK de MAPK p44/42 (panel inferior) se fosforiló como resultado de la exposición de las células a FVIIa pero no a FFR-FVIIa. En conclusión este ejemplo demuestra que la señal de transducción inducida por FVIIa/TF a través de la vía de MAPK se desarrolla independientemente de la presencia de la cola citoplasmática de TF.

REIVINDICACIONES

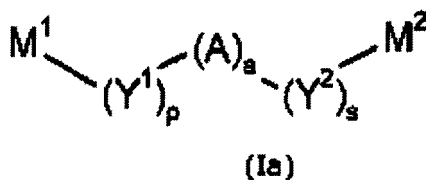
5 1. Uso de FVII, FVIIa u otro agonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para inducir o mejorar la activación de la vía de señalización MAPK en el tratamiento de una herida conduciendo a disfunción endotelial en un paciente.

10 2. Uso según la reivindicación 1, donde la herida conduciendo a disfunción endotelial se selecciona a partir del grupo que consiste en re-endotelización, revascularización colateral en la isquemia/reperfusión en la microangiopatía diabética del infarto miocárdial, herida mecánica, aterosclerosis, isquemia/reperfusión, infección bacteriana, y deposición tumoral.

15 3. Uso de FVIIai u otro antagonista de TF para la producción de una composición farmacéutica para la inhibición de la angiogénesis.

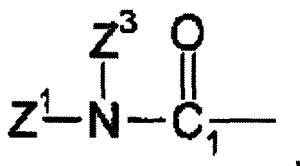
4. Uso según la reivindicación 3, donde dicho antagonista comprende un zinc quelador.

20 5. Uso según la reivindicación 4, donde dicho zinc quelador se selecciona a partir de un compuesto de la fórmula general Ia

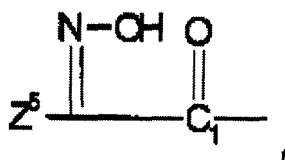


donde

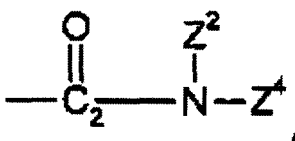
35 M¹ es heteroarilo, un grupo de la fórmula



45 o un grupo de la fórmula

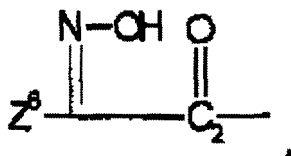


60 M² es heteroarilo, o un grupo de la fórmula



ES 2 339 196 T3

o un grupo de la fórmula



Z^1 , Z^2 , Z^3 y Z^4 independientemente el uno del otro son hidrógeno, C_{1-4} alquilo, hidroxilo, amino o un enlace de valencia fijado a A,

Z^5 y Z^6 representan un $>C=O$, que se fija a A,

Y^1 y Y^2 independientemente el uno del otro son un grupo de la fórmula $-X^1 \sim X^2 \sim X^3-$, donde independientemente el uno del otro significan un enlace único o doble, y X^1 representa $>C=O$, $>CHR^5$, $>CH_2$, $>CH-$ o un enlace de valencia, donde R^5 es hidrógeno, C_{1-4} alquilo, amino, C_{1-4} alquil-amino, o di(C_{1-4} alquil)amino, X^2 representa $-NH-$, $>N-$, $>CH_2$ o $>CH-$, y X^3 representa S, $>CH_2$, $>CH-$ o un enlace de valencia,

A es arilo o heteroarilo,

p, a y s independientemente el uno del otro son 0 o 1;

o una sal derivada farmacéuticamente aceptable;

con las condiciones de que $a+p+s$ sea al menos 1; en combinación con un excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptables.

6. Uso según la reivindicación 4 ó 5 donde dicho zinc quelador se selecciona a partir de

1-hidroxi-7-hidroxicarbamoilquinoxalina-2, 3(1H,4H)-dion,

5-(2-piridil)-1, 2,4-triazol-3-carbohidrazida,

1, 2,3-triazol-4,5-dicarbohidrazida,

Pirazol-3,5-ácido dicarbohidroxámico,

4,7-Dihidro-[47]fenantrolina-1,2,3,8,9,10-hexaon-2,9-dioxima, o L-Cistina dihidroxamato.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde dicho paciente es un humano.

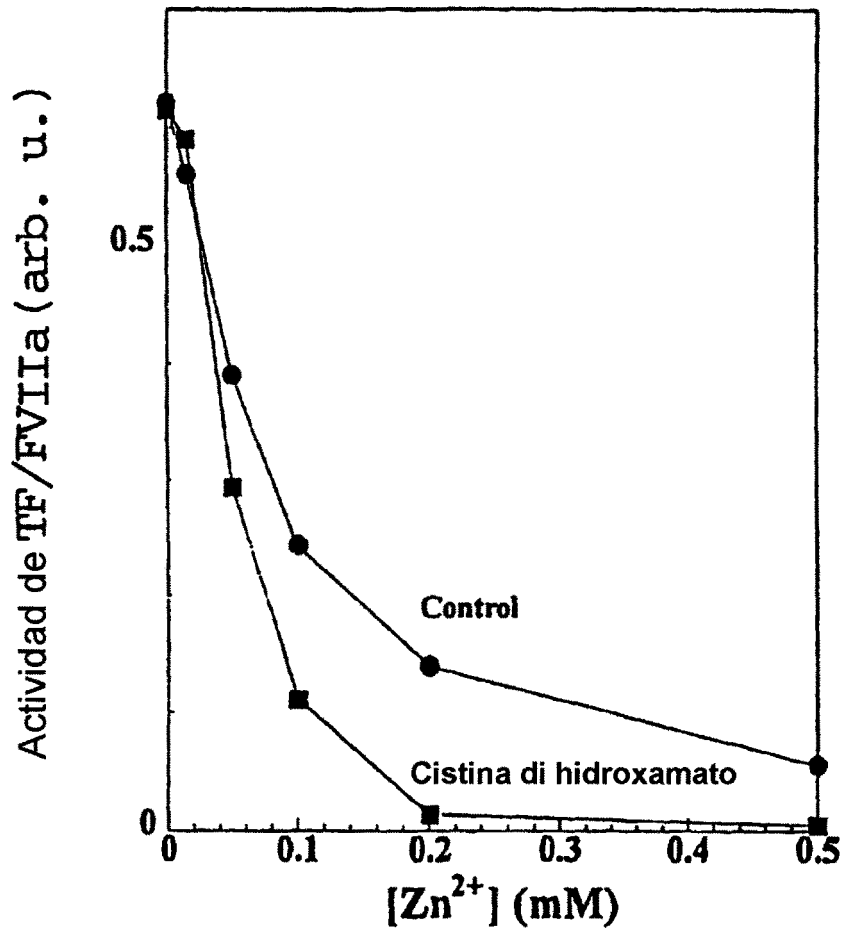


Fig. 1

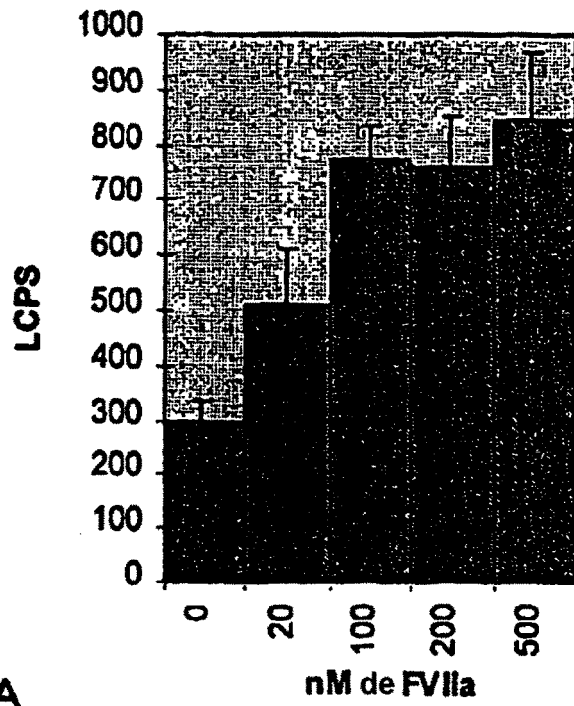


Fig. 2A

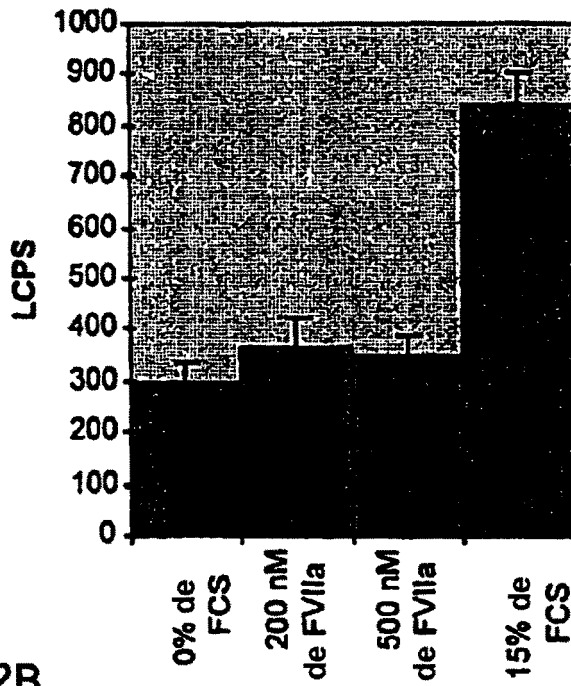


Fig. 2B

BHK-TF/KZ136

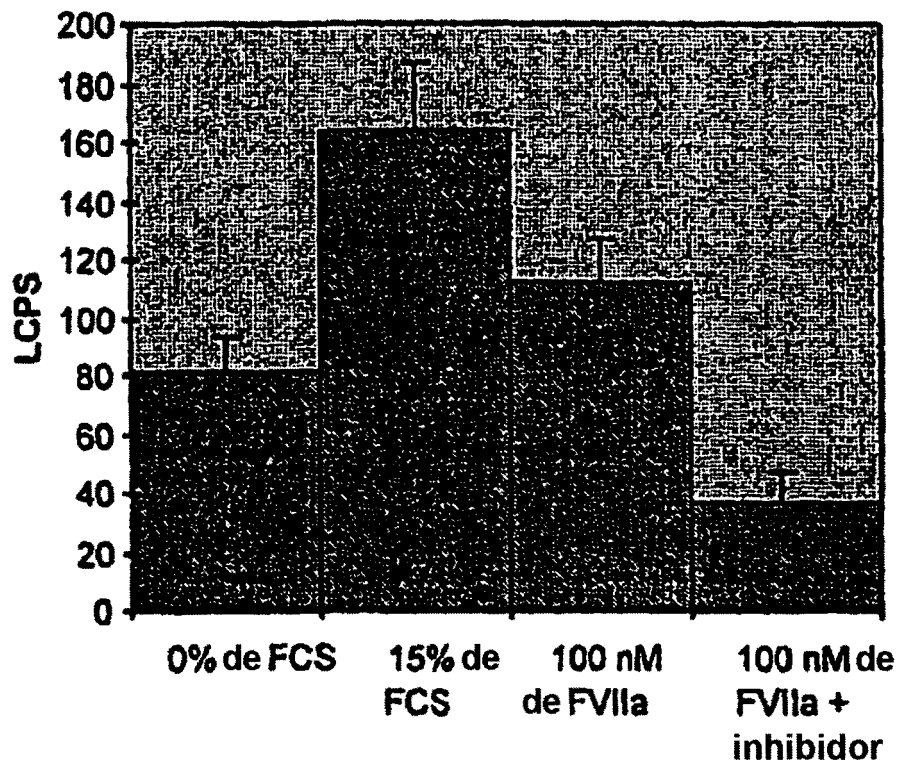


Fig. 3



Fig. 4A

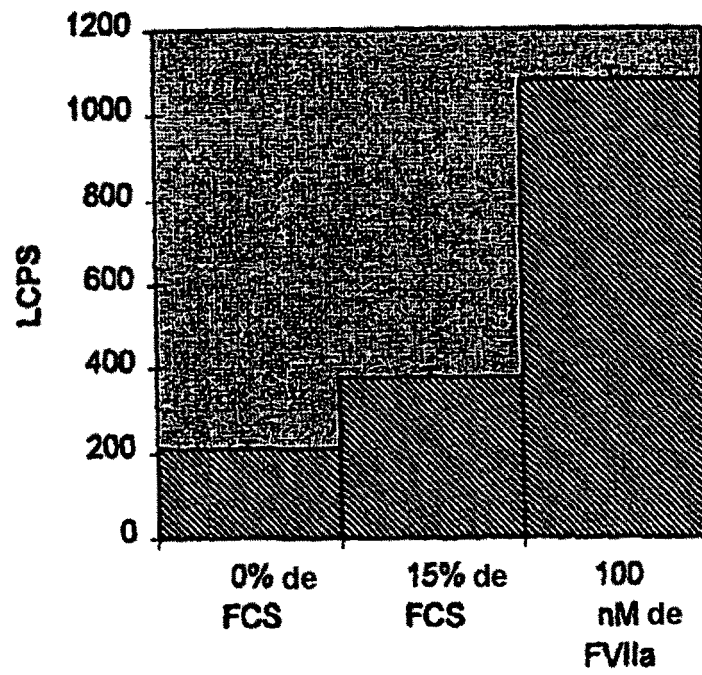


Fig. 4B

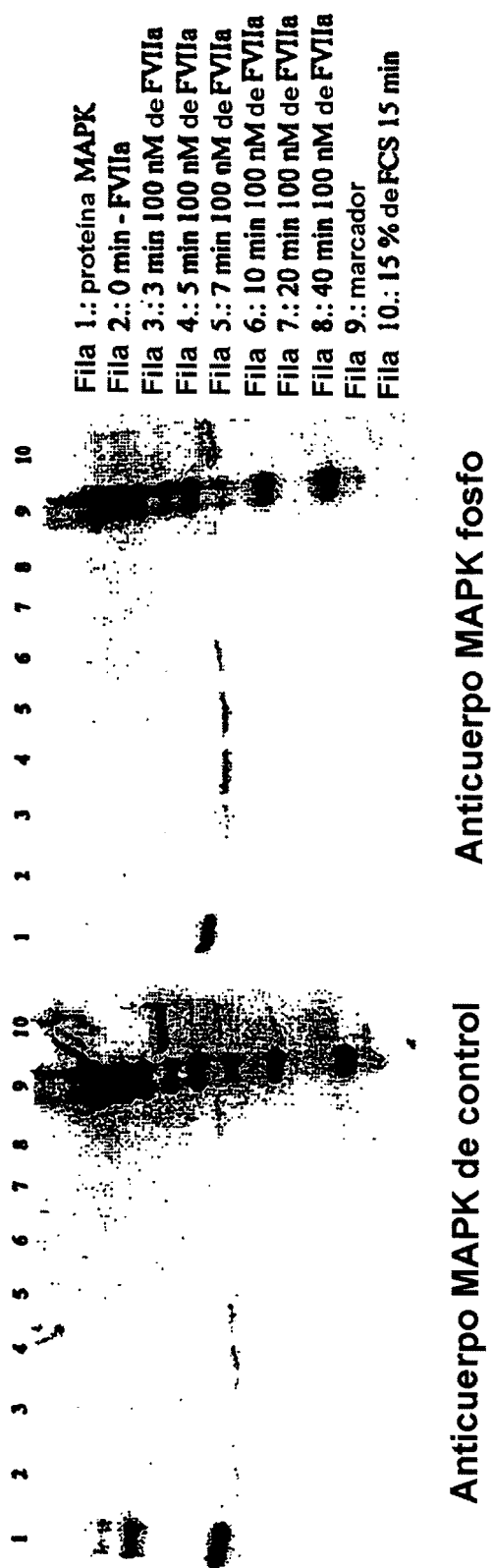


Fig. 5A

Fig. 5B

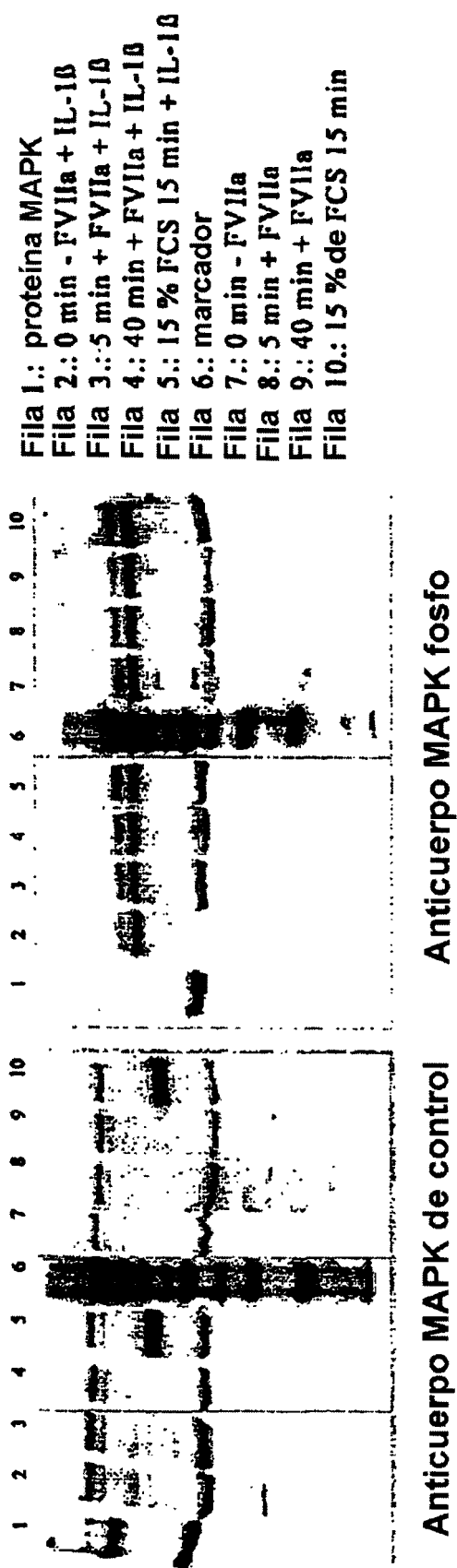


Fig. 6B

Fig. 6A

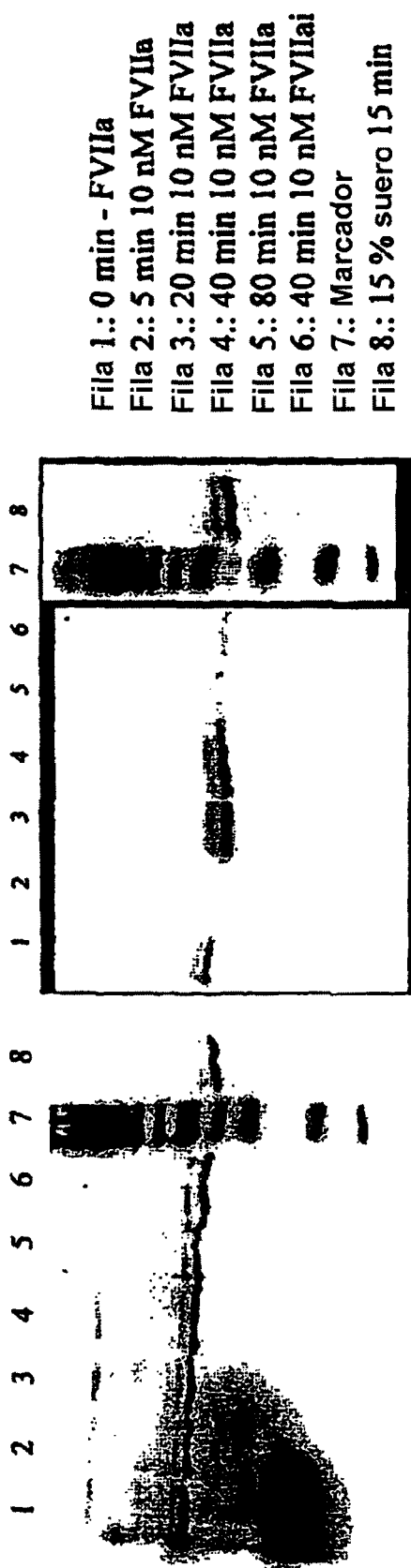


Fig. 7B

Fig. 7A

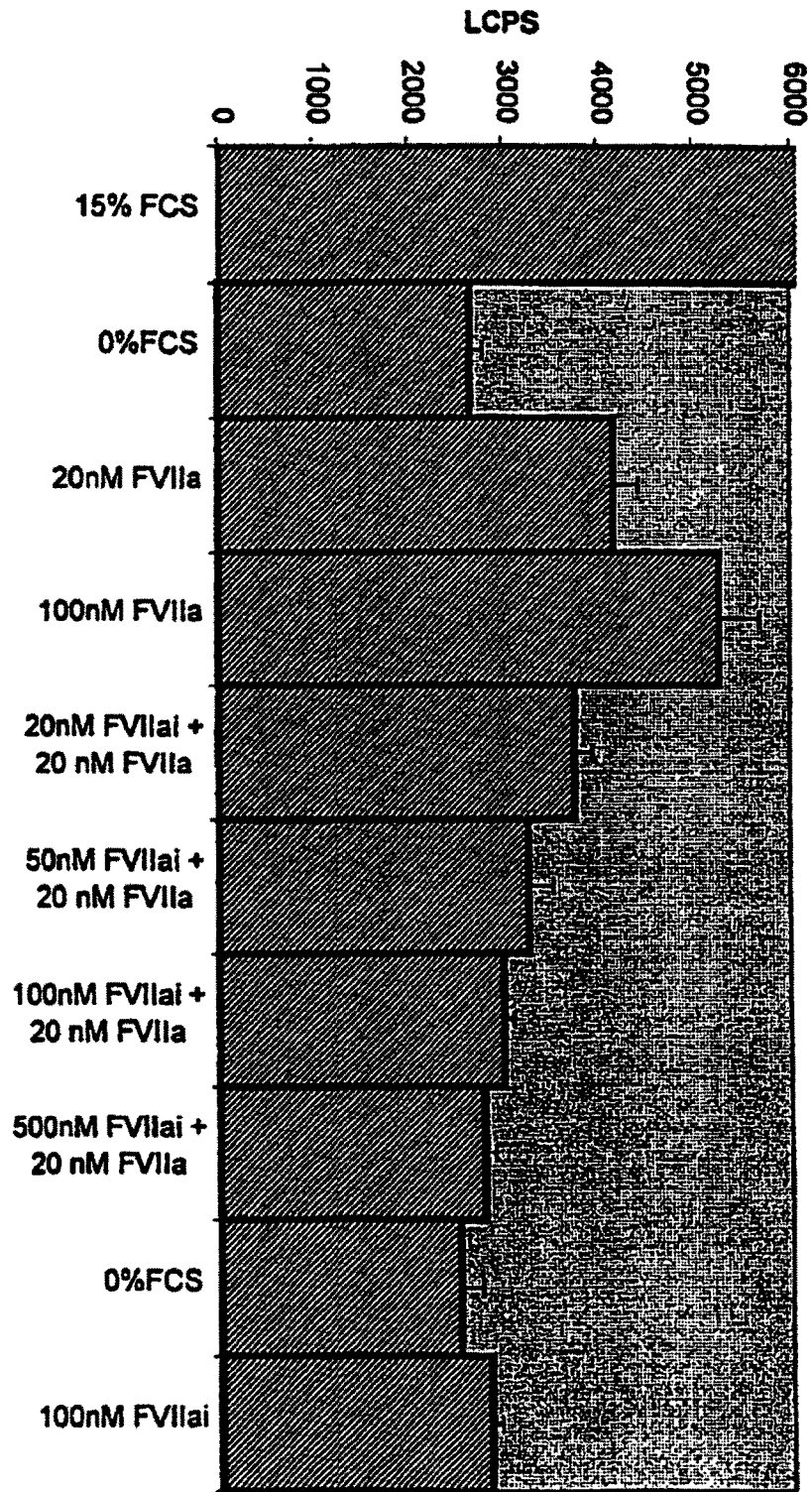


Fig. 8

1. p44/42
2. FVIIa: 0 min
3. FVIIa: 3 min
4. FVIIa: 5 min
5. FVIIa: 7 min
6. FVIIa: 10 min
7. FVIIa: 40 min
8. Estándar
9. 15% de suero

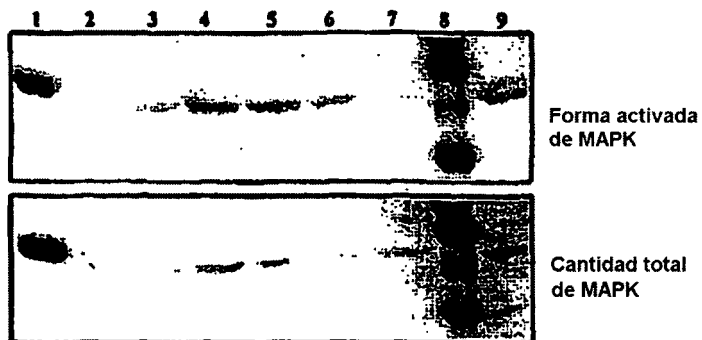


Fig. 9A

1. Control
2. FVII
3. FVIIa
4. FVIIai
5. FVII S344A
6. FXa
7. Estándar
8. 15% de suero

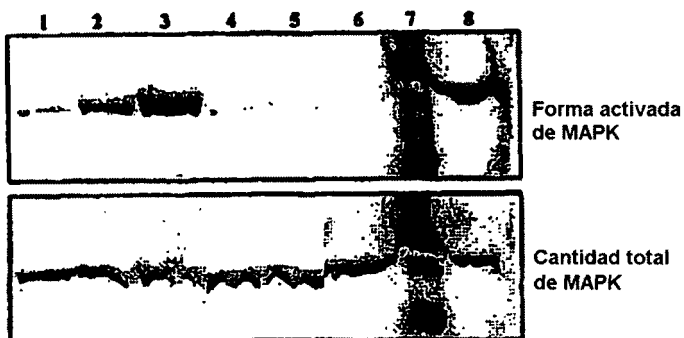


Fig. 9B

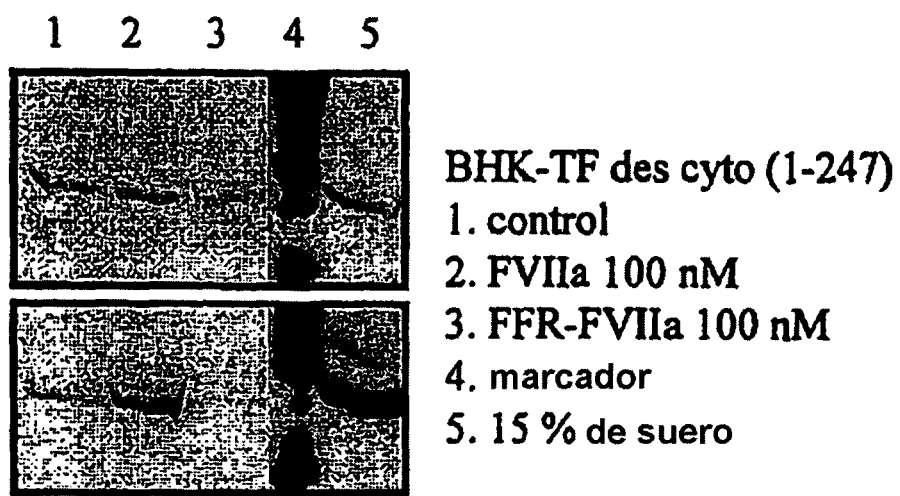


Fig. 10