



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 313 841**

⑫ Número de solicitud: 200701786

⑬ Int. Cl.:
C07K 14/81 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **26.06.2007**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2009**

Fecha de la concesión: **22.12.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **12.01.2010**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.01.2010

⑲ Titular/es:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
Etxesakan, 28 - Oficina 5, Planta Baja
31180 Zizur Mayor, Navarra, ES

⑳ Inventor/es: **Orbe Lopategui, Josune;**
Páramo Fernández, José Antonio;
Rodríguez García, José Antonio y
Serrano Vargas, Rosario

㉑ Agente: **Ungría López, Javier**

㉒ Título: **Composiciones para tratamiento anti-fibrinolítico.**

㉓ Resumen:

Composiciones para tratamiento anti-fibrinolítico.
La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo
neutralizante de la metaloproteinasa de matriz-10 (MMP-
10) en la preparación de un medicamento útil para el trata-
miento anti-fibrinolítico, así como de hemorragias y com-
plicaciones hemorrágicas de diversas etiologías.

ES 2 313 841 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Composiciones para tratamiento anti-fibrinolítico.

5 **Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere a la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento anti-fibrinolítico y de las complicaciones hemorrágicas asociadas a estados hiperfibrinolíticos o a procedimientos quirúrgicos.

10 **Estado de la técnica anterior a la invención**

El sistema hemostático es el encargado de mantener la fluidez circulatoria y prevenir la hemorragia en respuesta a una agresión vascular. La hemostasia fisiológica está controlada tanto por los mecanismos que promueven la coagulación y la formación de fibrina, como por los que favorecen su degradación o fibrinólisis. Una activación excesiva de la coagulación o un defecto de la fibrinólisis desembocan en la formación de coágulos que obstruyen los vasos sanguíneos (trombosis intravascular), causando isquemia y necrosis. Sin embargo, una situación general de hiperfibrinólisis favorecerá la aparición de hemorragias.

Los estados hiperfibrinolíticos causados por alteraciones congénitas o adquiridas en el sistema de coagulación-fibrinólisis predisponen a importantes complicaciones hemorrágicas. Dichos estados se han asociado con el tratamiento trombolítico, así como con cirugía en órganos ricos en activadores del plasminógeno, como próstata, útero y pulmón. Por otra parte, la coagulación intravascular diseminada (CID), secundaria a numerosos procesos médicos y/o quirúrgicos constituye el prototipo de estado hiperfibrinolítico asociado con hemorragia masiva en diversos órganos.

En las enfermedades con una base fisiopatológica hemorrágica por alteración de la coagulación o aumento de la fibrinólisis, además de las transfusiones de hemoderivados, las medidas farmacológicas para su tratamiento suelen ser anti-fibrinolíticos aunque, el tratamiento fracasa en aproximadamente el 30% de los casos.

El tratamiento anti-fibrinolítico busca inhibir la degradación de la fibrina. Los más utilizados en la práctica clínica son análogos sintéticos de la lisina, como el ácido epsilon-aminocaproico (EACA) y el ácido tranexámico (ANCHA), que compiten con el plasminógeno por los lugares de unión a la lisina, y la aprotinina, que es un derivado de pulmón bovino con un amplio espectro de inhibición de proteasas.

Estos compuestos se han mostrado eficaces en diversas situaciones clínicas médicas y quirúrgicas, como la hemorragia intracraneal, cirugías con elevado riesgo hemorrágico y complicaciones derivadas del tratamiento trombolítico.

A nivel quirúrgico, los anti-fibrinolíticos además de reducir la hemorragia postoperatoria, pueden constituir una alternativa a la transfusión de sangre y otros hemoderivados en cirugía cardíaca, hepática y ortopédica. Sin embargo, el uso de estos preparados no se ha generalizado, en parte porque no existen suficientes estudios demostrando su eficacia y además porque pueden aumentar el riesgo de complicaciones trombóticas (Mangano DT *et al.* The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. N Engl J Med 2006; 354: 353-365).

Por ejemplo en la cirugía hepática, fundamentalmente trasplante hepático, el empleo de anti-fibrinolíticos como aprotinina y AMCHA consigue una reducción de las complicaciones hemorrágicas, pero puede asociarse con problemas trombóticos (de Boer MT *et al.* Minimizing blood loss in liver transplantation: progress through research and evolution of techniques. Dig Surg 2005; 22:265-275).

En la hemorragia intracraneal, los anti-fibrinolíticos tampoco se han incorporado a las guías de práctica clínica (You H *et al.* Hemostatic drug therapies for acute intracerebral haemorrhage. Cochrane Database Syst Rev 2006; CD005951). En el caso particular de la hemorragia cerebral primaria o secundaria a tratamiento trombolítico, el uso del factor VIIa recombinante es el único tratamiento que parece presentar algún efecto beneficioso en términos de reducción de la mortalidad (29% en de los pacientes que reciben placebo, frente al 18% de los pacientes que reciben factor VIIa) y de reducción de secuelas neurológicas [Mayer S.A., Brun N.C. *et al.*; "Recombinant Activated Factor VII Intracerebral Hemorrhage Trial Investigators. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage"; N Engl J Med. 2005; 352: 777-785].

La coagulación intravascular diseminada (CID) representa otra condición clínica que cursa con hemorragia masiva, en la que la administración de anti-fibrinolíticos actuales está contraindicada por favorecer la trombosis generalizada (Paramo JA. Coagulación intravascular diseminada. Med clin (Barc) 2006; 127:785-9).

La trombolisis con activadores del plasminógeno, tipo tPA o uroquinasa, es uno de los tratamientos de elección en el infarto agudo de miocardio y el ictus isquémico, pero su empleo se asocia con una elevada incidencia de hemorragia mayor que puede alcanzar el 14% y de hemorragia intracraneal hasta en 4% de los casos. Además del tratamiento con hemoderivados, los anti-fibrinolíticos tipo EACA o AMCHA están indicados cuando se produce una hemorragia excesiva, si bien su empleo puede favorecer la recurrencia trombótica.

La hemorragia excesiva tras extracción dental es una de las complicaciones más frecuentes en pacientes con coagulopatías congénitas, como la hemofilia A. En estas situaciones el empleo local de agentes anti-fibrinolíticos y anti-hemorrágicos (ac. tranexámico, desmopresina y Factor VII) contribuyen a la persistencia del coágulo y a la prevención de la hemorragia (Franchini M *et al.* Dental procedures in adult patients with hereditary bleeding disorders: 10 years experience in three Italian Hemophilia Centers. *Haemophilia* 2005; 11:504-509).

Los anti-fibrinolíticos son, asimismo, la primera línea de tratamiento en mujeres con menorragia asociada a coagulopatías congénitas, en combinación con la terapia hormonal (Demers C *et al.* Gynaecological and obstetric management of women with inherited bleeding disorders. *J Obstet Gynaecol* 2005; 27:707-732).

La aplicación de medidas tópicas con geles de fibrina ha supuesto un avance para prevenir la hemorragia relacionada con la herida quirúrgica, pero su utilidad clínica aún no se ha establecido (Gabay M. Absorbable hemostatic agents. *Am J Health Syst Pharm*. 2006; 63:1244-53).

La aplicación intravenosa o tópica de inhibidores de MMPs podría restaurar más precozmente la hemostasia reduciendo las complicaciones hemorrágicas locales o asociadas con el tPA (Lapchak PA, Araujo DM. Reducing bleeding complications after thrombolytic therapy for stroke: clinical potential of metalloproteinase inhibitors and spin trap agents. *CNS Drugs*. 2001; 15:819-29), favoreciendo la persistencia del coágulo, la reparación y la cicatrización de heridas quirúrgicas. Aún constituyendo esta opción una estrategia prometedora, las mayoría de los ensayos clínicos con inhibidores de MMPs han fracasado, ya sea por las bajas dosis empleadas (eficacia vs toxicidad) o por los efectos secundarios observados (síndrome musculoesquelético). Sería necesario buscar inhibidores más selectivos que bloqueen únicamente los mecanismos moleculares asociados a una MMP específica y evitar así efectos adversos (Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. 2006; 69:677-687).

El objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones terapéuticas alternativas para el tratamiento anti-fibrinolítico y de complicaciones hemorrágicas, que inhiban la lisis de los coágulos de fibrina.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1. Ensayo de turbidimetría del plasma recalcificado expresado como los valores de absorbancia a 405 nm frente al tiempo que dura el experimento en minutos. A: La gráfica recoge las diferencias en la formación del coágulo (absorbancia máxima) del plasma sólo (control) o en presencia de MMP-10 (200 nM) ó MMP-3 (200 nM). B: La gráfica representa la formación y lisis del coágulo de fibrina del plasma recalcificado en presencia de los activadores del plasminógeno tPA (30 U/ml) y uPA (135 U/ml) solos, o combinados con MMP-10 (200 nM) y también en presencia de una dosis equivalente de MMP-3 (200 nM) combinada con tPA (30 U/ml).

Figura 2. Placa de fibrina polimerizada en la que se muestran las áreas de lisis producidas por el tPA (1 U/ml) y la MMP-10 (200 nM) solas o añadidas conjuntamente.

Figura 3. Ensayo de actividad de la MMP-10 (100 nM) en plasma con un sustrato fluorescente de las estromelinas. La concentración de anticuerpo monoclonal (MAb) que inhibe la actividad de la MMP-10 en plasma se determinó mediante la reducción en la pendiente en la formación del sustrato. Como control se utilizó un anticuerpo control de isotipo (IgG).

Figura 4. Western blot con el anticuerpo que inhibe la actividad de la MMP-10. Marcador de peso molecular (calle 1), MMP-1 (calle 2), MMP-3 (calle-3), MMP-10 (calle 4). El anticuerpo inhibidor de la actividad MMP-10 únicamente reconoce el proenzima (55 kDa) y enzima activo (45 kDa) de la MMP-10, sin mostrar reacción cruzada con otras metaloproteasas.

Figura 5. Ensayo de turbidimetría del plasma recalcificado con MMP-10 (200 nM) en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal (MAb) que inhibe la actividad de la MMP-10, y de un anticuerpo control de isotipo (IgG).

Figura 6. Placa de fibrina ilustrando las diferencias en el área de lisis producida por el tPA (1 U/ml) y la MMP-10 (200 nM) en presencia o ausencia de un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad de la MMP-10 (MAb) y el anticuerpo control de isotipo (IgG).

Descripción detallada de la invención

En un primer aspecto la invención se refiere al uso de un anticuerpo neutralizante de la metaloproteinasa de matriz-10 (MMP-10) en la preparación de un medicamento para tratamiento anti-fibrinolítico.

La MMP-10 (Código de Enzima EC-Number 3.4.24.22) se denomina también como metalopeptidasa de matriz 10, estromelina 2 (STMY2), transina 2 o proteoglicanasa 2. En el hombre, el gen que codifica la MMP-10 se localiza en el cromosoma 11 (11q22.3; HUGO Gene Nomenclature Committee HGNC_ID: 7156; UniProtKB/Swiss-Prot Accesion Number: P09238).

Esta metaloproteinasa la expresan diversos tipos celulares como las células endoteliales, monocitos y fibroblastos. Se sabe que puede ser activada por plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G y puede degradar un amplio rango de sustratos de la matriz extracelular, como agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, tenascina-C, vitronectina y colágenos tipo II, III, IV, IX, X, XI. Además, la MMP-10 puede activar otras metaloproteinasas de matriz, como la proMMP-1, -3, -7, -8 y -9 [Nakamura H *et al.*; Eur. J. Biochem., 1998; 253:67-75].

Asimismo es conocido que la MMP-10 participa en diversos procesos fisiológicos, como el crecimiento óseo o la cicatrización de heridas. Además, se halla sobreexpresada en córneas de pacientes con retinopatía diabética y se ha relacionado con algunos tipos de carcinomas, así como con tumores linfoides. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que, en cultivos de queratinocitos, la expresión de MMP-10 puede inducirse tanto por factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, de queratinocitos o TGF-beta), como por citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1beta) [Rechardt O *et al.*; J. Invest. Dermatol., 2000; 115:778-787]; [Li de Q *et al.*; Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003; 44:2928-2936].

Igualmente en divulgaciones anteriores a esta invención se ha descrito que la MMP-10:

- puede constituir un biomarcador inflamatorio de riesgo vascular [Montero I *et al.*; J. Am. Col. Cardiol., 2006; 47:1369-1378] [Orbe J *et al.*; J. Thromb. Haemost., 2007; 5:91-97];

- se induce en células endoteliales que están formando capilares en matrices de colágeno 3D y participa en la regresión de la formación de capilares mediante la activación de la MMP-1 [Saunders WB *et al.*; J. Cell Sci., 2005; 118:2325-2340]; y que

- juega un papel fundamental en el mantenimiento de las uniones intracelulares que preservan la integridad vascular en los procesos de remodelado y angiogénesis [Chang S *et al.*; Cell, 2006; 126:321-334].

- participa en la cicatrización de heridas incrementando la migración de queratinocitos y la reorganización de tejidos que ocurre por la degradación proteolítica de las proteínas de la matriz [Krampert M, *et al.*; Mol Biol Cell, 2004;5242-5254].

En la presente invención se ha ensayado el efecto de la MMP-10 y de la MMP-3 en la formación y lisis de coágulos sobre plasma humano, así como en otros modelos *in vitro* de degradación de fibrina polimerizada.

Los inventores han podido comprobar que la MMP-10 no tiene una actividad trombolítica directa y que no es capaz de alterar por sí misma la formación del coágulo ni de degradar la fibrina. Sorprendentemente han comprobado también que en presencia de agentes activadores de la trombolisis, particularmente activadores del plasminógeno, la MMP-10 favorece la disolución de los coágulos de fibrina y reduce el tiempo de lisis. La MMP-10 actúa, por tanto, como un facilitador o adyuvante de la acción trombolítica de otros activadores de la trombolisis.

Por el contrario, una metaloproteinasa de matriz fibrinolítica como la MMP-3, con actividad proteolítica directa sobre la fibrina y el fibrinógeno, no reduce los tiempos de lisis del coágulo que por sí solos proporcionan los activadores de la trombolisis.

Todavía más sorprendentemente, los inventores han comprobado que la adición de anticuerpos específicos frente a la MMP-10 es capaz de inhibir el efecto de la MMP-10, pudiendo llegar a bloquear completamente la disolución del coágulo, incluso en presencia de activadores de la fibrinolisis.

En consecuencia, un agente inhibidor de la MMP-10, p.ej. un anticuerpo, podría suponer un avance importante en el control de las hemorragias en el ámbito médico y quirúrgico, así como una alternativa a la transfusión de sangre en pacientes con hemorragia excesiva causada por una alteración de la fibrinolisis,

- 1.- por su capacidad de reducir y bloquear la lisis del coágulo de fibrina incluso en presencia de activadores del plasminógeno

- 2.- por ser una molécula que no altera la formación del coágulo de fibrina.

La MMP-10 al ser una proteína que actúa por un mecanismo independiente del sistema hemostático, no presentaría las complicaciones trombóticas de los anti-fibrinolíticos convencionales.

Además el bloqueo selectivo de la MMP-10 no causará los efectos secundarios asociados a una inhibición de MMPs no-selectiva, como el síndrome musculoesquelético, en el se han implicado otras MMPs como la MMP-9 y MMP-14.

Anticuerpo neutralizante de la MMP-10

En el contexto de la invención el término "anticuerpo" incluye en primer lugar anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos totalmente humanos.

Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpos producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. Incluyen también anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos a partir de las mezclas heterogéneas, por ejemplo mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específicos para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas convencionales ya descritas, p. ej. en Köhler and Milstein [Nature, 1975; 256:495-397] o Harlow and Lane ["Using Antibodies. A Laboratory Manual" de E. Harlow y D. Lane, Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación o recombinación de anticuerpos procedentes de distintas especies animales. En una configuración típica pero no limitativa de la invención, el anticuerpo quimérico incluye una parte de un anticuerpo monoclonal, generalmente la región variable (Fv) que incluye los sitios para reconocimiento y unión al antígeno, y la otra parte correspondiente a un anticuerpo humano, generalmente la parte que incluye la región constante y la constante adyacente.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante clonación e injerto de las regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano en sustitución de sus propias regiones hipervariables CDR.

Un anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con sistema inmune humano o por inmunización *in vitro* de células inmunes humanas (incluyendo tanto inmunización genética como tradicional con o sin adyuvantes y antígeno puro o no; o mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmune) o mediante bibliotecas nativas/sintéticas producidas desde células inmunes humanas. Estos anticuerpos pueden obtenerse y seleccionarse desde animales transgénicos (p. ej. ratones) en los que se han clonado genes de las inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno objetivo. Igualmente estos anticuerpos pueden obtenerse por selección de regiones variables de cadena simple (scFv) o de unión al antígeno (Fab) humanas presentadas en bibliotecas de fagos (phage display) y posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y presentación (display), de las librerías generadas por clonación de las regiones variables de ambas cadenas y posterior combinación/mutación de estas para generar librerías de anticuerpos.

Por otra parte, el anticuerpo o anticuerpos de la invención pueden ser de cualquier clase o subclase de inmunoglobulinas, y particularmente IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

En una realización particular, los anticuerpos son anticuerpos completos, que incluyen todas las regiones funcionales típicas de una inmunoglobulina natural, en particular las regiones para el reconocimiento y unión específica con el antígeno.

En segundo lugar el término "anticuerpo" incluye también un fragmento de anticuerpo, obtenido desde la proteína o mediante tecnología recombinante, que expresado en procariotas, levaduras o eucariotas, glicosilado o deglicosilado, y que puede consistir en las zonas variables de los anticuerpos unidas entre sí por un péptido de unión (scFv), o la zona variable junto a la constante CH1 de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera mediante cisteínas o mediante péptidos de unión y puente disulfuro (scFab), o nuevas variantes, como cadenas pesadas solas, o cualquier modificación que se haga de estos con el fin de hacerlos más afines, menos inmunogénicos (humanizados) o más estables en fluidos biológicos y que tengan capacidad de inhibir la MMP-10 por unión a su centro activo o a cualquier otro dominio de la proteína que disminuya su actividad.

En el contexto de la invención los términos anticuerpo "neutralizante" o "antagonista" de la MMP-10 se refieren indistintamente a un anticuerpo, definido en los términos ya indicados, que es capaz de reconocer y unirse específicamente a la MMP-10 con una afinidad en el rango nanomolar o picomolar. Además, dicho anticuerpo es capaz de inhibir o bloquear, total o parcialmente, la actividad de la MMP-10. En particular dicho anticuerpo es capaz de inhibir o bloquear la acción que ejerce la MMP-10 como facilitadora de la disolución de los coágulos de fibrina, reduciendo los tiempos de lisis (actividad fibrinolítica-trombolítica). En una realización particular, el anticuerpo neutralizante inhibe la acción adyuvante que la MMP-10 ejerce sobre los activadores del plasminógeno (tPA, uPA, etc).

Obtención de los anticuerpos neutralizantes de la MMP-10

Los anticuerpos neutralizantes de la invención pueden producirse mediante métodos convencionales ya conocidos para la producción de anticuerpos. Sin que esto suponga limitación alguna, pueden utilizarse entre otras: técnicas de inmunización en animales, incluidos animales transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas, producción de monoclonales mediante hibridomas, producción mediante librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas o derivadas de organismos inmunizados frente al antígeno de interés y que podrían ser seleccionadas mediante muy diferentes métodos de presentación o "display" (phage display, ribosome display, etc.) y posteriormente, mediante técnicas de ingeniería genética podrían ser rediseñadas y expresadas en vectores diseñados para la producción de

anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composición y estructura. Una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de los anticuerpos puede encontrarse, por ejemplo, en:

“*Handbook of Therapeutic Antibodies*”, de S. **Dübel**, Publisher: Wiley-VCH, 2007, Vols: I a III (ISBN 978-3527314539);

“*Antibodies: Volume 1: Production and Purification*” de G. Subramanian Ed., Publisher: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458);

“*Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use*”, de G. Subramanian Ed., Publisher: Springer, 1st ed, 2004 (ISBN 978-0306483158);

“*Molecular Cloning: a Laboratory manual*”, de J. Sambrook y D. W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3th edition, 2001 (ISBN 978-0879695774);

En una realización particular, no limitativa de la invención, un procedimiento para la obtención y producción de un anticuerpo monoclonal neutralizante de la MMP-10 puede constar de las siguientes etapas:

1.- inmunizar ratones con una solución de MMP-10 o un fragmento inmunogénico de MMP-10 o plásmido conteniendo MMP-10 o derivados.

2.- Seleccionar los animales con respuesta policlonal frente al antígeno mediante western blot, ELISA o inmunocitoquímica.

3.- Realizar la fusión de esplenocitos del animal con células de mieloma (SP2/O-Ag14; P3X63-Ag8.6.5.3; P3-NS-1-Ag4-1; etc.), de modo que se generarán híbridos entre los diversos tipos celulares: y se seleccionará con medio HAT (de hipoxantina, aminopterina y timidina) aquellos híbridos de linfocito B del animal y células de mieloma que producirán anticuerpo y además serán inmortales en cultivo.

4.- Seleccionar los hibridomas que secreten anticuerpos que nos interesen, es decir anticuerpos que inhiban la actividad de MMP-10. Para ello se tomarán muestras de sobrenadante de todos los pocillos que contengan hibridomas para someterlos a un inmunoensayo: se realizarán ensayos de ELISA con placas tapizadas con ng o ug de MMP-10; tras una incubación de 15 horas a 4°C y el bloqueo correspondiente con una proteína adecuada, se añadirán los sobrenadantes de los cultivos, se realizarán los lavados correspondientes y a continuación se añadirá un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de ratón. De este modo, tras lavar y revelar con una reacción enzimática, los pocillos en los que se detecte color o un aumento en la absorbancia podrán contener clones de hibridomas secretores de anticuerpos frente a MMP-10.

5.- Seleccionar aquellos hibridomas capaces de inhibir la actividad de MMP-10 para lo que se realizará un ensayo con sustrato fluorogénico. Se utilizará una microplaca tapizada con distintas concentraciones de un anticuerpo anti-MMP-10 (R&D systems, Clon110343) y el sustrato fluorogénico de estromelisin (MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys-[DNP]-NH₂) (R&D systems; ES002, Abingdon, UK). La fluorescencia (320 nm excitación y 405 nm emisión) se medirá en un espectrofluorímetro (SpectraMAX GeminiXS, Molecular Devices, CA, USA) durante 2 h con lecturas cada 5 min. En relación a una concentración constante de MMP-10 activa se seleccionarán aquellos hibridomas que a menor concentración y preincubados con la proteína 30 min a 37°C, reducen la actividad de la MMP-10 al menos un 50% (IC50).

Las células productoras de anticuerpos del pocillo del que proviene el sobrenadante seleccionado se crecerán y se congelarán en nitrógeno líquido.

6.- Asegurar que cada cultivo de células que secreta un anticuerpo anti-MMP-10 es monoclonal. Se aplicarán técnicas de clonaje o dilución límite y se harán crecer células aisladas en nuevas microplacas de cultivo a partir del cultivo original o células madre que dieron positivo en el primer ensayo de ELISA y ensayo de actividad. Una vez que las nuevas colonias surgidas a partir de una o más células hayan adquirido el tamaño suficiente, se tomarán de nuevo sobrenadantes de estas para someterlos a un nuevo ELISA y ensayo de actividad. Se repetirá el proceso hasta que el 100% de los sobrenadantes analizados contengan anticuerpos frente a la actividad de la MMP-10.

7.- Purificar los anticuerpos de los sobrenadantes mediante cromatografía de líquidos (cromatografía de inmunoafinidad, de afinidad, de intercambio catiónico, de hidroxipatita, de interacción hidrofóbica, de filtración en gel, etc.) en un equipo ÄKTA FPLC, GE Healthcare Bio-Science.

8.- Por último, analizar la pureza, la especificidad, afinidad y actividad fibrinolítica de aquellos que se han seleccionado.

La pureza del anticuerpo puede determinarse, por ejemplo, mediante gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que se teñirá con azul de Coomassie para corroborar la presencia de banda única.

La especificidad del anticuerpo puede determinarse mediante western blot frente a otras metaloproteasas (especialmente la MMP-3 con la que comparte mayor homología) a concentraciones de ng a g y revelando por quimioluminiscencia.

5 La constante de afinidad de los anticuerpos puede calcularse a partir de la constante de disociación (K_d) definida como la pendiente que se obtiene al representar los valores de absorbancia del ELISA tapizado con MMP-10 frente a concentraciones crecientes del anticuerpo analizado.

10 La capacidad neutralizante de la actividad fibrinolítica que dicho anticuerpo posee puede analizarse mediante ensayo de turbidimetría de formación y lisis de coágulos de fibrina y en ensayo de fibrina polimerizada, por ejemplo mediante los ensayos descritos en los ejemplos 1 y 2.

15 Por otra parte, el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo neutralizante de la MMP-10, podría servir como producto intermedio para la obtención de un anticuerpo quimérico o humanizado también neutralizante de la MMP-10.

20 No obstante lo anterior, el método para la producción del anticuerpo neutralizante de la MMP-10 no es un aspecto crítico, y por tanto el técnico o experto en la materia podría fácilmente producir los anticuerpos de la invención mediante cualquier otro método convencional para la producción de anticuerpos.

Indicación terapéutica tratamiento antifibrinolítico

25 En general el anticuerpo neutralizante de MMP-10 (o el medicamento que lo contiene) es útil para el tratamiento anti-fibrinolítico.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención es útil para el tratamiento, preventivo o terapéutico, de hemorragias o complicaciones hemorrágicas.

30 En unos casos, las complicaciones hemorrágicas a tratar se pueden producir en pacientes con estados hiperfibrinolíticos y defectos en la coagulación, que pueden estar causados por alteraciones congénitas (hemofilia A, enfermedad de von Willebrand, deficiencia de PAI-1 o alfa2-antiplasmina), o también por complicaciones adquiridas, p. ej. derivadas del tratamiento con agentes anti-coagulantes, o en pacientes con coagulación intravascular diseminada CID, algunas cirugías o tumores de tejidos y órganos ricos en activadores de la fibrinólisis, o en situaciones de fallo de aclaramiento de los activadores del plasminógeno como en enfermedad hepática severa, o en leucemia promielocítica aguda asociada a CID.

40 Entre estas complicaciones hemorrágicas se incluyen, entre otras, hemorragia menstrual excesiva (menorragia), hemorragias gastrointestinales, urinarias, dentales y particularmente hemorragias en pacientes con defectos en la coagulación por algunas de las causas ya mencionadas (hemofilia A, enfermedad de von Willebrand, con tratamiento anti-coagulante, CID, etc).

45 En otros casos, las hemorragias y complicaciones hemorrágicas a tratar pueden producirse en procedimientos quirúrgicos (cirugías en general, incluidos trasplantes y biopsias), particularmente cirugía de órganos ricos en activadores del plasminógeno (próstata, pulmón, útero) y en cirugía sobre pacientes en estados hiperfibrinolíticos o con defectos en la coagulación como los ya señalados. En estos casos el objetivo será reducir las hemorragias derivadas de la cirugía, mediante un tratamiento (previo, durante y/o posterior a la cirugía) con un medicamento que comprenda un anticuerpo neutralizante de la MMP-10.

50 Asimismo, la aplicación tópica de anticuerpos anti-MMP-10 podría ser de utilidad para restablecer la comunicación vascular tras la realización de un injerto vascular, incluyendo el inhibidor en una formulación tipo gel de fibrina, para prevenir la hemorragia relacionada con la herida quirúrgica.

55 En el contexto de la invención el término “tratamiento” incluye la administración del medicamento que contiene el anticuerpo neutralizante de la MMP-10 para prevenir o reducir la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de un estado hiperfibrinolítico, y muy particularmente prevenir la aparición de eventos hemorrágicos. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para prevenir la manifestación de sus síntomas clínicos o subclínicos. Puede ser también un tratamiento terapéutico para suprimir o aliviar los síntomas después de que ya se hayan manifestado y puede constituir una alternativa a la transfusión de sangre en el caso en el que ésta fuera necesaria.

Composición farmacéutica

65 Conforme a la invención, los anticuerpos neutralizantes se emplean en la preparación de una composición farmacéutica como medicamento para tratamiento anti-fibrinolítico.

Dicha composición farmacéutica comprende al menos un anticuerpo neutralizante de MMP-10 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo o composición farmacéutica de la invención son particularmente útiles para administración parenteral, por ejemplo, para administración subcutánea, intramuscular o intravenosa.

En una realización concreta pero no limitativa de la invención, la composición farmacéutica contiene una solución del anticuerpo o anticuerpos neutralizantes de MMP-10, disuelto en un vehículo aceptable, p. ej. un vehículo acuoso como agua, agua tamponada, suero salino, glicina u otro similar. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de partículas. La composición farmacéutica puede contener otros ingredientes adicionales, como agentes para ajustar el pH, conservantes, etc.

En otra realización, la composición farmacéutica sería adecuada para administración local, en forma de gel o pasta e incluso en forma de ampolla bebible con la que hacer enjuagues en caso de hemorragias por extracción dental.

Una revisión de las distintas composiciones y formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en: "Tecnología farmacéutica", de J.L. Vila Jato, 1997 Vols I y II, Ed. Síntesis, Madrid; o en "Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations", de S.K. Niazi, 2004 Vols I a VI, CRC Press, Boca Raton.

La cantidad de ingrediente activo (anticuerpos) que puede combinarse con el material vehiculizante para producir una única forma de dosificación será generalmente la cantidad que produce un efecto terapéutico. La preparación de una composición farmacéutica parenteral en forma de unidades de dosis facilita la administración y la uniformidad de las dosis, por lo que resulta muy ventajosa. Estas unidades de dosificación pueden ser preparadas por el experto en la materia de acuerdo a las técnicas convencionales, y teniendo en cuenta el efecto terapéutico concreto que se quiere lograr y la indicación terapéutica concreta.

Las dosis efectivas de la composición farmacéutica de la invención dependerán de múltiples factores, incluidos los medios y vías de administración, lugar de acción objetivo, estado fisiológico del paciente, otra medicación administrada al paciente, o si se trata de un tratamiento profiláctico o terapéutico. No obstante, en una realización particular la unidad de dosis a administrar del anticuerpo neutralizante de la invención estará comprendida entre 1,0 y 10,0 mg/Kg. Típicamente el régimen de administración incluirá la administración repetida de la composición con los anticuerpos de la invención, con intervalos entre cada administración que pueden ser diarias semanales, mensuales, bimensuales, o cualquier otro que el farmacólogo establezca atendiendo a las necesidades del paciente (indicación particular, severidad, etc), y conforme a los protocolos farmacológicos normalizados habituales.

Ejemplos de la invención

Los ejemplos que ilustran los efectos sobre la actividad fibrinolítica y trombolítica de las metaloproteinasas de matriz MMP-10 y MMP-3, bien sea directamente o en combinación con algunos activadores del plasminógeno: uroquinasa (uPA) y activador tisular del plasminógeno (tPA).

Para los ejemplos se ha empleado:

- MMP-10 recombinante, obtenida como pro-enzima de 58 kDa con un 20-30% de enzima maduro de 48 kDa (R&D Systems, 910-MP, Abingdon, UK), que fue reconstituida con tampón TCNB (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,05% Brij35).
- MMP-3 recombinante, obtenida como proenzima de 52 kDa (R&D Systems, 513-MP, Abingdon, UK), suministrada en una solución con 12,5 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 0,025% Brij35 y 50% de glicerol.
- Uroquinasa (uPA) (Vedim Pharma SA; 628602, Barcelona, España).
- Activador tisular del plasminógeno (tPA) recombinante (Boehringer Ingelheim; 985937 Actilyse®, Ingelheim, Alemania).

Para la evaluación de la actividad trombolítica se utilizó un método turbidimétrico para monitorizar la formación y lisis del coágulo de fibrina sobre muestras de plasma, de acuerdo con el protocolo descrito previamente por von dem Borne y colaboradores [Blood, 1995; 86:3035-3042].

Por otra parte, para evaluar la actividad sobre la lisis de fibrina, realizaron ensayos en placas de fibrina, siguiendo el procedimiento descrito por Edward [J. Clin. Path., 1972; 25: 335-337].

Ejemplo 1

Efecto de la MMP-10 y MMP-3 en la formación y lisis de coágulos

Como se ha mencionado anteriormente, mediante el procedimiento descrito por von dem Borne y colaboradores, se evaluó el efecto de la MMP-10 y de la MMP-3 sobre el sistema hemostático. En este método se valoran los cambios de turbidez/absorbancia durante la formación y lisis de coágulos como indicador en el tiempo de ambos procesos. La medida de la turbidez se realiza por lectura de la absorbancia a 405 nm durante las fases de formación y lisis de coágulos, utilizando un lector fotométrico, en nuestro caso un lector de ELISA (Fluostar Optima, BMG Labtech). El incremento de turbidez/absorbancia indica la formación del coágulo de fibrina mientras que el descenso de este parámetro indica la lisis del coágulo.

Para la formación del coágulo se mezclaron en un pocillo de microplaca 75 μ l de plasma citratado, 75 μ l de tampón HEPES (25 mM HEPES, 137 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 6 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgCl_2 , y 0.1% BSA, pH=7.5) y 10 μ l de CaCl_2 150 mM. La placa se incubó a 37°C y se midió la absorbancia a 405 nm durante 2 h, con lecturas cada 30 segundos.

Para estudiar el efecto de la MMP-10 en la formación del coágulo, se añadió MMP-10 activada (50, 100 y 200 nM) a la mezcla inicial de plasma y tampón HEPES. Antes de su utilización en los experimentos, la MMP-10 se activó mediante tratamiento térmico a 37°C durante 1 h.

En ensayos paralelos, se analizó también el efecto sobre la formación del coágulo con la MMP-3 (200 nM). En este caso la MMP-3 se activó previamente con 1 mM de acetato p-aminofenilmercurio (APMA, 164610, EMD Biosciences, La Jolla, USA) a 37°C durante 24 h.

Como se observa en la Figura 1A, la MMP-10 no indujo cambios ni en la velocidad de formación del coágulo ni en el máximo de turbidez alcanzada con ninguna de las dosis empleadas (Tabla 1). Sin embargo, la MMP-3 indujo un descenso del 50% en el máximo de absorbancia/turbidez del coágulo formado, probablemente por su acción proteolítica directa sobre el fibrinógeno.

Estos resultados demuestran que la MMP-10, a diferencia de lo descrito para la MMP-3, no altera la tasa de formación del coágulo por no presentar actividad frente al fibrinógeno.

Posteriormente se estudió la tasa de lisis de coágulo de fibrina y para ello, como en el apartado anterior, se empleó plasma recalcificado en tampón HEPES al que simultáneamente con la MMP-10 (o MMP-3 en su caso) se añadió un activador del plasminógeno a elegir entre 30 U/ml de activador tisular del plasminógeno (tPA), o 135 U/ml de uroquinasa (uPA) al comienzo de la turbidimetría.

Las concentraciones de tPA y uPA a utilizar se determinaron en estudios previos de dosis-respuesta, donde la dosis de elección fue aquella que lisaba completamente el coágulo de fibrina en el plazo de 2 h.

Como se observa en la Figura 1B y tabla 1, la MMP-10 en ausencia de tPA y uPA no produjo la lisis del coágulo de fibrina, mientras que en presencia de los activadores tPA o uPA indujo un aumento significativo en la tasa de lisis del coágulo de fibrina. Con la máxima dosis de MMP-10 ensayada (200 nM) el acortamiento del tiempo de lisis (tiempo al cual se lisa la mitad del coágulo) fue de 15 min (52,9 min vs 68,3 min, $p < 0.01$) en presencia de tPA y de 5 min en presencia de uPA (42 min vs 47.5 min, $p < 0.05$). Esta reducción del tiempo de lisis supone un porcentaje de acortamiento de un 20% en presencia del tPA y de un 10% con el uPA.

Por el contrario, la MMP-3 no modificó la tasa de lisis del coágulo en presencia de tPA.

Estos resultados indican que la MMP-10, a diferencia de la MMP-3, no es capaz de digerir la fibrina, pero aumenta el efecto fibrinolítico de los activadores del plasminógeno y de la fibrinólisis (tPA o uPA). La MMP-10, al no poseer capacidad para actuar sobre la fibrinólisis endógena, evitaría o atenuaría la aparición de hemorragias, lo que le convierte en un buen candidato para su utilización como coadyuvante de la terapia trombolítica.

ES 2 313 841 B1

TABLA 1

Tiempo de lisis del coágulo de fibrina (expresado en minutos), en presencia de los activadores del plasminógeno (tPA o uPA)

	tPA 30 U/ml	tPA 20 U/ml	tPA 15 U/ml	uPA 135 U/ml
Control	68,3	102,0	125,3	47,5
MMP-10 50 nM	65,5	-	-	-
MMP-10 100 nM	61,2	-	-	-
MMP-10 200 nM	52,9	84,7	108,7	42,0
MMP-3 200 nM	76,3	-	-	-
Anti-MMP-10 (MAb)	No lisis	-	-	No lisis
Control isotipo (IgG)	74,3	-	-	48,3

Ejemplo 2

Efecto de la MMP-10 en la degradación de fibrina

De acuerdo con el procedimiento de Edward mencionado anteriormente, se estudió el efecto sobre la lisis de fibrina midiendo el halo o área de lisis que se produce en una placa de fibrina polimerizada.

Las placas de fibrina se preparan a partir de una solución 6 mg/ml de fibrinógeno humano (Sigma, F3879, Saint Louis, MO, USA) en tampón veronal (BioWhittaker, 12-624E, Cambrex, MD, USA) a 37°C, que se filtra y a la que se añade un volumen igual de CaCl₂ (50 mM). Esta solución (6 ml) se mezcla con 1 unidad internacional (NIH units) de trombina (Enzyme Research Lab; HT1200a, Swansea, UK) y se deja polimerizar durante 6 h.

Para valorar la capacidad fibrinolítica, sobre distintas placas de fibrina se añadió: tPA (1 U/ml), MMP-10 (200 nM), o una combinación de ambos.

Como se observa en la Figura 2, la MMP-10 sola no produjo lisis sobre la fibrina polimerizada, mientras que el tPA produjo una marcado halo. Sin embargo, la combinación de tPA con MMP-10 aumentó significativamente el área de lisis de fibrina polimerizada (188,6%), hecho que confirma el efecto facilitador de la fibrinólisis de la MMP-10 en combinación con activadores del plasminógeno como agentes fibrinolíticos.

Ejemplo 3

Inhibición de la fibrinólisis y lisis de coágulos inducida por tPA con anticuerpos anti-MMP-10

De acuerdo con los resultados de los Ejemplos 1 y 2, se analizó la especificidad del efecto de la MMP-10 sobre la lisis de fibrina en el coágulo inducida por tPA añadiendo simultáneamente diferentes dosis de MMP-10 activa, en presencia (relación 1:2) y ausencia de un anticuerpo monoclonal que bloquea su actividad (R&D Systems, MAB9101, Abingdon, UK), o de anticuerpo control de isotipo murino IgG2B (eBioscience, 16-4732, San Diego, CA, USA) a la misma concentración.

La relación de enzima:anticuerpo que bloquea la actividad del enzima se analizó previamente en un ensayo de actividad para la MMP-10 en una microplaca tapizada con un anticuerpo anti-MMP-10 (R&D systems, Clon110343) y utilizando el sustrato fluorogénico de estromelisin (MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys-[DNP]-NH₂) (R&D systems; ES002, Abingdon, UK) [Lombard *et al.*; Biochimie, 2005; 87:265-272]. La fluorescencia (320

nm excitación y 405 nm emisión) se midió en un espectrofluorímetro (SpectraMAX GeminiXS, Molecular Devices, CA, USA) durante 1 h estableciéndose que la relación 1:2 inhibe completamente la concentración de enzima activo (Figura 3).

- 5 La especificidad del anticuerpo se estudió mediante western blot para descartar la existencia de reacción cruzada con otras metaloproteasas (Figura 4). El anticuerpo inhibidor de la MMP-10 únicamente reconoce ésta metaloproteasa, por lo que ejerce una inhibición específica de la misma, pese a la gran homología existente en la familia de las metaloproteasas y, en particular, con la otra estromelisina MMP-3.
- 10 Los resultados muestran que el efecto coadyuvante sobre la fibrinólisis es específico de la MMP-10, ya que se revierte en presencia del anticuerpo anti-MMP-10. Este efecto resulta muy destacable cuando dicho anticuerpo es añadido para bloquear la actividad endógena de la MMP-10 plasmática (Figura 5). Los resultados establecen que la ausencia de MMP-10 en el plasma impide la lisis del coágulo de fibrina incluso en presencia de tPA o uPA (Tabla 1).
- 15 Estos resultados se corroboraron en los ensayos sobre placa de fibrina polimerizada. Como se muestra en la Figura 6, en presencia del anticuerpo anti-MMP-10 se reduce el área de lisis producido por la combinación tPA:MMP-10 (91,2% vs 188,6%), mientras que el anticuerpo control no tiene ningún efecto (184,6%). Estos datos confirman que el empleo de un anticuerpo específico para la MMP-10 neutraliza y bloquea la disolución farmacológica de coágulos de fibrina.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo neutralizante de la metaloproteinasa de matriz-10 MMP-10 en la preparación de un medicamento útil para tratamiento anti-fibrinolítico.

2. Uso según la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento útil para tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas.

3. Uso según la reivindicación 2 en la preparación de un medicamento para tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes con estados hiperfibrinolíticos causados por alteraciones congénitas.

4. Uso según la reivindicación 2 en la preparación de un medicamento para tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes que reciben tratamiento anticoagulante.

5. Uso según la reivindicación 2 en la preparación de un medicamento para tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas producidas en pacientes con coagulación intravascular diseminada.

6. Uso según la reivindicación 2 en la preparación de un medicamento para tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas producidas por procedimientos quirúrgicos.

7. Uso según la reivindicación 2 en la preparación de un medicamento como alternativa a la transfusión de sangre en hemorragia aguda.

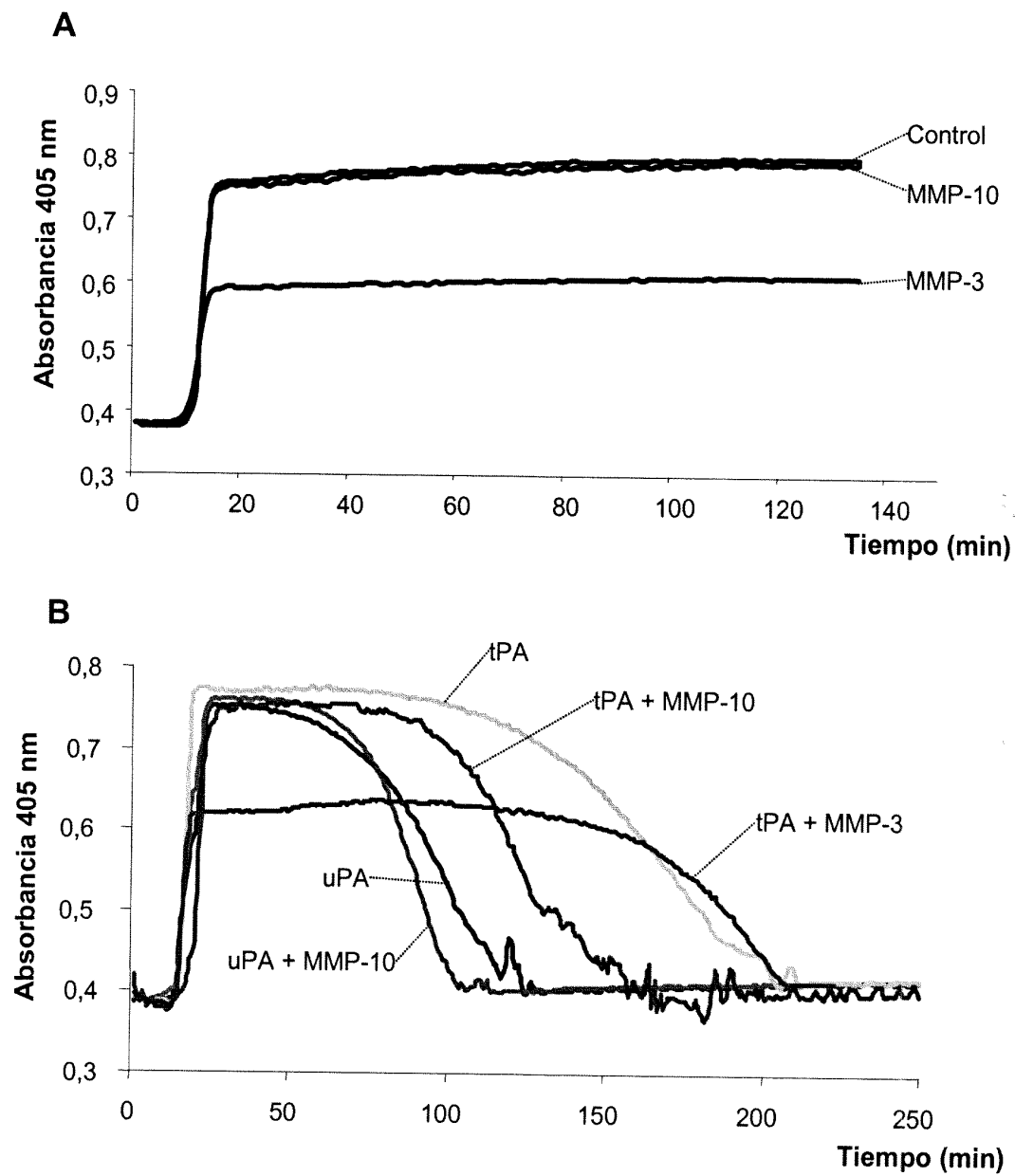


Figura 1

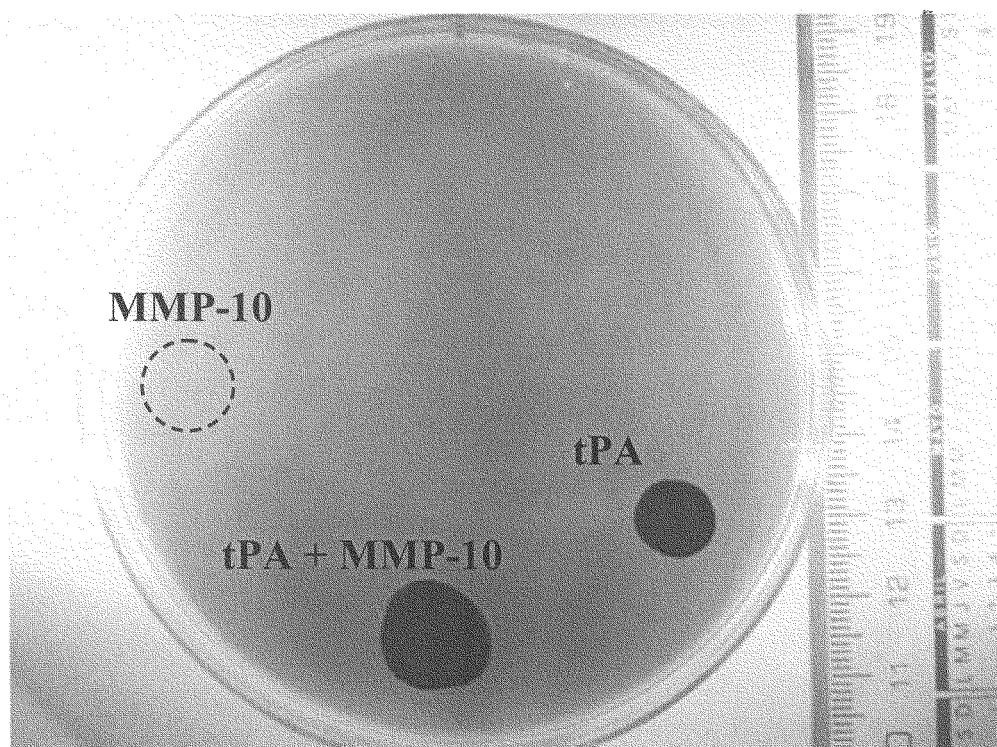


Figura 2

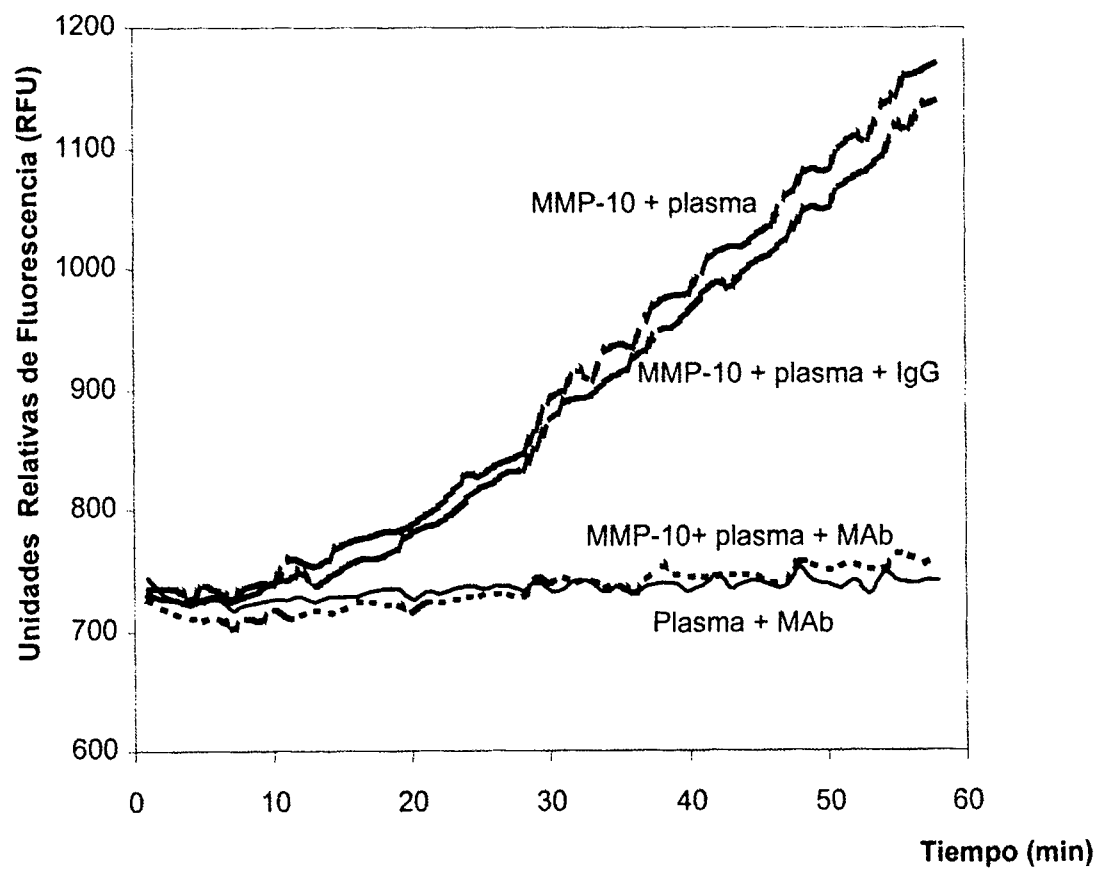


Figura 3

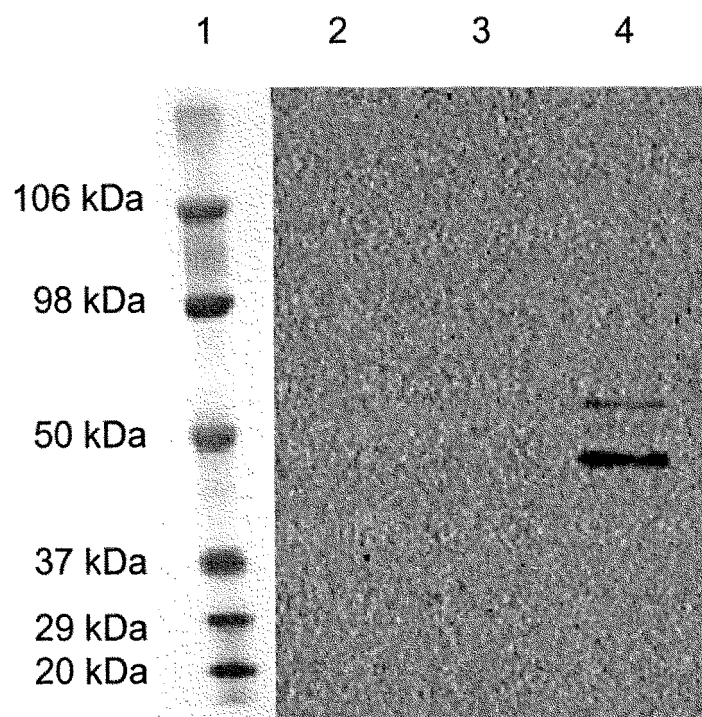


Figura 4

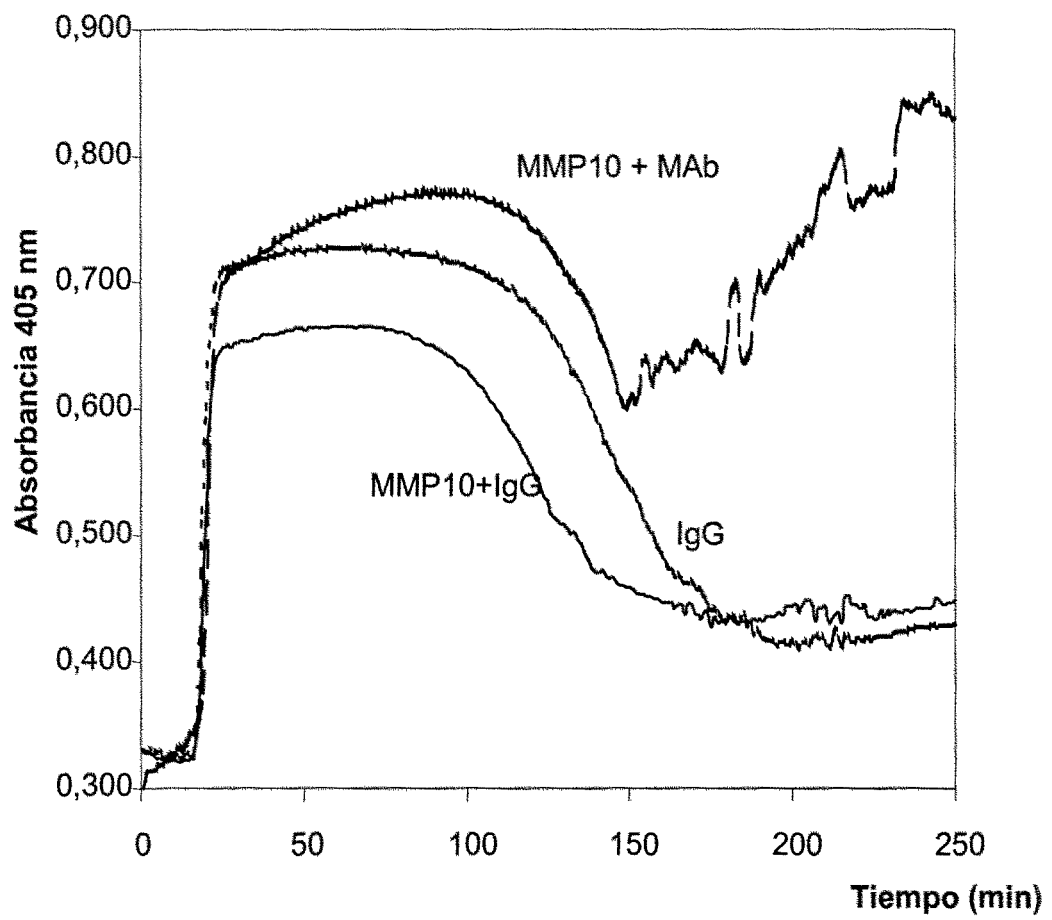


Figura 5

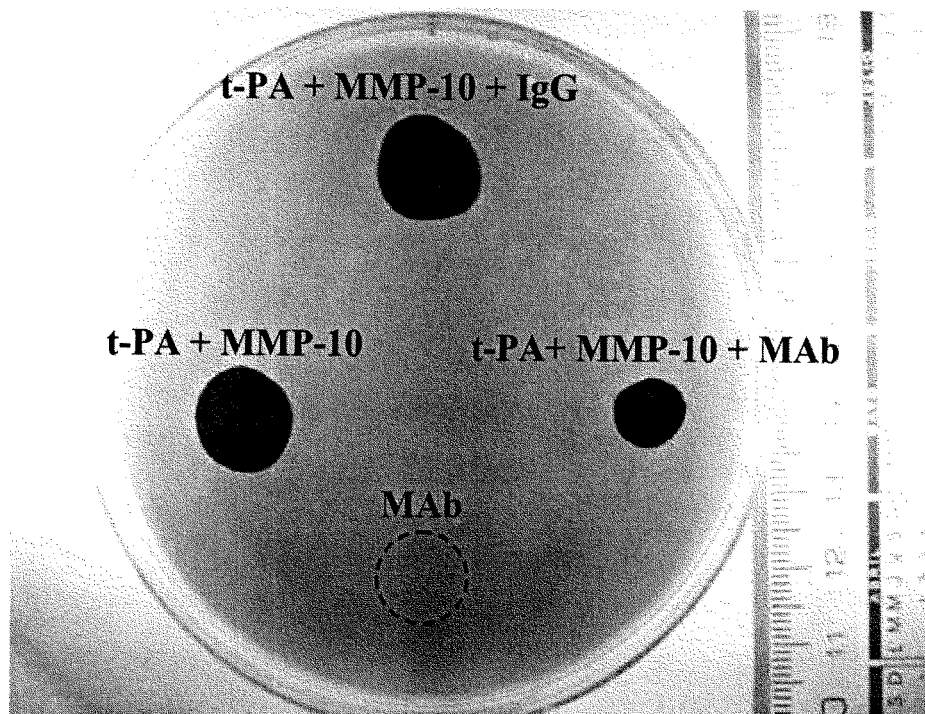


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 313 841

⑫ Nº de solicitud: 200701786

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 26.06.2007

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C07K 14/81 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20050281810 A (JEANNE BERNSTEIN) 22.12.2005	1-7
A	US 5922322 A (NEW YORK BLOOD CENTER,INC) 13.07.1999	1-7
A	EP 1060747 A1 (ALESSANDRA BINI) 20.12.2000	1-7
A	LAPCHAK PAUL A et al."Reducing bleeding complications after thrombolytic therapy for stroke: Clinical potential of metalloproteinase inhibitors and spin trap agents". CNS Drugs, vol. 15, nº 11, páginas 819-829, 2001, todo el documento.	1-7
A	LAPCHAK PAUL A et al."Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke" Stroke, vol. 31, nº 12, páginas 3034-3040, 2000, todo el documento.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.02.2009

Examinador

A. Santos Díaz

Página

1/1