(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) N.° de publicación: ES 2 040 765

(51) Int. Cl.[5]: A61K 37/02

A61K 49/02

(12) TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **88102143.0**
(86) Fecha de presentación : **13.02.88**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0 280 135**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.88**

(54) Título: **Procedimiento para preparar un agente para el tratamiento de enfermedades angiógenas o tumores.**

(30) Prioridad: **23.02.87 DE 37 05 745**

(45) Fecha de la publicación de la mención BOPI: **01.11.93**

(45) Fecha de la publicación del folleto de patente: **01.11.93**

(73) Titular/es: **Behringwerke Aktiengesellschaft**
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1, DE

(72) Inventor/es: **Stief, Thomas;**
Heimburger, Norbert y
Radtke, Klaus-Peter

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art° 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 – 28036 Madrid

DESCRIPCION

El invento concierne a un inhibidor de proteína C (PCI) en calidad de agente farmacéutico, es decir como agente terapéutico o diagnóstico in vivo o diagnóstico in vitro y, en particular, para la diagnosis y la terapia de enfermedades tumorales, a un procedimiento para la preparación de un agente farmacéutico o diagnóstico de este tipo así como a una composición que contiene inhidor de proteína C.

Es conocido que activadores de plasminógeno (PA) juegan un papel en el crecimiento de los tumores y durante la metástasis tumoral. En el caso de pacientes con tumores se manifiestan a menudo hemorragias que se relacionan con un aumento de la concentración de activadores de plasminógeno en la sangre. Inyecciones de anticuerpos frente a uroquinasa, un activador de plasminógeno, conducían en en ratones con melanomas a una tasa de metástasis significativamente más baja y a una tasa de supervivencia elevada.

En el caso de tumores malignos es de gran importancia determinar el estadío del tumor antes del comienzo del tratamiento para el tipo de tratamiento y el pronóstico clínico. En muchos casos, un diagnóstico habitual no invasivo no da suficiente información sobre el estadío del tumor. En el caso de procedimientos según el estado conocido de la técnica, la infiltración de tumores y la metástasis de tumores se vigilan con ayuda de anticuerpos monoclonales o policlonales radiactivamente marcados frente a antígenos que se manifiestan en las células tumorales. Es también conocido que venenos celulares, que están unidos a anticuerpos frente a células tumorales, pueden actuar citotóxicamente in vitro sobre las células tumorales. Los inconvenientes de estos métodos según el estado conocido de la ténica estriban, por una parte, que se utiliza material extraño para el cuerpo y, por consiguiente, se puede inducir una respuesta inmune que puede conducir a enfermedades del complejo inmunológico. Por otra parte, venenos celulares unidos a anticuerpos actúan también citotóxicamente de forma no específica sobre otras células del cuerpo no degeneradas.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que el inhibidor de proteína C (PCI) forma, eventualmente en presencia de sacáridos sulfatados, complejos inactivos con activadores de plasminógeno (PA). En presencia de sacáridos sulfatados, se forman complejos preferentemente con uroquinasa (UK). La velocidad de reacción de activadores de plaminógeno e inhibidor de proteína C se incrementa drásticamente mediante la adición de un sacárido sulfatado, tal como heparina.

Suzuki et al. (J. biol. Chem 1883, 258 (1), 163-8) y Suzuki (Mie Med.J. 1984, 33 (3), 297-321) describen el aislamiento de inhibidor de proteína C y su efecto sobre la coagulación dependiente del factor V.

En virtud de la formación de complejos de inhibidor de proteína C con activadores de plasminógeno y la inhibición de estos activadores, provocada con ello, que juegan un papel durante el crecimiento de tumores y su metástasis, este inhibidor es apropiado para el tratamiento de tumores.

Es característico de muchas enfermedades neoplásticas graves una angiogénesis incontrolada. Entre otros, una angiogénesis de este tipo puede ser inducida por uroquinasa que es liberada por las células. La inhibición de esta uroquinasa por parte del inhibidor de proteína C conduce, por lo tanto, también al cese de enfermedades del tipo no neoplástico.

La angiogénesis persistente representa la forma de patogénesis de muchas enfermedades no neoplásticas. Son ejemplos para las denominadas "enfermedades angiógenas" retinopatía diabética, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, artritis reumatoide, hemangioma, angiofibroma, soriasis y proliferación capilar dentro de las placas ateroescleróticas.

Por tanto, es objeto del invento un inhibidor de proteína C en calidad de agente farmacéutico, preferiblemente para la diagnosis in vivo o el tratamiento de enfermedades angiógenas y en particular de tumores.

Puesto que el inhibidor de proteína C se manifiesta en la sangre humana en una concentración de 2-5 μg/ml, no se han de temer efectos secundarios, tales como los que se pueden esperar cuando se emplean proteínas extrañas, por ejemplo anticuerpos de este tipo. Además, es innecesaria la copulación de un veneno celular, puesto que el inhibidor propiamente dicho tiene un efecto neutralizador del activador de plasminógeno y, por consiguiente, antimetástasis.

Para fines diagnósticos, el inhibidor puede estar provisto de un agente de marcaje, preferiblemente un agente fluorescente, luminiscente o radiactivo o una enzima, de preferencia un isótopo radiactivo o una enzima.

El inhibidor se puede emplear para la diagnosis in vitro al igual que para la diagnosis in vivo.

Es también objeto del invento una composición que contiene inhibidor de proteína C y un soporte.

Materiales de soporte apropiados son los que son apropiados para fines farmacéuticos, es decir, fines terapéuticos o de diagnóstico in vivo o de diagnóstico in vitro.

Una composición de este tipo puede contener inactivador de proteína C, eventualmente marcado, en una concentración de 0,001 a 1000, de preferencia 0,01 a 200, de manera particularmente preferida 0,1 a 10 mg/ml y eventualmente un sacárido sulfatado, por ejemplo heparina, sulfato de heparina, sulfato de pentosano, sulfato de dextrano, sulfato de queratano, sulfato de condroitina o sulfato de dermatano, de preferencia heparina, sulfato de dextrano o de pentosano, en una relación molar de 10:1 a 1:100.000, de preferencia 10:1 a 1:100.000 y eventualmente aditivos estabilizados en una concentración de 0,1 a 2, de preferencia 0,5 a 1 g/100 ml por ejemplo albúmina.

Como marcajes entran en consideración para este fin marcajes conocidos, en particular un marcaje por isótopo radiactivo, por ejemplo con ^{111}In.

Esta también objeto del invento un procedimiento para la preparación de un agente para la diagnosis de enfermedades angiógenas o tumores, caracterizado porque un inhibidor de proteína C

se provee de un agente de marcaje, y el inhibidor marcado se mezcla eventualmente con un sacárido sulfatado y eventualmente con un estabilizador.

Un marcaje radiactivo, por ejemplo con ^{111}In es posible de manera correspondiente al método que está descrito en Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 581-585, 1977.

Es además objeto del invento un agente para el tratamiento de enfermedades angiógenas o tumores que contiene inhibidor de proteína C y eventualmente un sacárido sulfatado en un soporte líquido.

De preferencia, una composición de este tipo contiene inhibidor de proteína C en una concentración de 10^{-4} a 10^{+3}, de preferencia de 0,01 a 200 y de manera particularmente preferida, 0,1 a 10 mg/ml.

Es particularmente apropiado un agente que contiene inhibidor de proteína C y un sacárido sulfatado, por ejemplo heparina, sulfato de heparina, sulfato de pentosano, sulfato de galactosano, sulfato de dextrano, sulfato de queratano, sulfato de controitina o sulfato de dermatano, de preferencia heparina, sulfato de dextrano o sulfato de pentosano, en una relación molar (PCI/sacárido sulfatado) de 10:1 a 1:100.000, de preferencia de 10:1 a 1:10.000, de manera particularmente preferida 1:20.

Es también objeto del invento un procedimiento para la preparación de un agente para el tratamiento de enfermedades angiógenas o tumores, caracterizado porque inhibidor de proteína C, eventualmente un sacárido sulfatado y un soporte y/o un estabilizador y/o una sustancia auxiliar farmacéuticamente inocuos se transforman en un agente apropiado para la terapia.

Un sacárido sulfatado de este tipo es preferiblemente heparina, sulfato de dextrano o sulfato de pentosano, de manera particularmente preferida sulfato de pentosano, que posee un peso molecular medio de 3-15.000, un grado de sulfatación de aproximadamente 20% y que se añade en una relación molar (PCI/sacárido sulfatado) de 10:1 a 1:100.000, de preferencia de 10:1 a 1:10.000, de manera particularmente preferida 1:10 a 1:100.

Eventualmente, el agente se mezcla con estabilizadores, tales como albúmina, se filtra en condiciones esteiles y se liofiliza.

El invento se explicará mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1:

500 μl de una solución de PCI (20 μg/ml) se incuban a temperatura ambiente con 500 μl de una solución de UK en 50 milimoles/1 de tampón tris (10 μg/ml), 0,1 moles/1 de NaCl, pH 8,5, en presencia y ausencia de 5 unidades de heparina/ml. Después de intervalos definidos, se extraen de la tanda de incubación muestras de 100 μl y se separan en una electroforesis sobre un gel de poliacrilamida que contiene dodecilsulfato de sodio ("electroforesis en gel SDS-PAA") (8 g/ 100 ml de poliacrilamida). Después de una subsiguiente mancha de Western (Trends in Biochemical Science, 103-106, 1985), las láminas de celulosa, obtenidas en ese caso, se incuban con anticuerpos frente a UK o PCI, se lavan con tampón y se tiñen. En ambos casos se manifiesta, adicionalmente a la banda de la correspondiente proteína después de 30' sin heparina, después de 2' con heparina una banda con un peso molecular de PM= 110.000, que corresponde al complejo a base de UK y PCI.

Ejemplo 2:

En las muestras citadas en el Ejemplo 1 se determinó la actividad de UK empleada, pipeteando a la pertinente muestra 1000 μl de solución de sustrato S 2444 $^{(R)}$Kabi Vitrum, 0,3 milimoles/1, en 50 milimoles/1 de Tris, NaCl 0,1 M, ph 8,5. La reacción del sustrato se detuvo después de una incubación durante 30 minutos a 37°C por adición de 100 μl, 8,5 moles/1 de ácido acético, y la diferencia de extinción que resulta por la separación del radical cromógeno para-nitroanilina, se mide en un fotómetro. Con ayuda de una de las curvas de referencia, trazada en las citadas condiciones con UK, se determinaron las concentraciones de UK de las muestras. De este modo, se pudo demostrar, en comparación con el valor de partida, mediante un testigo realizado conjuntamente que sólo contenía UK, una inactivación de UK, dependiente de la concentración de PCI. En este caso, se demostró que la inactivación se aceleraba en aproximadamente 20 veces mediante heparina.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar un agente para el tratamiento de enfermedades angiógenas o tumores, **caracterizado** porque un inhibidor de proteína C, eventualmente un sacárido sulfatado y un soporte farmacéuticamente inocuo y/o un estabilizador y/o una sustancia auxiliar se transforma para formar un agente apropiado para la terapia. *(Reserva del art. 167.2 CPE).*

2. Procedimiento para la preparación de un agente, para la diagnosis de enfermedades angiógenas o tumores, **caracterizado** porque un inhibidor de proteína C se provee de un agente de marcaje, y el inhibidor marcado se mezcla eventualmente con un sacárido sulfatado y eventualmente con un estabilizador. *(Reserva del art. 167.2 CPE).*

Las reivindicaciones con la mención del art. 167.2 del Convenio Europeo de Patentes no producirán efectos en España en la medida en que confieran protección a productos químicos o farmacéuticos, conforme a la disposición transitoria del RD 2424/1986, de 10 de Octubre relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea (CPE).