

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 713**

51 Int. Cl.:
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03711550 .8**
- 96 Fecha de presentación: **12.03.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1507547**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2005**

54 Título: **PÉPTIDOS PARA LA REGULACIÓN DE UROQUINASA (uPA) Y ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO DE TIPO TEJIDO (tPA) Y MÉTODO PARA OPTIMIZAR LA EFICACIA TERAPÉUTICA.**

30 Prioridad:
08.05.2002 US 63046
24.06.2002 WO PCT/US02/20077

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.02.2012

73 Titular/es:
THROMBOTECH LTD
P.O. BOX 732
17106 NAZARETH ILLIT, IL

72 Inventor/es:
HIGAZI, Abd-Al-Roof

74 Agente: **de Elizaburu 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).

ES 2 373 713 T3

DESCRIPCIÓN

Péptidos para la regulación de uroquinasa (uPA) y activador de plasminógeno de tipo tejido (tPA) y método para optimizar la eficacia terapéutica

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención describe un péptido que comprende seis aminoácidos (EEIIMD) (SEC ID N°: 1) o una amida de dieciocho amino ácidos (Ac-RMAPEEIIDRPFLYVVR) (SEC ID N°: 2) que tiene la propiedad de unirse al sitio de "acoplamiento" del activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA) y en el activador de plasminógeno de tipo tejido (tPA) fuera del centro activo. La invención también se refiere a la regulación de la actividad cuando se administra tPA o uPA en el tratamiento de la apoplejía isquémica, en particular a la capacidad del tPA o del uPA para inducir una hemorragia intracerebral (ICH), al activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena sencilla (scuPA) para deshacer coágulos sanguíneos que provocan apoplejías o infartos de miocardio.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El activador de plasminógeno de tipo tejido es la única terapia para la apoplejía tromboembólica aguda, que está aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, "Food and Drug Administration"). Sin embargo, hay razones para la preocupación porque el uso de tPA para el tratamiento de la apoplejía isquémica puede exponer a los pacientes a una hemorragia intracerebral secundaria. Wardlaw JC y col., Lancet 1997, 350: 607-614. Esto es debido a que existe aproximadamente un seis por ciento de incidencia de una posterior hemorragia intracerebral sintomática y aproximadamente el cincuenta por ciento de estos pacientes fallecen. La aparición de hemorragia intracerebral después del tratamiento con tPA se atribuye a su capacidad para interferir con la vasoactividad normal de los vasos sanguíneos cerebrales. Se ha demostrado que el tPA tiene efectos vasoconstrictores o vasodilatadores dependientes de la dosis además de promover la activación de plasminógeno.

20 El activador de plasminógeno de tipo tejido es una molécula natural liberada por las células endoteliales vasculares, y se produce una desaparición rápida de tPA de la sangre por eliminación en el hígado. Los hepatocitos expresan la proteína relacionada con receptor de lipoproteína de baja densidad o receptor de macroglobulina d2 que se une a tPA y a complejos de inhibidor de activador de plasminógeno (PAI-1) con tPA y tcuPA. Alternativamente, las células endoteliales expresan un receptor dependiente de manosa de 170 kDa que también está implicado en la desaparición rápida de tPA.

25 La pro-uroquinasa (Pro-UK), también conocida como activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena sencilla (scuPA), es una molécula natural liberada por las células endoteliales vasculares en respuesta a la formación de coágulos sanguíneos y otras afecciones patológicas. El scuPA o Pro-UK puede activarse mediante dos mecanismos diferentes: a) por ruptura de un único enlace de péptido por acción de plasmina que conduce a la generación de la forma activa compuesta por dos cadenas (tcuPA), y b) por unión de scuPA a su receptor, el receptor de activador de plasminógeno de uroquinasa (uPAR).

30 El inhibidor de activador de plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) se une a tcuPA e inhibe su actividad catalítica. Sin embargo, el PAI-1, que se une a tcuPA con una elevada afinidad, se une sólo con baja afinidad a scuPA, si es que se une.

35 El inhibidor de activador de plasminógeno de tipo 1 interactúa tanto con tPA como con uPA e inhibe la actividad catalítica de ambas proteínas. El PAI-1, que se une a tPA y uPA con una elevada afinidad está presente a concentraciones elevadas en la circulación de pacientes que padecen hipertensión. Y la reducción de la tensión sanguínea mediante tratamiento médico da como resultado un descenso de las concentraciones de PAI-1. El mecanismo de acción subyacente para el aumento de PAI-1 en determinadas afecciones patológicas no se comprende bien del todo. Sin embargo, la relación inversa con el tPA y/o el uPA sugiere que el PAI-1 sirve para neutralizar de algún modo el efecto vasoactivo del tPA y/o uPA. Simmons M., Cardiol. Clin. 1995, 13: 339-345; Cipolla M. y col., Stroke, 2000, 31: 940-945; de PAI-1; y Higazi, A.A.-R. y col., J. Biol. Chem., 1995, 270: 9472-9477.

40 Hasta la fecha no se ha evaluado la cuestión de si esto relaciona el aumento del nivel de concentración de PAI-1 en determinadas afecciones patológicas y el tPA producido de forma natural, o de si existe una relación entre el PAI-1 y la hemorragia intracerebral debido al uso de tPA producida comercialmente. La presente invención está dirigida a obtener un mejor entendimiento del control, si lo hay, de PAI-1 o tPA o uPA, y a proporcionar una composición o producto que sea óptimamente efectivo para regular la actividad de tPA o uPA, reduciendo con ello el riesgo de hemorragia intracerebral en pacientes que reciben una terapia tromboembólica tal como tPA y/o uPA.

45 Se han investigado varias estrategias de terapia trombolítica, una de ellas sobre la infusión sistémica de activadores de las variedades naturales y de las recombinantes producidas comercialmente de agentes fibrinolíticos. La uroquinasa es un agente trombolítico activo a través de la conversión de plasminógeno en plasmina. La uroquinasa es una proteína compleja de estructura conocida que se encuentra en la orina en cantidades traza. Se han desarrollado formas recombinantes de uroquinasa y su eficacia clínica está siendo evaluada, por ejemplo la Patente de EE.UU. 4.558.010 expedida para Abbott Laboratories describe un ácido desoxirribonucleico recombinante que

codifica para la proteína de activador de plasminógeno que tiene actividad de uroquinasa humana.

La presente invención demuestra que un péptido de seis aminoácidos EEIIMD o un péptido de dieciocho aminoácidos (Ac-RMAPEEIIIMDRPFLYVVR-amida), puede reducir los efectos secundarios no deseados de los agentes fibrinolíticos, por ejemplo, el riesgo de hemorragia intracerebral en pacientes que reciben tPA, uPA, tPA, estreptoquinasa, rt-PA o alteplasa, derivados de rt-PA o complejo de estreptoquinasa anisoilada. En el protocolo empleado el péptido se introdujo en el régimen trombolítico en las etapas finales para prevenir los efectos vasoactivos o secundarios del agente trombolítico primario.

Hasta la fecha no se ha investigado la cuestión de si el péptido tiene algún efecto cuando se administra en la etapa inicial de la terapia trombolítica. La presente invención describe algunos resultados inesperados obtenidos cuando el péptido se administra en combinación con un activador de plasminógeno justo desde el inicio de la terapia trombolítica. Los resultados son inesperados debido a que demuestran un efecto sinérgico cuando el péptido y el activador de plasminógeno se administran juntos en sistemas in vitro e in vivo. Por tanto, la presente invención proporciona nuevas composiciones de diferentes activadores de plasminógeno y el péptido, y métodos para optimizar la eficacia de los agentes trombolíticos en regímenes terapéuticos de combinación. Dicha estrategia sugiere que la dosis efectiva del agente trombolítico puede reducirse en presencia del péptido. Esto a su vez reduce el riesgo de efectos secundarios de estos agentes, manifestándose los efectos secundarios en la etapa final de la terapia.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención también se refiere a la composición y al uso de un polipéptido como el reivindicado en la Reivindicación 1.

Específicamente, los polipéptidos son útiles para potenciar la actividad del agente trombolítico (que incluye, aunque sin limitación, scuPA, tPA, uPA, tPA, estreptoquinasa, rt-PA o alteplasa, derivados de rt-PA (tales como reteplasa, lanoteplasa y TNK-rt-PA), complejo de estreptoquinasa de plasminógeno anisoilado (APSC) o anistreplasa, o derivado de estreptoquinasa) reduciendo con ello la dosis efectiva de agente trombolítico requerida para la prevención y/o el tratamiento de trastornos tromboembólicos.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Las ventajas y características de la presente invención serán fácilmente percibidas tras leer la siguiente descripción detallada y figuras de referencia, que son:

Figura 1A: es un diagrama que describe los resultados de experimentos sobre el efecto de tPA en la contracción inducida por PE de anillos de aorta de rata aislados. La contracción de anillos aórticos fue inducida aumentando las concentraciones de fenilefrina (PE), en ausencia de tPA (triángulos rellenos) o en presencia de tPA 1nM (cuadrados rellenos) ó 20nM (cuadrados huecos).

Figura 1B: describe los resultados de experimentos en los que se indujo la contracción de anillos aórticos en ausencia de TNK-tPA (triángulos rellenos), en presencia de tPA 1nM (cuadrados rellenos) ó 20nM (cuadrados vacíos).

Figura 2: es una representación gráfica de los resultados obtenidos en experimentos destinados a estudiar el efecto del PAI-1 sobre la vasoactividad de tPA. Se determinó la EC50 de PE en ausencia (Control) o en presencia de tPA 1nM, tPA 20 nM, tPA 1nM y una concentración equimolar de PAI-1, tPA 20 nM y una concentración equimolar de PAI-1, tPA 1nM y 2µM de EEIIMD o tPA 20nM y 2µM de EEIIMD.

Figura 3: es una representación gráfica de los resultados obtenidos en experimentos dirigidos a estudiar el efecto de RAP y anticuerpos anti-LRP sobre la vasoactividad de tPA. Se determinó la EC50 de PE en ausencia (Control) o en presencia de tPA 1nM, tPA 20 nM, tPA 1nM y una concentración equimolar de PAI-1, tPA 20 nM y una concentración equimolar de PAI-1, tPA 1nM y 2µM de EEIIMD o tPA 20nM y 2µM de EEIIMD.

Figura 4: es un gráfico que describe el efecto de tPA sobre la contracción inducida por fenilefrina de anillos de aorta de rata aislados in vitro. La contracción de los anillos aórticos fue inducida con concentraciones variables de fenilefrina en ausencia de tPA (triángulos rellenos), en presencia de tPA 1nM (cuadrados rellenos) o en presencia de tPA 10nM (cuadrados vacíos). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos descritos previamente por Haj-Yehia y col., FASEB J., 2000, 14: 1411-1422.

Figura 5: es un diagrama de barras que describe los resultados de experimentos sobre la vasoactividad de uPA y tPA en presencia o en ausencia de PAI-1, por ejemplo, se determinó el efecto de uP 2nM o de tPA 1nM sobre la vasoconstricción inducida mediante fenilefrina en presencia o en ausencia de concentraciones equimolares de PAI-1.

Figura 6: es un diagrama de barras que describe los resultados de estudios realizados sobre el efecto de péptido derivado de PAI-1 en la vasoactividad de tPA. La constricción de anillos aórticos fue inducida mediante

concentraciones crecientes de fenilefrina en ausencia o en presencia de tPA 1nM, tPA 1nM y EEIIMD 10M, tPA 10nM o tPA 10nM y EEIIMD 10M.

Figura 7: es un diagrama de barras que describe los resultados de experimentos sobre el efecto de péptido derivado de PAI-1 en la lisis de coágulos mediada por tPA. Se determinó la capacidad del tPA para inducir lisis de coágulos en presencia y en ausencia de EEIIMD 10M. En estos experimentos se dejó coagular sangre de voluntarios a temperatura ambiente durante una hora, se separó el coágulo sanguíneo del plasma, se colocó en un papel absorbente para eliminar todo el suero y se cortó en varios trozos. Los trozos se pesaron y se pusieron en tampón PBS solo o que contenía tPA 100 nM, con o sin EEIIMD 10M. Tras incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, se separaron los trombos del medio, se secaron y se pesaron.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas de los péptidos EEIIMD (Glu-Glu-Ile-Ile-Met-Asp) y/o Ac-RMAPEEIIIMDRPFLYVVR-amida (Ac-Arg-Met-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Ile-Met-Asp-Arg-Pro-Phe-Leu-Tyr-Val-Val-Arg-Amida), presentando dichas composiciones efectos inhibidores sobre trastornos hemorrágicos relacionados con tPA y/o uPA que son el resultado de efectos secundarios graves de dichos agentes fibrinolíticos. Asimismo, en la presente invención se contemplan métodos para reducir la ocurrencia de hemorragia intracerebral en pacientes que reciben tPA o uPA en el tratamiento de trastornos tromboembólicos.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas y kits que comprenden el polipéptido EEIIMD y/o Ac-RMAPEEITMDRPFLYVVR-amida, en combinación con uno o más agentes fibrinolíticos que incluyen tPA, uPA, tPA, estreptoquinasa, rt-PA o alteplasa, derivados de rt-PA (tal como reteplasa, lanoteplasa y TNK-rt-PA), complejo de estreptoquinasa de plasminógeno anisólido (APSC) o anistreplasa, o derivados de estreptoquinasa.

La presente invención también proporciona métodos para mejorar la eficacia de agentes fibrinolíticos, reduciendo con ello la dosis efectiva, combinando el agente fibrinolítico con el péptido, en una relación de 0,1/1,0 a 1,0/0,1 respectivamente.

La presente invención proporciona además métodos para prevenir y/o tratar efectos secundarios tales como la hemorragia intracerebral y anomalías vasculares relacionadas asociadas a agentes fibrinolíticos tales como tPA o uPA, proporcionando regímenes terapéuticos –solo o en combinación, en combinación con una cantidad efectiva de EEIIMD y/o Ac-RMAPEEIIIMDRPFLYVVR-amida, para prevenir y/o inhibir efectos secundarios.

La TPA es una proteasa de serina de cadena sencilla compuesta por 530 aminoácidos, aunque originalmente se identificaron 527. La enzima t-PA está compuesta por varios dominios con homologías respecto a otras proteínas:

Un dominio de dedo que comprende los residuos 4-50,

Un dominio de factor de crecimiento que comprende los residuos 50-87,

dos dominios Kringle que comprenden los residuos 87-176 y 176-262, y el dominio de proteasa constituido por los residuos 276-527 que comprenden la triada catalítica. La unión de tPA a fibrina está muy probablemente mediada por los dominios de dedo y el segundo Kringle. La unión inicial de t-PA a fibrina está gobernada por el dominio de dedo y el Kringle 2, que se une a residuos de lisina carboxil-terminales expuestos.

La TPA tiene una afinidad débil por plasminógeno en ausencia de fibrina ($K_m = 76 \mu M$) pero una afinidad mucho mayor en presencia de fibrina (K entre 0,15 y 1,5 μM). En esta reacción el plasminógeno se une a fibrina principalmente a través de estructuras específicas denominadas "sitio de unión de lisina". Por tanto, un modo de regular la fibrinólisis es a nivel de activación de plasminógeno localizada en la superficie de la fibrina.

Los inhibidores de activador de plasminógeno, específicamente PAI-1 y PAI-2 inhiben los activadores de plasminógeno fisiológico, por ejemplo, el PAI-1 es el inhibidor primario de t-PA y u-PA en plasma. El PAI-1, un inhibidor de serina proteasa, es una glicoproteína de cadena sencilla derivada de células endoteliales y otros tipos de células. El PAI-1 inhibe tPA mediante la formación de un complejo entre el sitio activo de tPA y los residuos "cebo" (Arg 346-Met 347) del PAI-1.

La concentración de PAI-1 en plasma aumenta en varias enfermedades, que incluyen tromboembolismo, obesidad, sepsis y enfermedad de arteria coronaria. Una elevada actividad de PAI-1 constituye un factor de riesgo independiente para el infarto de miocardio en sujetos jóvenes en los primeros tres (3) años después del primer ataque. Existe una clara correlación entre la variación circadiana en el momento de inicio del infarto de miocardio, siendo la mayor incidencia a aproximadamente las 8 am, y el ritmo circadiano de la actividad de PAI-1 en plasma que es también mayor por la mañana.

El inhibidor de activador de plasminógeno de tipo 1 interacciona tanto con tPA como con uPA e inhibe la actividad catalítica de ambas proteínas. El PAI-1, que se une a tPA y uPA con una elevada afinidad (Heckman C.M., *Archives of Biochem. Biophysics*, 1988, 262: 199-210), también está presente en concentraciones elevadas en circulación en

pacientes que padecen hipertensión. La reducción de la tensión sanguínea mediante tratamiento médico da como resultado el descenso de la concentración de PAI-1. Erden Y.C. y col., Am. J. Hypertens., 1999, 12: 1071-1076. El mecanismo de acción subyacente para explicar el aumento de PAI-1 en algunas afecciones patológicas es desconocido.

5 El PAI-1 reacciona con tPA de cadena sencilla, tPA de cadena doble y tscuPA. La constante cinética de segundo orden para su inhibición de tPA de cadena sencilla por PAI-1 es de aproximadamente 107 M⁻¹s, mientras que la inhibición de tPA de doble cadena y de tscuPA es algo más rápida. Las regiones cargadas positivamente en el tPA (residuos 296-304) y 9 residuos de uPA (179-184) están implicados en esta rápida reacción. La actividad de PAI desaparece muy rápidamente de la circulación por acción del hígado. Excepto las plaquetas, que contienen PAI-1 tanto funcional como inactivo, el PAI-1 no se almacena dentro de las células, pero es secretado rápida y constitutivamente después de la síntesis.

10 El PAI-1 se une a tPA y uPA a través de dos epítomos independientes, uno de los cuales interacciona con el sitio activo. El otro epítomo está compuesto por 6 residuos de aminoácido, EEIIMD, que corresponde a los residuos de aminoácido 350 a 355 del PAI-1. Este segundo epítomo de PAI-1 interacciona con un sitio de "acoplamiento" en uPA y tPA que está fuera del centro activo. Adams D.S. y col., J. Biol. Chem., 1999, 266: 8476-8482.

scuPA

La presente invención describe el efecto del péptido de 6 aminoácidos sobre la actividad fibrinolítica de scuPA e indica que el péptido estimula sinérgicamente la actividad de scuPA sobre la lisis de coágulos sanguíneos. Estas observaciones se describen en detalle en la sección de Ejemplos.

20 El péptido de la presente invención, aunque previene y/o inhibe los efectos adversos de scuPA sobre los vasos sanguíneos, no tiene efecto sobre la actividad fibrinolítica de scuPA. Por lo tanto, el péptido es útil en la lisis de coágulos durante la terapia trombolítica en el infarto de miocardio, la apoplejía y complicaciones relacionadas.

25 El tPA disponible comercialmente se produce mediante tecnología de ADN recombinante (tal como t-PA y rt-PA recombinantes) de dos formas: una preparación de cadena sencilla (alteplasa) y una preparación de cadena doble (duteplasa). Otros tipos de tPA incluyen reteplasa (r-PA) y un mutante de rt-PA, TNK-rt-PA. Ver más adelante los detalles en la sección titulada "TNA=t-PA y rtPA".

30 El régimen de dosis preferido de alteplasa selectiva de fibrina consta de un régimen acelerado (cargado en el frente) ajustado al peso durante 90 minutos (bolo de 15 mg, 0,75 mg/kg a lo largo de 30 minutos (sin exceder de 50 mg) y 0.05 mg/kg a lo largo de 60 minutos (sin exceder de 35 mg)). La presente invención proporciona una composición de alteplasa y el péptido, de tal modo que el nivel de actividad fibrinolítica alcanzado en el anterior régimen de dosis se obtiene en realidad con una dosis de alteplasa mucho menor. Esto es debido a que la combinación de alteplasa y el péptido da como resultado una mejor actividad de lisis.

35 La anterior mejora también se observa cuando el régimen de dosis preferido de alteplasa selectiva de fibrina consiste en un régimen acelerado (cargado en el frente) ajustado al peso durante 90 minutos (bolo de 15 mg, 0,75 mg/kg a lo largo de 30 minutos (sin exceder de 50 mg) y 0,05 mg/kg a lo largo de 60 minutos (sin exceder de 35 mg)).

40 El régimen de dosis preferido para el péptido consiste en una cantidad efectiva para potenciar óptimamente la actividad de la actividad fibrinolítica a la vez que también se previene los efectos vasoactivos dañinos de un agente fibrinolítico en una base caso a caso. El péptido puede ser un componente de una secuencia de número variable de aminoácidos, o el péptido puede tener una modificación de uno o más aminoácidos en su secuencia. La relación de péptido/tPA, UPA o TNK-tPA puede estar en el intervalo de 0,1/1,0 a 1,0/0,1.

45 El péptido de la presente invención es útil en el tratamiento de sepsis, cuando se administra solo en una dosis efectiva o en combinación con una terapia anticoagulante tradicional. En condiciones fisiológicas, varios mecanismos antitrombóticos actúan simultáneamente para prevenir la coagulación, y para preservar la fluidez de la sangre. Cualquier trombina que escape del control de este sistema anticoagulante fisiológico está disponible para convertir fibrinógeno en fibrina. Esto a su vez activa el sistema fibrinolítico.

tPA

50 La presente invención describe el efecto del péptido sobre la vasoactividad de tPA y uPA e indica que el péptido elimina el efecto potenciador del tPA sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en cultivos de anillo de aorta. De forma similar, el péptido de la presente invención suprime el efecto potenciador del uPA sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina. Estas observaciones se describen en detalle en la sección de Ejemplos.

55 Los péptidos EEIIMD y/o Ac-RMAPEEIIMDRPFLYVVR-amida de la presente invención, aunque previenen y/o inhiben los efectos adversos del tPA o del uPA sobre los vasos sanguíneos, no tienen efecto sobre la actividad fibrinolítica de tPa o uPa, tan útil en la lisis de coágulos durante la terapia trombolítica en el infarto de miocardio, la apoplejía y complicaciones relacionadas.

El tPA disponible comercialmente se produce mediante tecnología de ADN recombinante (tal como t-PA o rt-PA recombinante) de dos formas: una preparación de cadena sencilla (alteplasa) y una preparación de cadena doble (duteplasa). Otros tipos de tPA incluyen reteplasa (r-PAO) y un mutante de rt-PA, el TNK-rt-PA.

- 5 El régimen de dosis preferido de alteplasa selectiva de fibrina consta de un régimen acelerado (cargado en el frente) ajustado al peso durante 90 minutos (bolo de 15 mg, 0,75 mg/kg a lo largo de 30 minutos (sin exceder de 50 mg) y 0,05 mg/kg a lo largo de 60 minutos (sin exceder de 35 mg)).

El régimen de dosis preferido para el péptido consiste en una cantidad efectiva para prevenir los efectos vasoactivos dañinos del tPA en una base de caso a caso. El péptido puede ser un componente de una secuencia de número variable de aminoácidos, o el péptido puede tener una modificación de uno o más aminoácidos en su secuencia.

- 10 El péptido de la presente invención es útil en el tratamiento de la sepsis, cuando se administra solo en una dosis efectiva o en combinación con una terapia anticoagulante tradicional. En condiciones fisiológicas, varios mecanismos antitrombóticos actúan juntos para prevenir la coagulación, y para preservar la fluidez sanguínea. Cualquier trombina que escape del control de dicho sistema anticoagulante fisiológico es capaz de convertir fibrinógeno en fibrina. Esto a su vez activa el sistema fibrinolítico.

15 TNK-tPA y rtPA

20 El t-PA consta de cinco dominios: un dominio de tipo dedo de fibronectina, un dominio de factor de crecimiento epidermal (EGF), dos dominios de Kringle (K1 y K2), y un dominio de proteasa. El TNK-t-PA difiere del rt-PA en los dominios K1 y de proteasa. En el K1 el sitio de glicosilación del aminoácido 117 (N117) ha sido desplazado al aminoácido 103, mientras que en el dominio de proteasa existe una tetrasustitución de alanina (K296A/H297A/R298A/R299A) en el sitio de acoplamiento del inhibidor de activador de plasminógeno-1 (PAI-1), lo que le hace resistente a la desactivación por PAI-1.

25 El activador de plasminógeno de tejido TNK (TNK-tPA) es una variante diseñada mediante ingeniería biológica del activador de plasminógeno de tipo tejido (t-PA), que tiene una mayor vida media que el tPA. Es resistente a la desactivación por inhibidor de activador de plasminógeno-1 al presentar una tetrasustitución de alanina en el dominio de proteasa (K296A/H297A/R298A/R299A).

El TNK-tPA exhibe una resistencia 80 veces superior a la del inhibidor de activador de plasminógeno-1 (PAI-1) que el tPA y una especificidad de fibrina relativa 14 veces superior.

In vitro, el TNK-tPA es 8 y 13 veces más potente que el tPA frente a sangre entera y coágulos enriquecidos en plaquetas, respectivamente.

- 30 In vivo, el tiempo requerido por el TNK-tPA para una lisis del 50% en modelos de shunt venoso arterial de fibrinolisis en conejos, fue solo un tercio del requerido por rtPA. A pesar de estas enormes ventajas del TNK-tPA sobre el tPA en situaciones experimentales, el TNK-tPA no presenta una ventaja significativa sobre el tPA en estudios clínicos.

35 En ensayos clínicos comparativos, se ha descubierto que el TNK-tPA tiene una eficacia equivalente al rtPA y con una velocidad de hemorragia intracraneal similar a obtenida con rtPA. La única ventaja significativa del TNK-tPA sobre el rtPA es el hecho de que el TNK-tPA está asociado a menos episodios de hemorragia no cerebral (4,66% frente a 5,94%).

40 La presente invención investiga la base de la discrepancia entre los efectos in vitro del TNK-tPA y los efectos in vivo en humanos. Específicamente, se examinaron los efectos de TNK-tPA, rtPA y/o tPA sobre la contracción inducida por PE de anillos aislados. Los resultados obtenidos se describen en detalle más adelante en la sección de EJEMPLOS. En resumen, los resultados obtenidos indican que 15 rtPA tiene dos epítomos de unión que están implicados en la vasoactividad. El primer epítomo tiene una mayor afinidad (alrededor de 1nM) e inhibe la vasoconstricción inducida por PE. El segundo epítomo tiene una menor afinidad (alrededor de 20 nM) y estimula la vasoconstricción inducida por PE. La presente invención también sugiere que el primer epítomo, que induce pro-dilatación, ha sido desactivado en el TNK-tPA.

45 Los resultados obtenidos en la presente invención indican que el efecto vasoactivo del TNK-tPA no se ve afectado por una concentración equimolar de péptido PAI-1. Sin embargo, a una concentración 5 molar del péptido, el efecto vasoactivo del TNK-tPA se suprime. Por tanto, los resultados descritos en los EJEMPLOS sugieren que el hexapéptido EEIIMD derivado de PAI-1 es útil para inhibir los efectos vasoactivos del tPA, rtPA y/o TNK-tPA. Se obtuvieron resultados similares con Ac-RMAPEEIIIMDRPFLYVVR-amida (resultados no presentados).

50 tPA y LRP

Se sabe que el tPA se une a aDKLRP: un receptor de señalización y un cosechador multifuncional (Strickland J.H., J. Clin. Invest. 2001; 108: 779-784) (LRP). Dicha unión está regulada por PAI-1. Los resultados obtenidos en la presente invención demuestran que el LRP también está implicado en la vasoactividad del tPA (véanse más adelante los detalles en la sección de EJEMPLOS).

Específicamente, los anticuerpos anti-LRP y el antagonista de LRP, la proteína asociada a receptor recombinante, el rRAP, eliminan el efecto vasoactivo del tPA y el TNK-tPA. Los resultados descritos en la presente invención sugieren que los anticuerpos anti-LRP y/o rRAP prolongan la vida media de tPA en circulación. Estos resultados también sugieren que los anticuerpos anti-LRP y/o RAP pueden usarse para prolongar la vida media de scuPA o complejo scuPA/suPAR (descrito en las solicitudes de patente de EE.UU. pendientes con números de serie 09/325.917, presentada el 4 de junio de 1999; la 09/968.752, presentada el 2 de octubre de 2001; la 09/302.392, del 10 de julio de 2001; y la 09/902.135, presentada el 10 de julio de 2001).

EJEMPLO 1

Se comparó el efecto de TNK-tPA sobre la contracción inducida por PE con el efecto de tPA, en los anillos aórticos aislados. El procedimiento experimental seguido se ha descrito previamente (Haj-Yehia A., Nassar T., Sachais B., Kuo A., Bdeir K., Al-Mehdi A.-B., Mazar A., Cines D., Higazi A.A.-R. Urokinase-derived peptides regulate vascular smooth muscle contraction in vitro and in vivo. *FASEB J.* 2000; 14: 1411-1422.

La Figura 1A muestra que tPA 1nM inhibió la vasoconstricción inducida por PE. La Figura 1B muestra que a la misma concentración (1nM) el TNK-tPA ejerció un efecto opuesto al del tPA sobre la contracción de anillos aórticos. TNK-tPA 1nM estimuló la vasoconstricción inducida por PE.

Puesto que la concentración de tPA usada en los experimentos previos se encontraba en el rango fisiológico, pero muy por debajo del rango terapéutico, se examinaron los efectos de concentraciones más elevadas de variantes de tPA sobre la vasoactividad. La Figura 1A muestra que el aumento de la concentración de tPA produjo un efecto similar al inducido por TNK-tPA 1nM. tPA 20nM estimuló la constricción inducida por PE y la EC50 disminuyó de 34 a 1,6nM.

La Figura 1B muestra que aumentar la concentración de TNK-tPA desde 1 a 20nM aumentó su efecto estimulador sobre la vasoconstricción inducida por PE, disminuyendo su EC50 desde 34 a 0,63 nM.

EJEMPLO 2

En un intento por entender el fundamento de la modificación de la vasoactividad del TNK-tPA, se examinó el papel del sitio de acoplamiento de PAI-1 en el proceso. La Figura 2 muestra que la pro-vasodilatación de tPA, así como los efectos pro-vasoconstrictivos, se ven inhibidos por concentraciones equimolares de PAI-1.

El PAI-1 interacciona con tPA a través de centros independientes; el centro catalítico y un sitio de acoplamiento, presentes en los aminoácidos 296 a 299. El sitio de acoplamiento de PAI-1 está mutado en el TNK-tPA. Para examinar con más detalle el papel del sitio de acoplamiento de PAI-1 en la vasoactividad de TNK-tPA específicamente y de tPA en general, examinamos el efecto del hexapéptido derivado de PAI-1 EEIIMD, que corresponde a los residuos de aminoácido 350 a 355 del PAI-1 (el epítipo de PAI-1 que interacciona con el sitio de acoplamiento de tPA). Madison E.L., Goldsmith E.J., Gerard R.D., Gething M.J.H., Sambrook J.F., Bassel-Duby R.S. Amino acid residues that affect interaction of tissue plasminogen activator with plasminogen activator inhibitor 1. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.* 1990; 87: 3530-3534. Madison E.L., Goldsmith E.J., Gething M.-J., H., Sambrook J.F., Gerard R.D. Restoration of serine protease-inhibitor interaction by protein engineering. *Journal of Biological Chemistry.* 1990; 265: 21423-21426.

La Figura 2 muestra que una concentración de 2 µM, el péptido derivado de PAI-1 suprimió los efectos vasoactivos del tPA. De forma interesante, el efecto vasoactivo de TNK-tPA no se vio afectado por una concentración 2 µM de péptido de PAI-1. Sin embargo, a 10 µM, el péptido eliminó el efecto de TNK-tPA.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un medio para inhibir la vasoactividad tanto de tPA como de TNK-tPA combinándolos con una cantidad efectiva del péptido de PAI-1. Se obtuvieron resultados similares con Ac-RMAPEEIIIMDRPFLYVVR-amida (resultados no presentados).

EJEMPLO 3

El efecto de revertasa y TNK-tPA sobre la vasoconstricción inducida por PE se estudió en presencia o en ausencia del antagonista de LRP (RAP) o de anticuerpos anti-LRP. Los resultados obtenidos mostrados en la Figura 3 indican que el efecto vasoactivo del tPA y/o el TNK-tPA es suprimido totalmente por los anticuerpos anti-LRP, así como por el antagonista de LRP rRAP.

EJEMPLO 4

Efecto de tPA sobre la contracción inducida por fenilefrina

La figura 4 describe un gráfico que describe el efecto de tPA sobre la contracción inducida por fenilefrina de anillos de aorta de rata aislados in vitro. La contracción de los anillos aórticos fue inducida mediante concentraciones variables de fenilefrina en ausencia de tPA (triángulos rellenos), en presencia de tPA 1nM (cuadrados rellenos) o en presencia de tPA 10 nM (cuadrados huecos). Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a procedimientos

descritos previamente por Haj-Yehia A. y col., FASEB J., 2000, 14: 1411-1422.

Los resultados obtenidos confirman que el tPA tiene la capacidad de inducir vasodilatación.

5 La Figura 4 muestra que la presencia de tPA 1nM inhibe la vasoconstricción inducida por fenilefrina. El aumento de la concentración de tPA indujo el efecto opuesto, es decir, la presencia de tPA 1nM estimuló la vasoconstricción inducida por fenilefrina. De forma similar, el uPA tiene la capacidad de inducir vasodilatación (Haj-Yehia A. y col., FASEB J., 2000, 14: 1411-1422).

EJEMPLO 5

Efecto de PAI-1 sobre la vasoactividad de uPA y tPA

10 La Figura 5 describe un diagrama de barras que describe los resultados de experimentos sobre la vasoactividad de uPA y tPA en presencia o ausencia de PAI-1, por ejemplo, se determinó el efecto de uPA 2nM o de tPA 1nM sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina en presencia o en ausencia de concentraciones equimolares de PAI-1.

EJEMPLO 6

15 La Figura 6 es un diagrama de barras que describe los resultados de estudios realizados sobre el efecto de péptido derivado de PAI-1 sobre la vasoactividad de tPA. La constricción de anillos aórticos fue inducida mediante concentraciones crecientes de fenilefrina en ausencia o en presencia de tPA 1nM, tPA 1nM y 1 OM, tPA 10 nM ó tPA 10 nM y 1 OM.

20 Los resultados obtenidos muestran que 1 OM de eliminación del efecto potenciador del tPA sobre la vasoconstricción inducida por fenilefrina ejerció el mismo efecto sobre uPA. Ni el PAI-1 ni solo tuvieron ningún efecto sobre la contracción de anillos aórticos (Figura 3). Por tanto, el mecanismo mediante el cual el PAI-1 afecta al efecto vasoactivo de tPA o uPA es a través de su interacción con el sitio de acoplamiento.

EJEMPLO 7

Efecto del péptido derivado de PAI-1 EEIIMD sobre la lisis de coágulo mediada por tPA

25 La Figura 7 es un diagrama de barras que describe los resultados de experimentos dirigidos a determinar el efecto del péptido derivado de PAI-1 sobre la lisis de coágulo mediada por tPA. Se determinó la capacidad del tPA para inducir la lisis de coágulos en presencia y en ausencia de 1 OM. En estos experimentos, se dejó coagular sangre procedente de voluntarios a temperatura ambiente durante una hora, se separó el coágulo sanguíneo del plasma, se colocó sobre papel absorbente para eliminar todo el suero y se cortó en varios trozos. Los trozos fueron pesados y colocados en tampón PBS solo o que contenía tPA 100 nM, con o sin 1 OM. Tras incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, los trombos fueron separados del medio, secados y pesados.

30 Se usaron dos métodos para determinar si el péptido afectaba la actividad fibrinolítica de tPA inhibiendo la actividad de plasminógeno. 1) El ensayo cromogénico descrito en detalle anteriormente (Higazi A.A.-R. y col., J. Biol. Chem., 1995, 270: 9472-9477); y 2) el ensayo de lisis de coágulo descrito anteriormente (Higazi A.A.-R. y col., Blood, 1988, 92: 2075-2083).

Los resultados obtenidos muestra que no tenía un efecto significativo sobre la actividad catalítica del tPA. Figura 7.

35 Por lo tanto, estos datos indican que el péptido EEIIMD derivado de PAI-1 (y/o Ac-KMAPEEIIIMDRPFLYVVR-amida, resultados no mostrados) y sus derivados pueden neutralizar la vasoactividad de tPA o uPA, reduciendo con ello sus efectos adversos sobre los vasos sanguíneos y previniendo las complicaciones que aparecen durante la terapia trombolítica como en el caso de infarto de miocardio, apoplejía y enfermedades similares.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un polipéptido Ac-RMAPEEIIMDRFLYVVR-amida que tiene un efecto inhibidor sobre la vasoactividad inducida por activadores de plasminógeno, en donde el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos: Ac-Arg-Met-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Ile-Met-Asp-Arg-Pro-Phe-Leu-Tyr-Val-Val-Arg-Amida.
- 2.- Una composición que comprende una cantidad efectiva del polipéptido Ac-RMAPEEIIMDRPFLYVVR-amida para prevenir hemorragias.
- 10 3.- La composición de acuerdo con la reivindicación 2, que además comprende un agente fibrinolítico seleccionado del grupo que consiste en scuPA, tPA, uPA, tcuPA, estreptoquinasa, rt-PA, alteplasa, derivados de rt-PA, reteplasa, lanoteplasa, TNK-rt-PA, complejo de estreptoquinasa de plasminógeno anisoilado, anistreplasa o un derivado de estreptoquinasa.
- 4.- Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido Ac-RMAPEEIIMDRPFLYVVR-amida.

FIG. 1A

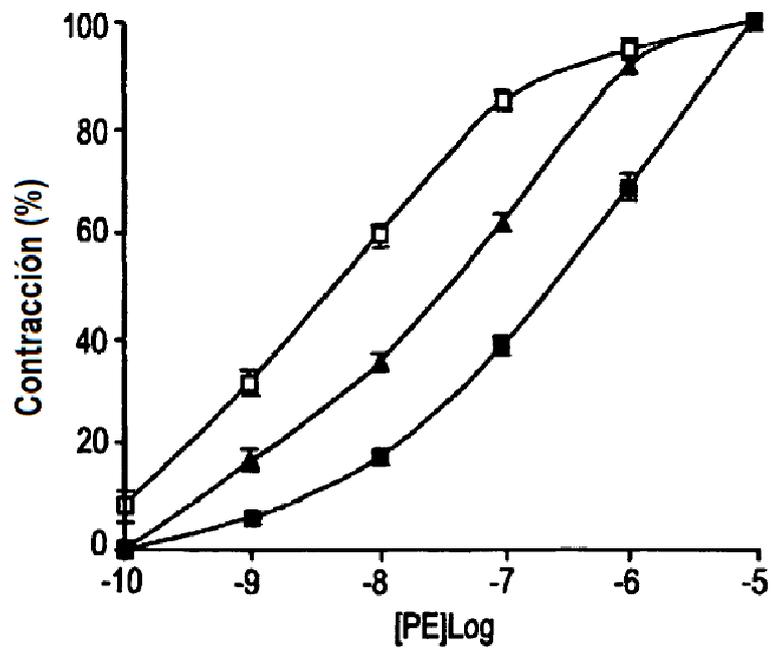


FIG. 1B

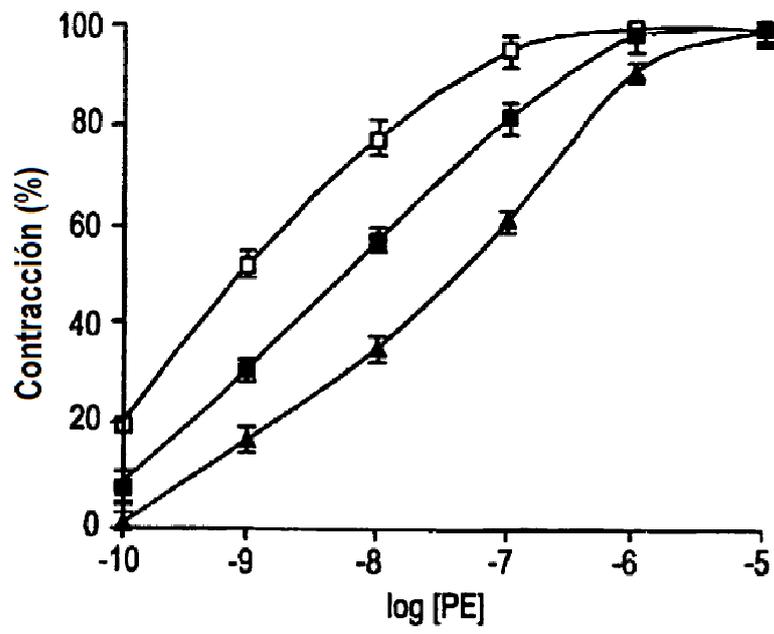


FIG. 2

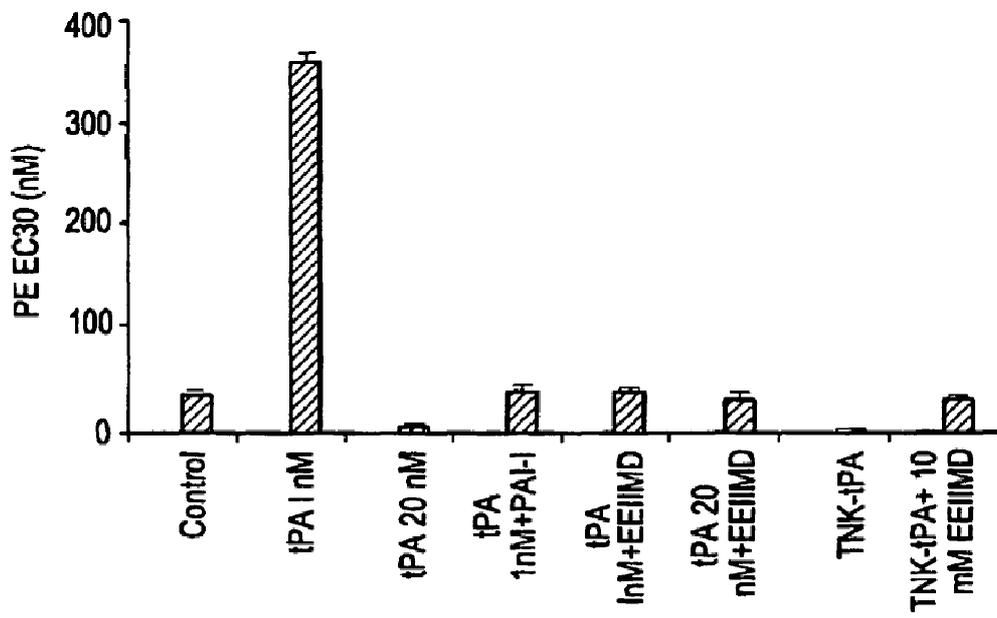


FIG. 3

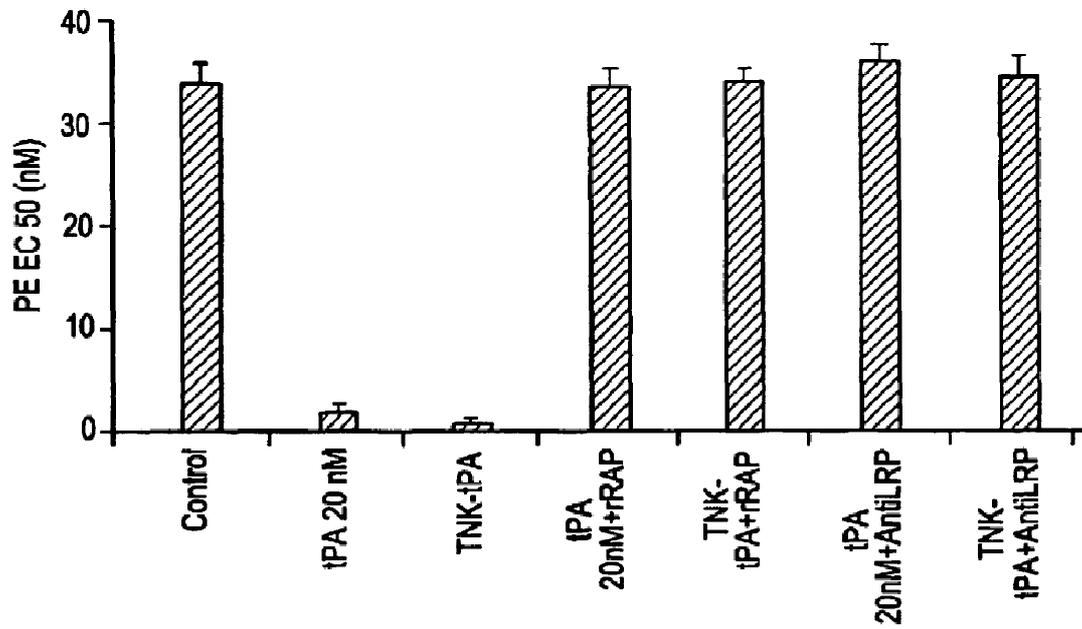


FIG. 4

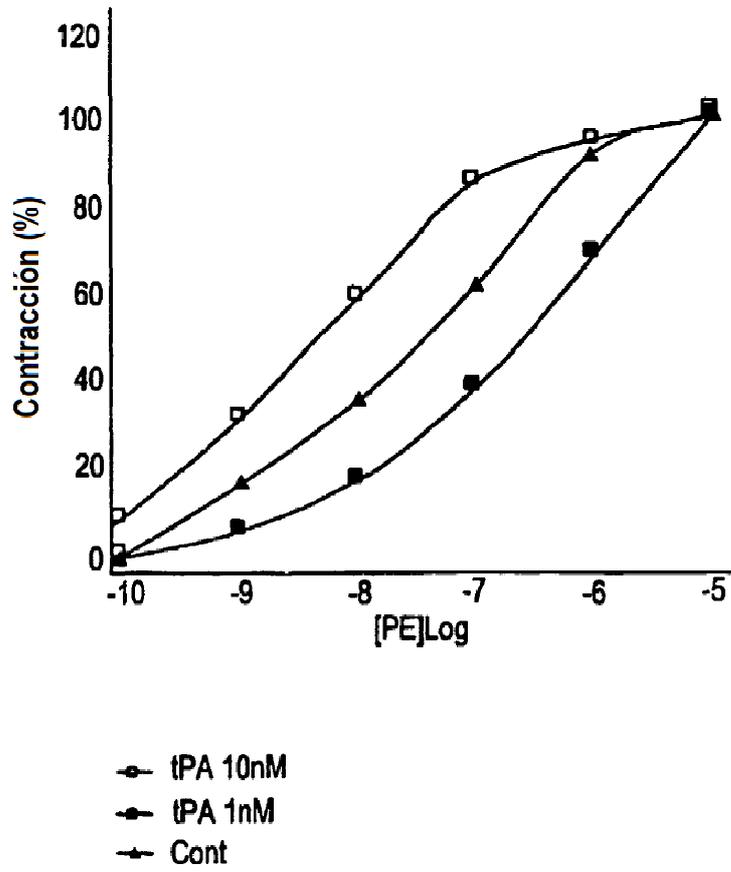


FIG. 5

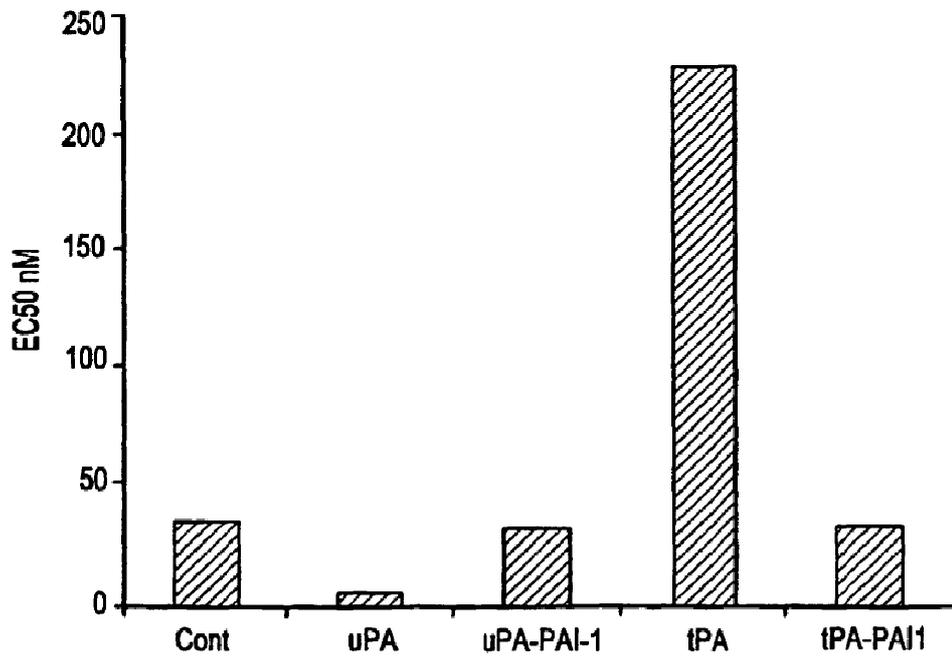


FIG. 6

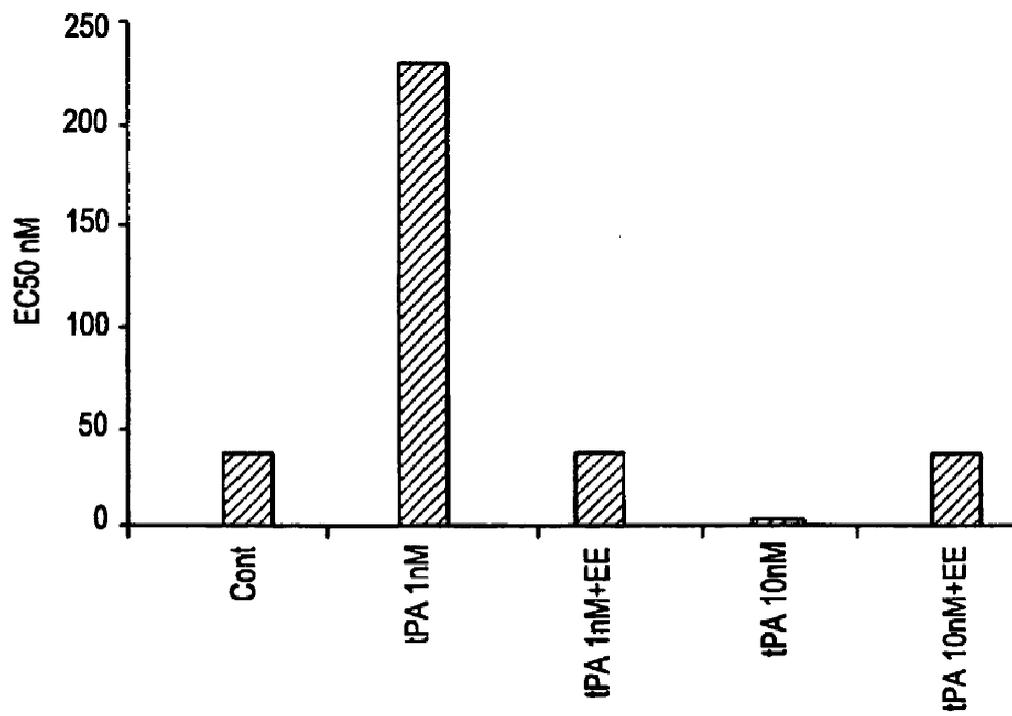


FIG. 7

