

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 099**

51 Int. Cl.:

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 19/04 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02729651 .6**

96 Fecha de presentación: **11.06.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1404412**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **Proteína C para cicatrización de heridas**

30 Prioridad:
13.06.2001 AU PR015637
02.04.2002 AU PR021433

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2012

73 Titular/es:
THE UNIVERSITY OF SYDNEY
SYDNEY, NEW SOUTH WALES 2006, AU

72 Inventor/es:
JACKSON, Christopher John y
SAMBROOK, Philip Neil

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 384 099 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína C para cicatrización de heridas

5 Campo del invento

El presente invento se refiere al campo de la medicina y, más particularmente, a la cicatrización de heridas y al empleo de composiciones para promover la cicatrización de heridas. En una aplicación particular del presente invento la proteína C activada (PCA) se administra a una herida de lenta cicatrización mediante aplicación tópica.

10

Antecedentes del invento

Las heridas son daños en el cuerpo internos o externos o lesiones causadas por medios físicos, tales como mecánicos, químicos, virales, bacteriales, o medios térmicos, que interrumpen la normal continuidad de las estructuras. Estos daños corporales incluyen contusiones, heridas en donde la piel no se ha roto, incisiones, heridas en donde la piel se rompe mediante un instrumento cortante, laceraciones, y heridas en donde la piel se rompe mediante un instrumento romo o despuntado. Las heridas pueden ser causadas por accidentes o procedimientos quirúrgicos.

15

20

La cicatrización de heridas es un proceso complejo que implica una serie de etapas. Estas incluyen; 1) coagulación, que empieza inmediatamente después del daño; 2) inflamación, que empieza unos pocos minutos después; 3) un proceso migratorio y proliferativo (etapa de granulación), que empieza dentro de horas a días; y 4) un proceso de remodelación con desarrollo subsiguiente de piel de plena resistencia (1-3).

25

Coagulación e inflamación

La coagulación controla la hemostasis e inicia la cicatrización liberando una variedad de factores de crecimiento y citoquinas de plaquetas desgranuladas. Durante la fase de inflamación la agregación de plaquetaria y coagulación forma una matriz que atrapa proteínas de plasma y células sanguíneas para inducir el influjo de varios tipos de células. Los neutrófilos son las primeras células que llegan y funcionan para fagocitar bacterias contaminantes, digerir el coágulo de fibrina y liberar mediadores para atraer macrófagos y activar fibroblastos y queratinocitos (3). Los macrófagos digieren patógenos, desbridan la herida y secretan citoquinas/factores de crecimiento (o sea interleuquina-1 (IL-1), factor de crecimiento epidérmico (FCE), factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV), transformando el factor β de crecimiento (TGF- β), y el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFCF) que estimula los fibroblastos y células endoteliales. Sobre todo la etapa inflamatoria es importante protegerla contra la infección y promover las etapas migratorias y proliferativas de la cicatrización de herida.

30

35

Granulación y remodelación de la matriz extracelular

Estas etapas incluyen migración celular y proliferación. Si bien los linfocitos y macrófagos están implicados, los tipos de células predominantes son epiteliales, fibroblastos y endoteliales. Dentro de horas de una lesión una cubierta epidermal, constituida principalmente por queratinocitos, empieza a migrar y cubrir la epidermis, un proceso conocido como repitelización. Cuando estos cubren por completo la herida se diferencian y estratifican para formar una nueva epidermis con una lámina basal. La angiogénesis (o sea la formación de nuevos vasos de sangre) se produce durante esta etapa y proporciona nutrientes para que el tejido que se desarrolla sobreviva. Los fibroblastos migran al sitio herido y producen colágeno y proteoglicanos que finalmente proporcionan la resistencia a la tracción de la herida. A medida que la fase de remodelación progresa el tejido de granulación es sustituido por una red de colágeno y fibras de elastina que conduce a la formación de tejido cicatricial.

40

45

50

Cicatrización de herida fallida

Se produce cicatrización de heridas dérmicas deterioradas y/o úlceras dérmicas en pacientes con enfermedad oclusiva arterial periférica, trombosis venosa profunda, diabetes, llagas por presión y quemaduras (4). A pesar de intensa investigación los mecanismos moleculares asociados con la cicatrización de heridas deterioradas se entienden pobremente.

55

La cicatrización de heridas está afectada por numerosos factores, incluyendo factores locales (por ejemplo factores de crecimiento, edema, isquemia, infección, insuficiencia arterial, insuficiencia venosa o neuropatía), factores sistémicos (por ejemplo perfusión inadecuada y enfermedad metabólica) y otros factores diversos, tales como estado nutricional, exposición a terapia de radiación y fumar.

60

Los leucocitos, particularmente los neutrófilos y los macrófagos persisten en el tejido circundante y segregan una gama de proteasas, incluyendo metaloproteinasas de matriz (MMPs) y serina proteasas (5). La acumulación excesiva de estas enzimas interfiere con la remodelación de la matriz (6). Otra característica de algunas heridas crónicas es la reducción o ausencia de angiogénesis, lo que impide que nutrientes accedan al tejido nuevamente formado (8).

65

Tecnologías existentes para mejorar la cicatrización de heridas

5 Heridas crónicas se conducen inicialmente mediante tratamiento que comprende desbridamiento de escara, tratamiento antibiótico en donde es apropiado y apósito regular (2). Pueden utilizarse también otros apósitos, tales como hidrogeles, hidrocoloides o alginatos. La ulceración venosa se trata mediante terapia de compresión, mientras que úlceras arteriales o diabéticas requieren cambios regulares de apósitos.

10 Las llagas por presión son alentadas a la curación mediante la eliminación de presión en el sitio dañado. Se utiliza también para promover la cicatrización de heridas algunos otros dispositivos físicos tales como tratamiento por láser, oxígeno hiperbárico y estimulación eléctrica para úlceras de arterias (2,9,10).

15 Para heridas que no responden a estas intervenciones es una opción el uso de piel de tejido de ingeniería, tal como Dermagraft o Apilgraf. Esta terapia actúa para impedir la infección bacteriana y permite que la herida empiece a cicatrizar con procesos reparativos normales (11,12). El empleo de estos sustitutos de la piel para acelerar la cicatrización de heridas depende de la disponibilidad de un suministro vascular existente en la herida existente.

20 Otro método para cicatrizar heridas implica la administración de factores de crecimiento/citoquinas, que han demostrado acelerar la proliferación celular in Vitro y/o promover la cicatrización de heridas en algunos modelos animales. Estos incluyen IL-1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), EGF, VEGF, TGF- β Y bFGF (2). Procuren (Curative Technologies), un producto liberado de plaquetas autólogo, contiene por lo menos cinco factores de crecimiento que ayudan a la formación de tejido de granulación y re-epitelialización. Esta mezcla de factor de crecimiento autólogo ha obtenido algunos éxitos en sujetos humanos con lesiones en las extremidades ulceradas (13). Sin embargo, en conjunto, los resultados de la mayor parte de pruebas clínicas utilizando factores de crecimiento/citoquinas han sido decepcionantes. Por ejemplo, EGF falló en cicatrizar úlceras por estasis venosas e IL-1 falló en tratar llagas por presión de modo efectivo (2). Resultados similares se reportaron utilizando bFGF (14). El motivo de la carencia de eficacia no está determinado, pero puede relacionarse con los efectos multifactoriales, algunos indeseables para la cicatrización, de factores de crecimiento/citoquinas.

30 Así pues, existe una necesidad en curso para identificar y desarrollar nuevos agentes para la promoción de cicatrización de heridas.

35 La proteína C activada (PCA) es una serina proteasa que tiene un peso molecular de alrededor de 56 kD que desempeña un papel central de anticoagulación fisiológica. El precursor inactivo, proteína C, es una glicoproteína dependiente de vitamina K sintetizada por el hígado y endotelio y se encuentra en el plasma. La activación de la proteína C tiene lugar en la superficie celular endotelial y se dispara por un complejo formado entre trombina y trombomodulina (15,16). Otras proteínas de membrana específica endotelial, receptoras de proteína C endotelial (EPCR), ha demostrado acelerar esta reacción en más de 1000 veces (17). Las funciones de la PCA endotelial como un anticoagulante mediante la unión al cofactor, proteína S, en la superficie endotelial, que inactiva los factores de coagulación Factor VIII y Factor Va. La importancia de la PCA como anticoagulante se refleja por los hallazgos de que deficiencias en esta molécula resultan en trastornos familiares de trombosis (18).

45 Recientemente se ha expuesto también que la PCA actúa adicionalmente como un agente antiinflamatorio y activa directamente la proteasa, gelatinasa A (17, 20). La gelatinasa A se secreta por muchos tipos de células diferentes, incluyendo las células del músculo liso, fibroblastos y células endoteliales. Con la degradación de los colágenos presentes en la membrana de basamento (21) y permitiendo que las células invadan el estroma, la gelatinasa A juega un papel importante en la remodelación fisiológica y angiogénesis (22). La gelatinasa A juega también un papel importante en numerosas enfermedades, tales como promover la invasión de tumores epiteliales tímicos (23), promover la destrucción de la articulación en artritis mediante la adhesión al colágeno de la matriz de cartílago (24) y contribuyendo a la disfunción mecánica cardíaca durante la repercusión después de isquemia (25). En adición a su capacidad de degradar la matriz, la gelatinasa A puede también ser objetivo de otros sustratos. Por ejemplo, esta disocia la gran endotelina-1 para dar un potente vasoconstrictor, implicando la gelatinasa A como un regulador de reactividad vascular (26). La gelatinasa A liberada puede mediar también la agregación de plaquetas (27).

55 La WO9530429 A describe métodos para reducir fibrina intraocular mediante la administración de Proteína C a un individuo que tenga elevados niveles de fibrina intraocular, lo que resulta en el tratamiento de enfermedad intraocular.

60 La US-A-5571786 describe el uso de Proteína C o un péptido de activación de Proteína C en el tratamiento de condiciones de dolor causadas por procesos inflamatorios agudos o crónicos.

65 La WO9920293 A describe un método para el tratamiento de paciente humano con un estado hipercoagulable adquirido o deficiencia de Proteína C asociado con enfermedad particular, cuyo método comprende la administración de Proteína C activada que tiene un agente terapéutico altamente selectivo con un bajo potencial para causar complicaciones de sangrado.

La WO0172328 A describe un método para tratar una enfermedad con Proteína C activada o un compuesto que tiene actividad de Proteína C activada mediante regulación directa de la expresión de genes asociado con la enfermedad.

5 Además, y como se demuestra en los ejemplos proporcionados a continuación, la PCA es también apta para promover la regeneración de células endoteliales después de heridas in vitro, estimula la re-epitelización, invasión de fibroblasto y angiogénesis en un embrión de pollo y favorece la cicatrización de heridas en un modelo con heridas de rata. Estas funciones cuando se toman conjuntamente con las funciones anticoagulantes, anti-inflamatorias y activantes de gelatinasa A, indica severamente que la PCA, sus fragmentos funcionales, y el precursor de la PCA (o sea la proteína C) es/son útil/les para el tratamiento de heridas y, particularmente heridas de lenta cicatrización.

Resumen del invento:

15 Así pues, en un primer aspecto, el presente invento proporciona el uso de una composición que comprende uno o mas de:

- (i) una proteína C activada (PCA),
- (ii) un fragmento funcional de una PCA, y
- (iii) proteína C,

20 como un agente activo en la preparación de un medicamento tópico para promover la cicatrización de heridas en un paciente, en donde dicha herida se elige del grupo constituido por úlceras dérmicas, quemaduras, heridas orales, daño en hueso y cartílago y necrosis de la piel relacionada con sustancias químicas.

25 En un segundo aspecto el presente invento proporciona el uso de una composición que comprende uno o mas de:

- (i) una proteína C activada (PCA),
- (ii) un fragmento funcional de una PCA, y
- (iii) proteína C,

30 como un agente activo en la preparación de un medicamento tópico para promover la cicatrización de heridas en un paciente, en donde dicha herida es una herida ocular, y en donde dicho medicamento promueve la re-epitelialización del ojo.

35 En un tercer aspecto el presente invento proporciona un gel, esponja, gasa o malla que incorpora una cantidad de un agente que comprende uno o mas de:

- (i) una proteína C activada (PCA),
- (ii) un fragmento funcional de una PCA, y
- (iii) proteína C,

40 para uso en promover la cicatrización de heridas mediante la aplicación de dicho gel, esponja, gasa o malla a la herida de modo que dicho agente se administre tópicamente a dicha herida.

45 En un cuarto aspecto el presente invento proporciona el uso de un agente que comprende uno o mas de:

- (i) una proteína C activada (PCA),
- (ii) un fragmento funcional de una PCA, y
- (iii) proteína C,

50 en la preparación de un gel, esponja, gasa o malla para promover la cicatrización de heridas, siendo apropiado dicho gel, esponja, gasa o malla para aplicación a una herida de modo que dicho agente se administre tópicamente a dicha herida.

55 Descripción detallada del invento

La PCA y/o proteína C utilizado en el presente invento puede obtenerse mediante purificación de una fuente apropiada (por ejemplo sangre tomada de humanos u otros animales) o producido mediante técnicas de ADN recombinante corrientes tal como se describe en, por ejemplo, Maniais, T, et al., Molecular Cloning: un manual de laboratorio, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press. La PCA recombinante o proteína C puede incorporar modificaciones (por ejemplo adiciones de secuencias de aminoácido heterólogas), que pueden realzar la actividad biológica o expresión de la proteína respectiva. Sin embargo, de preferencia, el presente invento utiliza PAC humana y/o proteína C. La PCA y/o proteína C puede también glicosilarse con métodos bien conocidos en el arte y que pueden comprender medios enzimáticos y no enzimáticos.

65

Fragmentos funcionales apropiados de un PAC pueden producirse disociando PAC natural purificada o PAC recombinante con proteasas bien conocidas tal como tripsina y similares, o mas preferentemente, mediante técnicas de ADN recombinantes o síntesis de péptido/polipéptido. Estos fragmentos funcionales pueden identificarse mediante generación de fragmentos candidatos y determinando la actividad biológica mediante, por ejemplo, ensayo de activación de MMP-2, promoción o reparación de una monocapa endotelial herida y/o angiogénesis en membrana corioalantoica de embrión de pollo (MAP) en forma similar a la descrita en los ejemplos aquí proporcionados. De preferencia, los fragmentos funcionales serán de 5 a 100 aminoácidos de longitud, mas preferentemente, de 10 a 30 aminoácidos en longitud. Los fragmentos funcionales pueden ser lineales o circularizados y pueden incluir modificaciones de la secuencia de aminoácido de la secuencia de PCA nativa de donde se deriva (por ejemplo sustituciones de aminoácido, supresiones y adiciones de secuencias de aminoácido heterólogas). Los fragmentos funcionales pueden también glicosilarse con métodos bien conocidos en el arte y que pueden comprender medios enzimáticos y no enzimáticos.

El presente invento es apropiado para promover de forma general la cicatrización de heridas, pero es particularmente apropiado para aplicación a la promoción de heridas de lenta cicatrización, conocidas de otro modo como "heridas crónicas", "heridas de cicatrización deteriorada" o "úlceras", y puede ser de cualquiera de los tipos de herida descritos antes. Sin embargo, de preferencia, el presente invento se aplica a heridas seleccionadas del grupo constituido por:

(i) úlceras dérmicas tales como las asociadas con presión, vasculitis, enfermedades arteriales o venosas (por ejemplo en pacientes que sufran de diabetes, en pacientes de edad, asociado con insuficiencia venosa e incidencias cerebrovasculares, y resultantes de llagas por presión o áreas localizadas de daño tisular resultante de presión directa sobre la piel o de fuerzas cizallantes y de fricción),

(ii) quemaduras,

(iii) heridas orales (por ejemplo causadas por gingivitis),

(iv) heridas oculares (por ejemplo heridas corneales, resultantes de lesión, cirugía o terapia de láser),

(v) heridas no cutáneas (por ejemplo úlceras estomago/esofágicas, úlceras vaginales y lesión o cirugía interna (incluyendo cirugía plástica),

(vi) lesión de isquemia-reperfusión (por ejemplo resultante de infarto de miocardio),

(vii) daño de hueso y cartilago como sucede en trastornos musculoesqueléticos tal como artritis reumatoide y osteoartritis, y

(viii) necrosis de piel relacionada con sustancias químicas.

El agente puede ser uno o una mezcla de cualquiera o todo el grupo constituido por una PCA, un fragmento funcional de una PCA y una proteína C.

El agente se administra de preferencia a un sujeto después de un período de tiempo suficiente desde que ha transcurrido la herida de modo que hayan concluido sustancialmente las etapas de coagulación/inflamación del proceso de cicatrización de herida. En la práctica es preferible que la administración del agente tenga lugar dentro de 1 a 48 horas después de la herida, mas preferentemente dentro de 1 a 10 horas después de la herida.

El agente se administra a un sujeto mediante administración tópica a la herida como una formulación de medicamento, o como incorporada en un sistema de suministro (por ejemplo gelatina, esponja tal como Gelfoam, gasa fina, malla de nylon, o unas tiras plásticas adhesivas tal como una Band-aid[®]) que se aplica a la herida.

La cantidad efectiva del agente puede esperarse que varíe dependiendo del tipo, sitio y gravedad de la herida que ha de tratarse. Sería procedente, dentro de la experiencia de las personas expertas en el arte, ajustar la cantidad apropiadamente para obtener los resultados óptimos. Sin embargo, se espera que generalmente la cantidad del agente se encuentre en el rango de 0,01 a 10000 µg por kg de peso corporal, mas preferentemente entre 0,1 y 1000 µg por kg de peso corporal y, mas preferentemente, entre alrededor de 1 y 200 µg por kg de peso corporal.

Los medicamentos para uso de conformidad con el presente invento incluyen, de preferencia, una cantidad del agente en el rango de 0,01 a 1000 µg por g de medicamento, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo gelatina y/o colágeno para crema o medicamentos de gel; solución salina isotónica, una solución tamponada de fosfato o similar para gotas; o materiales tales como almidón, gelatina, agar, azúcar, carboximetilcelulosa, alcohol polivinílico, estearato de magnesio y alginato sódico para polvos secos).

Los medicamentos y sistemas de suministro (o sea geles, esponjas, gasas y mallas) de conformidad con el presente invento pueden contener uno o mas de otros compuestos o sustancias activos tales como otras moléculas

implicadas en la trayectoria de la proteína C (por ejemplo proteína S, EPCR, factor V/Va o factor VIII/VIIIa); agentes antimicrobianos tales como clorhexidina, povidina-yodina y ciprofloxacina; anticoagulantes tales como heparina o antitrombina III; esteroides tales como dexametasona; inhibidores de inflamación; fármacos cardiovasculares tales como bloqueadores del canal de calcio; citoquinas/factores de crecimiento tales como factor de crecimiento epidermal; anestésicos locales tales como bupivacaina; fármacos antitumorales tales como taxol; anticuerpos policlonales, monoclonales o quiméricos, o derivados funcionales o sus fragmentos tales como anticuerpos para regular la proliferación celular.

Además, en donde los medicamentos y sistemas de suministro de conformidad con el presente invento utilizan proteína C, los medicamentos y sistemas de suministro pueden incluir también una cantidad apropiada de un agente para activar la proteína C (por ejemplo trombina, kallikreina y/o trombosmodulina).

A través de esta descripción la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecido o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

La descripción del invento se describirá a continuación por medio de los ejemplos no limitativos que siguen y figuras que se acompañan.

Breve descripción de las figuras que se acompañan

La figura 1 muestra el efecto de PCA sobre la restauración de una monocapa celular (FSE) endotelial de prepucio "herida" en cultivo. Las monocapas celulares se rasparon con una punta de pipeta, se lavaron y cubrieron con medio conteniendo varias cantidades de PCA, AFM o sin tratamiento. Las células se incubaron a 37 grados C durante 24 horas antes de medirse respecto del cierre de herida como se describe e el ejemplo. Los resultados mostrados representan el número de células que migran en la herida (DS) por unidad de área seleccionada de heridas duplicadas. Se obtuvieron resultados similares en dos experimentos separados.

La figura 2 muestra el efecto de PCA sobre membrana corioalatoidea de embrión de pollo (MAP). Los embriones de pollo se cascaron en un bote de peso esteril el día 1. El día 4 se trataron esponjas de gelatina con PCA movido en zigzag en solución salina tamponada de fosfato (STF) o solo STF y luego se dispuso en la parte superior del MAP. El día 9 los embriones se fijaron en fluido de Bouln, se seccionaron en perpendicular a la superficie superior del MAP, se mancharon con tinte de Mason y se observaron bajo microscopio de luz. Las MAP tratadas con PCA mostraron completa re-epitelización sobre esponja (con flechas finas) (A) y muchos vasos sanguíneos nuevos (flechas gruesas) e infiltración de fibroblastos (flechas de empolladura) (B). En las esponjas tratadas con STF no existe recrecimiento epitelial (flechas gruesas) e invasión inapreciable de células en la esponja (C, D).

La figura 3 muestra el efecto de PCA sobre un modelo de cicatrización de herida en rata. Se efectuaron heridas en ratas Sprague-Dawley y luego se trataron con A) solución salina o B) 20 µg de PCA y se fotografió después de 4 días. C) Resumen de resultados utilizando 2 ratas (8 heridas en total) cada una tratada con solución salina o 20 µg de PCA. Los resultados mostrados son la media +/- DS del área herida (mm²) después de 40 horas, 4 días y 7 días.

La figura 4 muestra el efecto de diferentes dosis de PCA sobre un modelo de cicatrización de heridas en rata. Se efectuaron heridas en ratas normales utilizando una biopsia con sacabocados de 8 mm y se trataron inmediatamente con 0 µg (control, 3 ratas, 12 heridas), 10 µg (3 ratas, 12 heridas), 40 µg (4 ratas, 16 heridas), 70 µg (3 ratas, 12 heridas) o 100 µg (3 ratas, 12 heridas) de PCA. Se midió el tamaño de las heridas mediante análisis de imagen después de 1, 3, 5, 7 y 9 días y los resultados mostrados son la media +/- DS del área herida (mm²) después de 1,2,3, 4, 5, 7 y 9 días.

La figura 5 muestra el efecto de PCA sobre un modelo de cicatrización de herida en rata. Se efectuaron heridas en ratas normales utilizando una biopsia con sacabocados de 8 mm y no se trataron (control 2 ratas, 7 heridas) o se trataron dos veces con PCA (40 µg de PCA inmediatamente después de efectuar las heridas seguido de un segundo tratamiento de 40 g de PCA después de 1 día) (3 ratas, 11 heridas). Se midió el tamaño de la herida mediante análisis de imagen y los resultados mostrados son la media +/- D.S. de área sin herida (mm²) después de 1,2,3,4,5,6,7 y 9 días.

La figura 6 muestra el efecto de PCA sobre un modelo de cicatrización de heridas de rata diabética. Se efectuaron heridas en ratas diabéticas inducidas por streptozotocina utilizando una biopsia con sacabocados de 8 mm y se trataron inmediatamente con 20 µg de PCA (2 ratas, 7 heridas) o sin agente de prueba (control; 1 rata, 4 heridas). El cierre de las heridas se determinó visualmente y después de 1,2,3,4,5,7 y 9 días. Existió una diferencia significativa en el ratio de cicatrización de heridas (gradiente de las líneas de regresión) entre las ratas de control y tratadas con PCA, siendo las últimas de cicatrización mas rápida (p<0,01).

Ejemplo 1: promoción de PCA de subsanar de heridas endoteliales

Se probó la proteína C activada (PCA) respecto de su capacidad para promover la subsanación de heridas endoteliales utilizando una modificación de un *in vitro* assay, como se ha descrito previamente (19). En breve, se cultivaron células endoteliales microvasculares confluentes (FSE) de prepucios neonatales durante 5 días en placas de cultivo de 24 pocillos en medio de crecimiento (Biorich plus 50µg/ml de heparina, 50 µg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial y 5% de suero humano). Las monocapas endoteliales fueron heridas con una carrera simple a través del diámetro del pocillo con una punta de pipeta. El medio y las células desalojados se aspiraron luego y se lavaron las placas con tampón Hanks. Se adicionó a las placas medio de crecimiento recién preparado junto con PCA a varias concentraciones o el potente factor angiogénico promotor tumoral, acetato de forbol miristato (AFM) (10 ng/ml) y las células se incubaron a 37°C. Después de 24 horas se visualizó microscópicamente el ancho de la herida y se cuantificaron los resultados utilizando análisis de imagen y se generó una curva de dosis-respuesta (figura 1). Las células cultivadas en la presencia de 75nM de PCA obtuvieron casi el cierre completo de la herida dentro de 24 horas, y mostraron mas del doble de la respuesta migratoria que las células sin PCA. A 100 nM no existió aumento adicional. La (PCA) (75 nm) tuvo aproximadamente la misma actividad que AFM.

Ejemplo 2: promoción de PCA de angiogénesis

En vista de la capacidad de PCA para activar gelatinasa A y promover heridas endoteliales se investigó la PCA para considerar si podría promover angiogenesis. Se adicionó a la membrana corioalatoidea de embrión de pollo (MAP) utilizando esponjas de gelatina (Gelfoam). Se cortaron las esponjas a aproximadamente 2 mm x 2 mm. Se adicionaron cinco µg de PCA en solución salina tamponada de fosfato (STF) o STF solo a esponjas de gelatina que se dispusieron subsiguientemente sobre la MAP de 9 días, como se ha descrito previamente (34). Se inspeccionaron las MAP cada día y el día 14 se fotografiaron y fijaron para seccionamiento histológico. Microscópicamente, el día 14, las esponjas de gelatina tratadas con PCA estuvieron circundadas por vasos sanguíneos que crecieron radialmente hacia dentro hacia la esponja en un patrón de "radios de rueda" (datos no mostrados). Por el contrario, las esponjas de gelatina tratadas con STF no tuvieron formación vascular. Secciones histológicas mostraron que las esponjas tratadas con PCA se infiltraron con muchos nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) (figura 2). En adición existió una gran migración de fibroblastos en las esponjas tratadas con PCA. Existió asimismo marcada proliferación de la capa epitelial, con el ectodermo creciendo completamente sobre la esponja de gelatina. Asociado con esta re-epitelialización se produjo estratificación e involución en la periferia de la esponja. El endodermo también demostró estratificación con formación de vello en algunas secciones y la presencia de células cubiertas por el vello (no mostrado). Por el contrario en las esponjas tratadas con PCA existió poca evidencia de cualquier re-epitelialización, células endoteliales o infiltración de fibroblasto en las esponjas de control de STF.

Ejemplo 3: Promoción de PCA de cicatrización de heridas

En vista de la capacidad para estimular la migración endotelial y mejorar la reepitelialización, invasión de fibroblastos y angiogénesis de la PCA, se examinó la PCA respecto de una capacidad para mejorar la cicatrización de heridas en un modelo de rata. Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley y se extirparon cuatro heridas en todo el espesor, utilizando una biopsia con sacabocados de 8 mm, en el dorso de la rata, exponiendo la fascia muscular esquelética dorsolateral subyacente. Se obtuvo hemostasis mediante compresión uniforme con gasa estéril. Se diluyó PCA en solución salina exenta de pirógenos, isotónica, estéril y cada excisión se trató con una aplicación tópica de 50 µl de solución salina exenta de pirógenos estéril o solución salina conteniendo 20 µg de PCA. Las heridas se dejaron abiertas sin acicalamiento y se enjaularon las ratas una por jaula. El cierre de las heridas se determinó visualmente y después de 40 horas, 4 días y 7 días. En cada punto de tiempo las heridas se fotografiaron digitalmente utilizando una Nikon Coolpix 950, con una escala de calibración de distancia en el marco. El área de la herida se calculó mediante análisis de imagen (Scion Image). Después de 40 horas se produjo una marcada mejora visual en el cierre de las heridas en las heridas tratadas con PCA comparado con los controles. El día 4 los resultados de análisis de las imágenes revelaron una reducción significativa en el tamaño de las heridas de las heridas tratadas con PCA comparado con los controles (figura 3). Esta diferencia se mantuvo el día 7 (figura 3c, **p<0,01, * **p<0,001).

Ejemplo 4: Promoción de PCA de cicatrización de heridas

Se examinó adicionalmente el PCA respecto a capacidad de mejorar la cicatrización de heridas en un modelo de rata. Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley y se extirparon cuatro heridas en todo el espesor, utilizando una biopsia con sacabocados de 8 mm, en el dorso de la rata, exponiendo la fascia muscular esquelética dorsolateral subyacente. Se obtuvo hemostasis mediante compresión uniforme con gasa estéril. Se diluyó PCA en solución salina exenta de pirógenos, isotónica, estéril y cada excisión se trató inmediatamente con una aplicación tópica de 50 µl de solución salina exenta de pirógenos estéril o solución salina conteniendo lo siguiente: 0 µg de PCA (Control, 3 ratas, 12 heridas), 10 µg de PCA (3 ratas, 12 heridas), 40 µg de PCA (4 ratas, 16 heridas, 70 µg de PCA (3 ratas, 12 heridas) o 100 µg de PCA (3 ratas, 12 heridas). Las heridas se dejaron abiertas sin acicalamiento y se enjaularon las ratas una por jaula. El tamaño de la herida se midió mediante análisis de imagen después de 1, 3, 5, 7 y 9 días. En cada punto de tiempo las heridas se fotografiaron digitalmente utilizando una Nikon Coolpix 995. El área de la

herida se calculó mediante análisis de imagen (Scion Image). Los resultados se muestran en la figura 4. Después de 1 día se produjo una reducción significativa en el tamaño de las heridas tratadas con 10 o 40 µg de PCA. No existió diferencia entre los controles y ratas tratadas con 70 o 100 µg de PCA. La reducción significativa en el tamaño fue mas notable con 40µg de PCA y apreciado en los días 1, 3, 7 y 9. (**p<0,01, * p<0,05, prueba t de Student, utilizando CoStat).

Ejemplo 5: Promoción de PCA de cicatrización de heridas

Se examinó adicionalmente la PCA respecto de capacidad para mejorar la sanación en un modelo de rata. Se produjeron heridas en ratas Sprague-Dawley como se describe en el ejemplo 4. Se diluyó PCA en solución salina libre de pirógenos, isotónica, estéril y se trató cada excisión con una aplicación tópica de 50 µl de solución salina libre de pirógenos, estéril o solución salina conteniendo 40 µg de PCA. Después de 48 horas se trataron las heridas con una segunda aplicación d 40 µg de PCA. Las heridas se dejaron abiertas sin acicalamiento y se enjaularon las ratas una por jaula. El cierre de las heridas se determinó visualmente y después de 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9 días. En cada punto de tiempo las heridas se fotografiaron digitalmente utilizando una Nikon Coolpix 995. El área de la herida se calculó mediante análisis de imagen (Scion Image). Los resultados se muestran en la figura 5. Existió una diferencia significativa en el tamaño de las heridas después de 1 día, cicatrizando con mayor rapidez las ratas tratadas con PCA que los controles (p<0,01). Esta diferencia se observó también los días 2, 3 y 7 (**p<0,01, * p<0,05, prueba t de Student, utilizando CoStat).

Ejemplo 6: Promoción de PCA de cicatrización de heridas en ratas diabéticas

Se examinó la capacidad de PCA para mejorar la cicatrización de heridas en un modelo de rata diabética. El modelo diabético se seleccionó debido a que es un modelo bien descrito para cicatrización de heridas lenta (35). Se indujo diabetes en ratas Sprague-Dawley utilizando el procedimiento Standard de una inyección IP de estreptozotocina. Después de 1 semana los niveles de glucosa en sangre fueron >20 mM, indicativo de diabetes. Las ratas diabéticas se hirieron utilizando una biopsia con sacabocados de 8 mm, como se ha descrito antes en el ejemplo 4, y se trataron inmediatamente con 20 µg de PCA (2 ratas, 7 heridas) o sin agente de prueba (control, 1 rata, 4 heridas). Las heridas se dejaron abiertas sin acicalamiento y se enjaularon las ratas una por jaula. El cierre de las heridas se determinó visualmente y después de 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9 días. En cada punto de tiempo las heridas se fotografiaron digitalmente utilizando una Nikon Coolpix 995. El área de la herida se calculó mediante análisis de imagen (Scion Image). Los resultados se muestran en la figura 6. Existió una diferencia significativa en la evaluación de la cicatrización de heridas (gradiente de las líneas de regresión) entre las ratas de control y las tratadas con PCA, siendo mas rápida la cicatrización en las últimas (p<0,01).

Conclusión:

La capacidad de la PCA para reparar heridas endoteliales, promover la re-epitelialización, infiltración de fibroblastos y angiogénesis, así como acelerar la cicatrización de heridas en la rata, indica que esta será un agente de cicatrización de heridas efectivo.

Referencias:

1. Bello, Y.M. and T.J. Phillips. 2000. Recent advances in wound healing. JAMA 283:716-718.
2. Braddock, M., C.J. Campbell, and D. Zuder. 1999. Current therapies for wound healing: electrical stimulation, biological therapeutics, and the potential for gene therapy. Int J Dermatol 38:808-817.
3. Hunt, T.K., H. Hopf, and Z. Hussain. 2000. Physiology of wound healing. Adv Skin Wound Care 13:6-11.
4. Bello, Y.M. and T.J. Phillips. 2000. Therapeutic dressings. Adv Dermatol 16:253-271.
5. Yager, D.R. and B.C. Nwomeh. 1999. The proteolytic environment of chronic wounds. Wound Repair Regen 7:433-441.
6. Trengove, N.J., M.C. Stacey, S. MacAuley, N. Bennett, J. Gibson, F. Burslem, G. Murphy, and G. Schultz. 1999. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. Wound Repair Regen 7:442-452.
7. Kahari, V.M. and U. Saarialhokere. 1997. Matriz metaloproteínases in skin. Experimental Dermatology 6:199-213.
8. Singer, A.J. and R.A. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. N Engl J Med 341: 738-746.

9. McDaniel, D.H., K. Ash, J. Lord, J. Newman, and M. Zukowski. 1998. Accelerated laser resurfacing wound healing using a triad of topical antioxidants. *Dermatol Surg* 24:661-664.
- 5 10. Stone, A. 1998. Hyperbaric oxygen treatment for wounds. *Plast Reconstr Surg* 101:1738-1739.
11. Brem, H., J. Balledux, T. Bloom, M.D. Kerstein, and L. Hollier. 2000. Healing of diabetic foot ulcers and pressure ulcers with human skin equivalent: a new paradigm in wound healing. *Arch Surg* 135:627-634.
- 10 12. Falanga, V. and M. Sabolinski. 1999. A bilayered living skin construct (APLIGRAF) accelerates complete closure of hard-to-heal venous ulcers. *Wound Repair Regen* 7:201-207.
13. Gillam, A.J. and C.C. Da Camara. 1993. Treatment of wounds with procuren. *Ann Pharmacother* 27:1201-1203.
14. Mazue, G., F. Bertolero, C. Jacob, P. Sarmientos, and R. Roncucci. 1991. Preclinical and clinical studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 638:329-340.
- 15 15. Esmon, C.T., W. Ding, K. Yasuhiro, J.M. Gu, G. Ferrell, L.M. Regan, D.J. Stearns-Kurosawa, S. Kurosawa, T. Mather, Z. Laszik, and N.L. Esmon. 1997. The protein C pathway: new insights. *Thromb Haem* 78:70-74.
16. Boffa, M.C. and M. Karmochkine. 1998. Thrombomodulin:an overview and potential implications in vascular disorders. *Lupus* 7:Suppl, 2-5.
- 20 17. Esmon, C.T., J.M. Gu, J. Xu, D. Qu, D.J. Stearns-Kurosawa, and S. Kurosawa. 1999. Regulation and functions of the protein C anticoagulant pathway. *Haematologica* 84:363-368.
- 25 18. Baker, W.F. and B. and. 1999. Treatment of hereditary and acquired thrombophilic disorders. *Semin. Thromb.Hemostasis*. 25:387-405.
19. Morales, D.E., K.A. Mcgowan, D.S. Grant, S. Maheshwari, D. Bhartiya, M.C. Cid, H.K. Kleinman, and H.W. Schnaper.1995. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 91: 755-763.
- 30 20. Nguyen, M., J. Arkell, and C.J. Jackson. 2000. Activated protein C directly activates human endothelial gelatinase A. *J Biol Chem* 275:9095-9098.
- 35 21. Murphy, G. 1995. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthop Scand Suppl* 266:55-60.
22. Fang, J., Y. Shing, D. Wiederschain, L. Yan, C. Butterfield, G. Jackson, J. Harper, G. Tamvakopoulos, and M.A. Moses. 2000. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3884-3889.
- 40 23. Kondo, K., H. Kinoshita, H. Ishikura, T. Miyoshi, T. Hirose, Y. Matsumori, and Y. Monden. 2001. Activation of matrix metalloproteinase-2 is correlated with invasiveness in thymic epithelial tumors. *J Surg Oncol* 76:169-175.
- 45 24. Kozaci, L.D., D.J. Buttle, and A.P. Hollander. 1997. Degradation of type ii collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthr Rheum* 40:164-174.
- 50 25. Cheung, P.Y., G. Sawicki, M. Wozniak, W. Wang, M.W. Radomski, and R. Schulz. 2000. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 101:1833-1839.
26. Fernandez-Patron, C., M.W. Radomski, and S.T. Davidge. 1999. Vascular matrix metalloproteinase-2 deaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* 85:906-911.
- 55 27. Sawicki, G., E. Salas, J. Murat, H. Misztalane, and M.W. Radomski. 1997. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature* 386:616-619.
- 60 28. Kirshenbaun, K., Zuckermann, R.N., and Dill, K.A. 1999 Designing polymers that mimic biomolecules. *Curr Opin Struct Biol* 9:530-535.
29. Sidhu, S.S., Lowman, H.B., Cunningham, B.C., and Wells, J.A. 2000 Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods Enzymol* 328:333-363.
- 65 30. Cunningham, B.C., and Wells, J.A. 1997 Minimized proteins. *Carr Opin Struct Biol*7:457-462.

31. Drolet, D.W., Jenison, R.D., Smith, D.E., Pratt, D., and Hicke, B.J. 1999 A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb Chem High Throughout Screen* 2:271-278.
- 5 32. Bissantz, C., Folkers, G., and Rognan, D. 2000 Protein-based virtual screening of chemical databases. 1 Evaluation of different docking/ scoring combinations. *J Med Chem* 43:4759-4767.
33. Houghten, R.A, Wilson, D.B., and Pinilla, C. 2000 Drug Discovery and vaccine development using mixture-based synthetic combinatorial libraries. *Drug*
10 *Discovery Today* 5:276-285.
34. Ribatti, D., A. Gualandris, M. Bastaki, A. Vacca, M. Iurlaro, L. Roncali, and M. Presta. 1997. New model for the study of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane: the gelatin sponge/ chorioallantoic membrana assay. *J Vasc Res*
15 34:455-463.
35. Taniyama Y., Morishita R., Hiraoka K., Aoki M., Nakagami H., Yamasaki K., Matsumoto K., Nakamura T., Kaneda Y., and Ogihara T. 2001 Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation* 104:2344-2350.
20

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende uno o mas de:
- 5 (i) una proteína C activada (PCA),
(ii) un fragmento funcional de una PCA, y
(iii) proteína C,
- 10 como un agente activo en la preparación de un medicamento tópico para promover la cicatrización de heridas en un paciente, en donde dicha herida se elige del grupo constituido por úlceras dérmicas, quemaduras, heridas orales, lesión de hueso y cartílago, y necrosis de piel relacionada con sustancias químicas.
- 15 2. El uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha herida es una úlcera dérmica.
3. Uso de una composición que comprende uno o mas de:
- 20 (i) una proteína C activada (PCA),
(ii) un fragmento funcional de una PCA, y
(iii) proteína C,
- 25 como un agente activo en la preparación de un medicamento tópico para promover la cicatrización de heridas en un paciente, en donde dicha herida es una herida ocular, y en donde dicho medicamento promueve la re-epitelialización del ojo.
- 30 4. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente es PCA humana.
5. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente es proteína C humana.
6. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5, que comprende además un activador para la proteína C.
- 35 7. El uso de conformidad con la reivindicación 6, en donde el activador se elige del grupo constituido por trombina, kallikreina y/o trombomodulina.
8. Un gel, esponja, gasa o malla que incorpora una cantidad de un agente que comprende uno o mas de:
- 40 (i) una proteína C activada (PCA),
(ii) un fragmento funcional de una PCA, y
(iii) proteína C,
- 45 para uso en promover la cicatrización de heridas mediante aplicación de dicho gel, esponja, gasa o malla a la herida de modo que dicho agente se administre tópicamente a dicha herida.
- 50 9. El sistema de suministro de conformidad con la reivindicación 8, en donde el agente es PCA humana.
10. El sistema de suministro de conformidad con la reivindicación 8, en donde el agente es proteína C humana.
- 55 11. El sistema de suministro de conformidad con la reivindicación 8 o 10, que comprende además un activador para la proteína C.
12. El sistema de suministro de conformidad con la reivindicación 10, en donde el activador se elige del grupo constituido por trombina, kallikreina y/o trombomodulina.
- 60 13. Uso de un agente que comprende uno o mas de:
- (i) una proteína C activada (PCA),
(ii) un fragmento funcional de una PCA, y
(iii) proteína C,
- 65

en la preparación de un gel, esponja, gasa o malla para promover la cicatrización de heridas, siendo apropiado dicho gel, esponja, gasa o malla para aplicación a una herida de modo que dicho agente se administre tópicamente a dicha herida.

- 5
14. El uso de conformidad con la reivindicación 13, en donde la herida es una úlcera dérmica.
15. El uso de conformidad con la reivindicación 13 o 14, en donde el agente es PCA humana.
- 10
16. El uso de conformidad con la reivindicación 14 o 15, en donde el agente es proteína C humana.
17. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 13, 14 y 16, en donde el medicamento o sistema de suministro comprende además un activador para la proteína C.
- 15
18. El uso, de conformidad con la reivindicación 17, en donde el activador se elige del grupo constituido por trombina, kallikreina y/o trombomodulina.

Figura 1

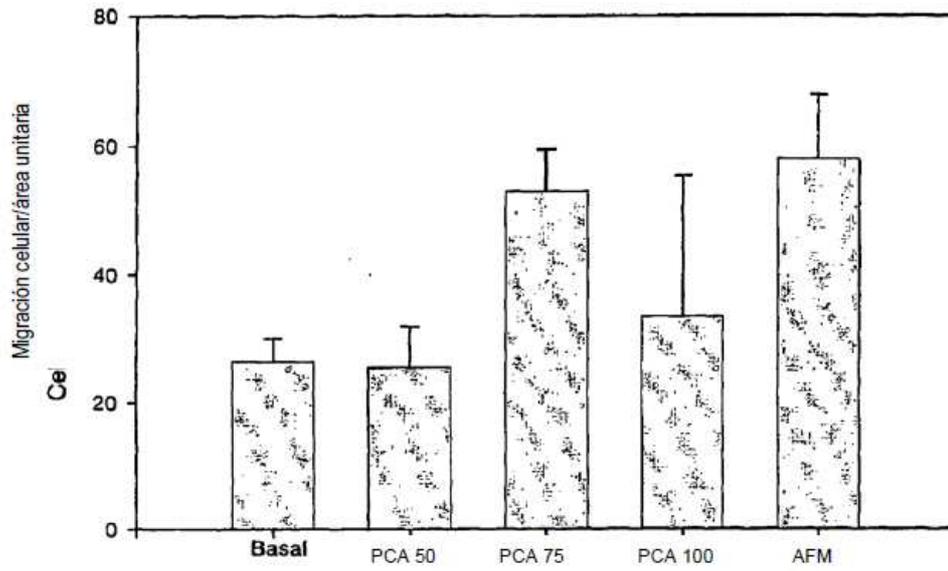


Figura 2

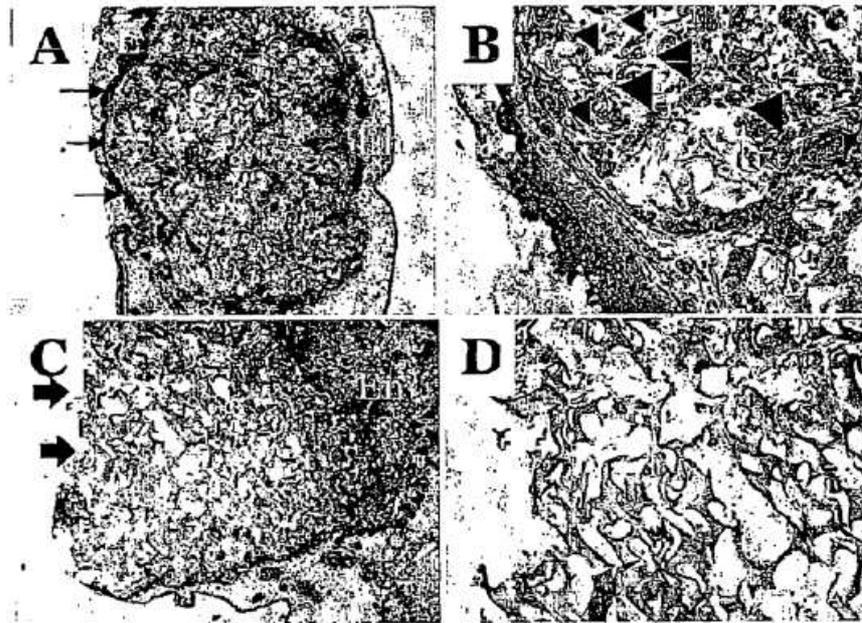


Figura 3

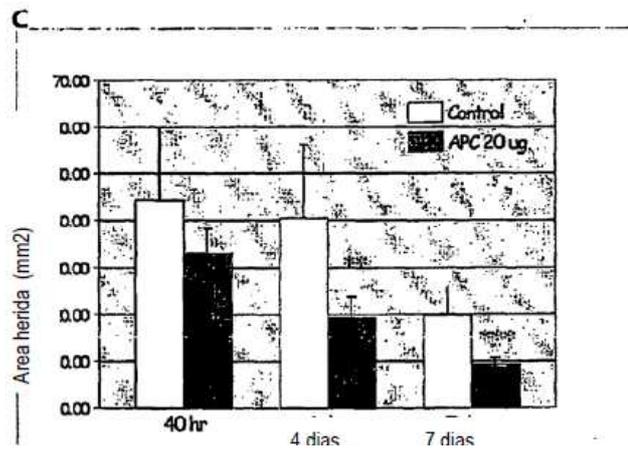
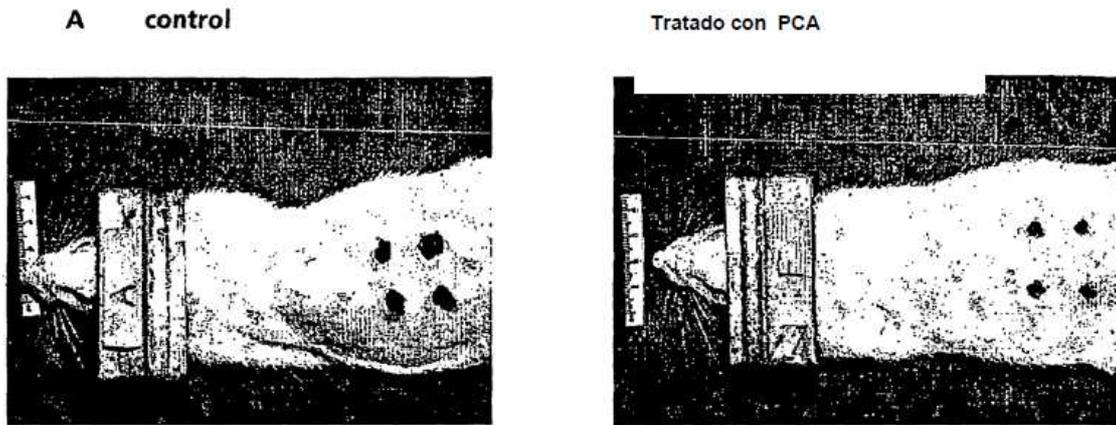


Figura 4

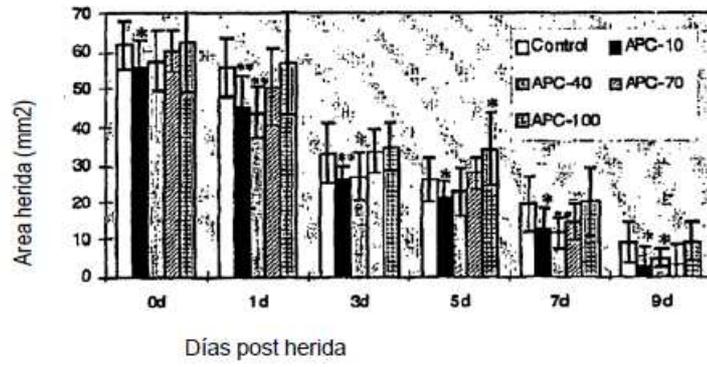


Figura 5

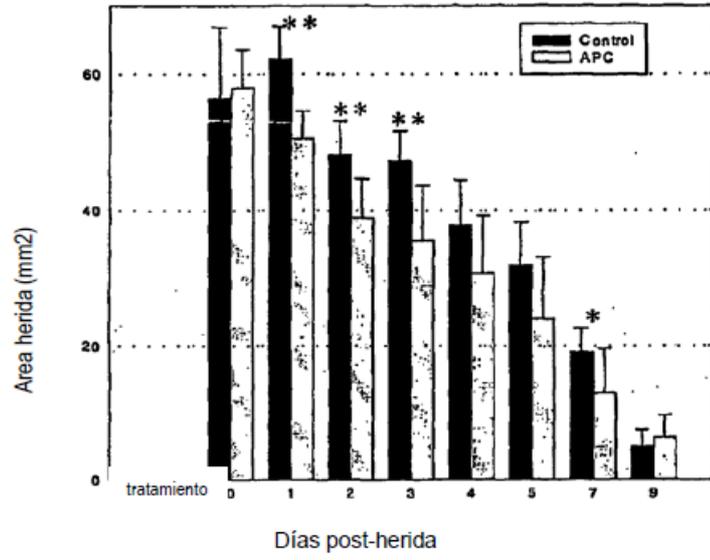


Figura 6

