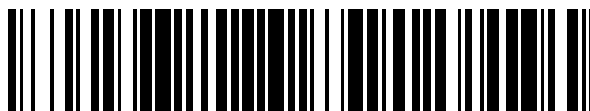


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 391**

51 Int. Cl.:
C07K 14/81 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08787634 .8**
96 Fecha de presentación: **26.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2174956**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **Composiciones para tratamiento anti-fibrinolítico**

30 Prioridad:
26.06.2007 ES 200701786

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2012

73 Titular/es:
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
(100.0%)
Avenida Pío XII, 22 Oficina 1
31008 Pamplona Navarra , ES

72 Inventor/es:
ORBE LOPATEGUI, JOSUNE;
PÁRAMO FERNÁNDEZ, JOSÉ ANTONIO;
RODRÍGUEZ GARCÍA, JOSÉ ANTONIO y
SERRANO VARGAS, ROSARIO

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 390 391 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

Composiciones para tratamiento anti-fibrinolítico

5 **Campo técnico de la invención**

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

10 **Antecedentes de la invención**

El sistema hemostático es responsable del mantenimiento de la fluidez circulatoria y de la prevención de hemorragias en respuesta a un ataque vascular. La hemostasis fisiológica está controlada por mecanismos que promueven la coagulación y la formación de fibrina y por aquellos que favorecen su degradación o fibrinólisis. La activación excesiva de la coagulación o un defecto de la fibrinólisis da lugar a la formación de coágulos que obstruyen los vasos sanguíneos (trombosis intravascular), provocando isquemia y necrosis. No obstante, una situación general de hiper-fibrinólisis fomenta la aparición de hemorragias.

Los estados hiper-fibrinolíticos provocados por anomalías congénitas o adquiridas en el sistema de coagulación-fibrinólisis provocan predisposiciones a complicaciones hemorrágicas importantes. Dichos estados se han asociado al tratamiento trombolítico así como a cirugía en órganos que contienen una elevada cantidad de activadores del plasminógeno, tales como la glándula prostática, el útero y los pulmones. Además, la coagulación intravascular diseminada (DIC), secundaria a muchos procesos médicos y/o quirúrgicos, constituye el prototipo de estado hiper-fibrinolítico asociado a hemorragias masivas en diversos órganos.

En enfermedades con fisiopatologías hemorrágicas subyacentes provocadas por una coagulación anormal o un incremento en la fibrinólisis, y aparte de que vengan con posterioridad transfusiones de hemoderivados, a menudo las medidas farmacológicas para el tratamiento son anti-fibrinolíticas, pero el tratamiento falla en aproximadamente el 30 % de los casos.

Los tratamientos anti-fibrinolíticos buscan inhibir la degradación de fibrina. Los más habituales utilizados en tratamiento clínico son los análogos sintéticos de la lisina, tales como el ácido ϵ -aminocaproico (EACA) y el ácido tranexámico (AMCHA), que compiten con el plasminógeno por los sitios de unión a la lisina, y la aprotinina, que es un derivado de pulmón bovino con un amplio espectro de inhibición de proteasas.

Estos compuestos han demostrado ser eficaces en diversas situaciones clínicas médicas y quirúrgicas, tales como hemorragia intracraneal, cirugía con riesgo elevado de hemorragia y complicaciones derivadas de tratamiento trombolítico.

A nivel quirúrgico, los agentes anti-fibrinolíticos, además de reducir la hemorragia posoperatoria, pueden ser una alternativa a la transfusión de sangre y de otros hemoderivados en cirugía cardíaca, hepática y ortopédica. No obstante, el uso de estas preparaciones aún no se ha generalizado, en parte debido a que no hay estudios suficientes que demuestren su eficacia y también porque pueden incrementar el riesgo de complicaciones trombolíticas (Mangano DT y col. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. N Engl J Med 2006; 354: 353 - 365).

Por ejemplo, en cirugía hepática, fundamentalmente trasplante de hígado, el uso de anti-fibrinolíticos tales como la aprotinina y el AMCHA consigue una reducción de las complicaciones hemorrágicas, pero puede llevar asociados problemas tromboticos (de Boer MT y col. Minimizing blood loss in liver transplants: progress through research and evolution of techniques. Dig Surg 2005; 22: 265 - 275).

En hemorragia intracraneal, los anti-fibrinolíticos tampoco se han incorporado a las guías de práctica clínica (You H y col. Hemostatic drug therapies for acute intracerebral haemorrhage. Cochrane Database Syst Rev 2008; CD005951). En el caso particular de hemorragia cerebral, primaria o secundaria a un tratamiento trombolítico, la utilización del factor VIIa recombinante es el único tratamiento que parece tener algún efecto beneficioso en términos de reducción de la mortalidad (29 % de pacientes que reciben el placebo en comparación con el 188 % de pacientes que reciben el factor VIIa) y de reducción de secuelas neurológicas (Mayer S.A., Brun N.C. y col.; "Recombinant Activated Factor VII intracerebral Hemorrhage Trial investigators. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral haemorrhage": N Engl J Med. 2005; 352: 777 - 786).

La coagulación intravascular diseminada (DIC) es otra dolencia clínica que involucra una hemorragia masiva en la que está contraindicada la administración de los anti-fibrinolíticos actuales, puesto que fomenta la trombosis generalizada (Paramo JA. Coagulación intravascular diseminada, Med clin (Barc) 2006; 127; 785 - 9).

La trombolisis con activadores del plasminógeno de tipo tPA o uroquinasa es uno de los tratamientos elegidos en ataques cardiacos agudos e ictus isquémicos pero su uso está asociado a una incidencia elevada de hemorragias

importantes en hasta el 14 % de los casos y de hemorragias intracraneales en hasta el 4 % de los casos. Además de los tratamientos con hemoderivados, los anti-fibrinolíticos de tipo EACH o AMCHA están indicados cuando se produce una hemorragia excesiva, a pesar de que su utilización puede fomentar la recurrencia trombótica.

5 Una hemorragia excesiva después de una extracción dentaria es una de las complicaciones más habituales en pacientes con coagulopatías congénitas tales como la hemofilia A. En estas situaciones, el uso local de agentes anti-fibrinolíticos y anti-hemorrágicos (por ejemplo, ácido tranexámico, desmopresina y factor VII) contribuyen a la persistencia del coágulo y a la prevención de hemorragias (Franchini M y col. Dental procedures In adult patients with hereditary bleeding disorders: 10 years experience in three Italian Hemophilia Centers. Haemophilia 2005; 11: 10 504 - 509).

Los anti-fibrinolíticos también son la primera línea de tratamiento de mujeres con menorragia asociada a coagulopatías congénitas junto con terapia hormonal (Demers C y col. Gynaecological and obstetric management of women with inherited bleeding disorders. J Obstet Gynaecol 2005; 27: 707 - 732).

15 La aplicación de tratamientos tópicos con geles de fibrina ha supuesto un avance en la prevención de hemorragias relacionadas con heridas quirúrgicas, pero su utilización clínica aún no se ha establecido (Gabay M. Absorbable hemostatic agents. Am J Health Syst Pharm. 2008; 63: 1244 - 53).

20 La aplicación tópica o intravenosa de inhibidores de MMPs puede restaurar la hemostasis más rápidamente, reduciendo las complicaciones hemorrágicas locales o aquellas asociadas a tPA (Lapchak PA, Araujo DM. Reducing bleeding complications after thrombolytic therapy for stroke: clinical potential of metalloproteinase inhibitors and spin trap agents. CNS Drugs. 2001; 15: 819 - 29), fomentando la persistencia del coágulo, la reparación y cicatrización de heridas quirúrgicas. A pesar de que ésta es una opción estratégica prometedora, la mayoría de ensayos clínicos con 25 inhibidores de las MMPs han fracasado: bien debido a las bajas dosis utilizadas (eficacia vs. toxicidad) o bien debido a efectos secundarios observados (síndrome músculo-esquelético). Sería necesario encontrar inhibidores más selectivos que sólo bloqueasen los mecanismos moleculares asociados a una MMP específica evitando así efectos adversos (Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. Cardiovasc Res, 2008; 69: 677 - 687).

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

Breve descripción de las figuras

35 Figura 1. Ensayo de turbidimetría de plasma recalcificado expresado como valores de absorbancia a 405 nm frente a la duración del experimento en minutos. A: La gráfica muestra las diferencias en la formación de coágulos (máxima absorbancia) de plasma solo (control) o en presencia de MMP-10 (200 nM) o MMP-3 (200 nM); 8: La gráfica muestra la formación y lisis del coágulo de fibrina plasmática recalcificado en presencia de activadores del plasminógeno tPA (30 U/ml) y uPA (135 U/ml) solos, o combinados con MMP-10 (200 nM) y también en presencia de una dosis 40 equivalente de MMP-3 (200 nM) combinada con tPA (30 U/ml).

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

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

50 Figura 4. Transferencia de Western con el anticuerpo que inhibe la actividad de la MMP-10. Marcador de pesos moleculares (banda 1), MMP-1 (banda 3), MMP-3 (banda 3), MMP-10 (banda 4). El anticuerpo inhibidor de la actividad de la MMP-10 sólo reconoce la proenzima de MMP-10 (55 kDa) y la enzima activa (45 kDa), sin mostrar ninguna reacción cruzada con otras metaloproteasas.

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

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

Descripción detallada de la invención

65 En un primer aspecto, la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo que neutraliza la metaloproteinasa de la matriz 10 (MMP-10) en la preparación de un medicamento para un tratamiento anti-fibrinolítico.

La MMP-10 (código de enzimas, número EC 3.4.24.22) también se denomina metalopeptidasa de la matriz, estromelina 2 (SYMY2), transina 2 o proteoglicanasa 2. En humanos, el gen que codifica para la MMP-10 está localizado en el cromosoma 11 (11q22.3; HUGO Gene Nomenclature Committee HGNC-ID: 7156; UniProtKB / Swiss Prot Accession Number: P09238).

5 Esta metaloproteínasa es expresada por diversos tipos celulares, tales como células endoteliales, monocitos y fibroblastos. Es sabido que se puede activar por la plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G y puede degradar un amplio espectro de sustratos de la matriz extracelular, tales como el agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, tenascina C, vitronectina y colágenos de tipo II, III, IV, IX, X y XI. La MMP-10 también puede
10 activar otras metaloproteínasas de la matriz, tales como la proMMP-1, -3, -7, -8 y -9 [Nakamura H y col.; Eur. J. Biochem., 1998; 253: 67 - T5].

También es sabido que la MMP-10 participa en diversos procesos fisiológicos, tales como el crecimiento óseo y la cicatrización de heridas. También se sobreexpresa en córneas de pacientes con retinopatía diabética y se la ha relacionado con algunos tipos de carcinomas y también con tumores linfoides. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que se puede inducir la expresión de MMP-10 en cultivos de queratinocitos mediante factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico de queratinocitos o TGF-β) y mediante citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β) [Rechardt O y col.; J. Invest. Dermatol. 2000; 116: 778 - 787]; [U de Q y col.; Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003; 44: 2928 - 2938].

20 Asimismo, en comunicaciones previas a esta invención, se ha descrito que la MMP-10:

- puede ser un biomarcador inflamatorio de riesgo vascular [Montero I y col.; J. Am. Col. Cardiol., 2006; 47: 1369 - 1378]; [Orbe J y col.; J. Thromb. Haemost.; 2007; 6: 91 - 97];

- se induce en células endoteliales que forman capilares en 30 matrices de colágeno y participa en la regresión de la formación de capilares mediante la activación de la MMP-1 [Saunders WB y col.; J. Cell Sci., 2005; 118: 2325 - 2340];

- desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de uniones intracelulares que preservan la integridad vascular en procesos de remodelación y angiogénesis [Chang S y col.; Cell, 2008; 126: 321 - 334];

- participa en la cicatrización de heridas, incrementando la migración de queratinocitos y la reorganización tisular que se produce mediante la degradación proteolítica de las proteínas de la matriz [Krampert M, y col.; Mol Blot Cell, 2004; 5242 - 5254].

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

40 Los inventores han sido capaces de demostrar que la MMP-10 no presenta una actividad trombolítica directa y que no es capaz por sí misma de alterar la formación del coágulo y la degradación de la fibrina. Sorprendentemente, también han encontrado que en presencia de agentes que activan la trombolisis, particularmente activadores del plasminógeno, la MMP-10 fomenta la disolución de los coágulos de fibrina y reduce el tiempo de lisis. Así por tanto, la MMP-10 actúa como facilitador o adyuvante de la acción trombolítica de otros activadores de la trombolisis.

45 En contraste, una metaloproteínasa de la matriz fibrinolítica como la MMP-3, con actividad proteolítica directa sobre la fibrina y el fibrinógeno, no reduce los tiempos de lisis del coágulo, cuyos activadores de la trombolisis lo consiguen por sí mismos.

50 Incluso más sorprendentemente, el inventor ha encontrado que la adición de anticuerpos específicos contra MMP-10 es capaz de inhibir el efecto de la MMP-10, dando lugar al bloqueo por completo de la disolución del coágulo, incluso en presencia de activadores de la fibrinólisis.

55 En consecuencia, un agente que inhiba la MMP-10, por ejemplo un anticuerpo, podría representar un avance significativo en el control de las hemorragias en áreas médicas y quirúrgicas, además de suponer una alternativa a la transfusión de sangre en pacientes con hemorragias excesivas provocadas por un trastorno de la fibrinólisis,

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

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

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

65 Además, el bloqueo selectivo de la MMP-10 no provoca efectos secundarios asociados a una inhibición no selectiva

de las MMPs, tales como el síndrome músculo esquelético, en el que están implicadas otras MMPs tales como la MMP-9 y la MMP-14.

Anticuerpo neutralizante de la MMP-10

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

10 Los anticuerpos policlonales son originalmente mezclas heterogéneas de moléculas de anticuerpo producidas en el suero de animales que han sido inmunizados con un antígeno. También incluyen anticuerpos policlonales monoespecíficos obtenidos a partir de mezclas heterogéneas, por ejemplo, mediante cromatografía en una columna con péptidos de un único epítipo del antígeno de interés.

15 Un anticuerpo monoclonal es una población homogénea de anticuerpos específica para un único epítipo del antígeno. Estos anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante técnicas convencionales que ya han sido descritas, por ejemplo, en Köhler y Milstein [Nature, 1975; 266: 495 - 397] o Harlow y Lane ["Using Antibodies. A Laboratory Manual" de E. Harlow y D. Lane, Publisher Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; 1998 (ISBN 978-0879695439)].

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

25 Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo monoclonal construido mediante la clonación y el injerto de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) hipervariables de un anticuerpo monoclonal murino en un anticuerpo humano, sustituyendo sus propias CDR hipervariables.

30 Un anticuerpo completamente humano es un anticuerpo o anticuerpos que han sido producidos en animales transgénicos con el sistema inmunitario humano o mediante la inmunización *in vitro* de células inmunitarias humanas (incluyendo tanto inmunización genética y tradicional, con y sin adyuvantes, y con antígeno puro o impuro; como mediante cualquier método de exposición del antígeno al sistema inmunitario) o mediante librerías nativas / sintéticas, producidas a partir de células inmunitarias humanas. Estos anticuerpos se pueden obtener y seleccionar a partir de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) en los que se han clonado genes de inmunoglobulinas humanas y que son inmunizados con el antígeno diana. Asimismo, estos anticuerpos se pueden obtener seleccionando fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) o mediante la unión al antígeno humano (Fab) presentado en librerías de fagos (expresión en fagos) y su posterior clonación e injerto en un anticuerpo humano o mediante cualquier otro método de producción y expresión de las librerías generadas clonando las regiones variables de ambas cadenas y la posterior combinación / mutación de éstas para generar librerías de anticuerpos.

45 Además, el anticuerpo o anticuerpos de la invención pueden pertenecer a cualquier clase o subclase de las inmunoglobulinas y particularmente son IgG, IgM, IgA, IgD e IgE.

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

50 En segundo lugar, el término "anticuerpo" también incluye un fragmento de anticuerpo, obtenido a partir de la proteína o mediante tecnología recombinante, que se expresa en procariotas, levaduras o eucariotas, glicosilado o desglucosilado, y que puede constar de las zonas variables de anticuerpos unidas entre sí mediante un péptido de unión (scFv) o la zona variable próxima a la región constante CHI de la cadena pesada (Fd) unida a la cadena ligera mediante cisteínas o mediante la unión de péptidos y puentes disulfuro (scFab), o nuevas variantes, tales como sólo la cadena pesada, o cualquier modificación que se realice de éstas con el objetivo de hacerlas más específicas, menos inmunógenas (humanizadas) o más estables en fluidos biológicos y que tengan la capacidad de inhibir la MMP-10 mediante la unión a su centro activo o a cualquier otro dominio de la proteína que reduzca su actividad.

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

Obtención de anticuerpos neutralizantes de la MMP-10

Los anticuerpos neutralizantes de la invención se pueden producir mediante los métodos convencionales ya conocidos para la producción de anticuerpos. Sin que esto represente ninguna limitación, los métodos utilizados
 5 pueden incluir: técnicas de inmunización en animales, incluyendo animales transgénicos para genes de inmunoglobulinas humanas, producción de anticuerpos monoclonales mediante hibridomas, producción mediante librerías de anticuerpos, que pueden ser nativas, sintéticas o derivadas de organismos inmunizados contra el antígeno de interés y que se pueden seleccionar mediante métodos de presentación o expresión muy diferentes (expresión en fagos, expresión en ribosomas, etc.) y por último mediante técnicas de ingeniería genética que se
 10 pueden rediseñar y expresar en vectores diseñados para la producción de anticuerpos recombinantes de diferentes tamaños, composiciones y estructuras. Se puede encontrar una revisión de los principales métodos para la producción y purificación de anticuerpos en: "Handbook of Therapeutic Antibodies", de S. Dübel, Publisher: Wiley-VCH, 2007, Vols: I a III (ISBN 978-3527314539);

15 "Antibodies: Volume 1: Production and Purification" de G. Subramanian Ed., Publisher: Springer, 1st Ed. 2004 (ISBN 978-0308482458);

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

20 "Molecular Cloning: a Laboratory manual", de J. Sambrook and O.W. Russel Eds. Publisher: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 3rd edition, 2001 (ISBN 978-0879895774).

En una forma de realización particular no limitante de la invención, un procedimiento para la obtención y producción de un anticuerpo monoclonal neutralizante de la MMP-10 podría comprender las siguientes etapas:

1. Inmunizar ratones con una disolución de MMP-10 o un fragmento inmunógeno de la MMP-10 o un plásmido que contiene MMP-10 o sus derivados.

30 2. Seleccionar aquellos animales con respuesta policlonal contra el antígeno mediante transferencia de Western, ELISA o inmunocitoquímica.

3. Realizar la fusión de los bazo de los animales con células de mieloma (SP2/O-Ag14; P3X63-Ag8.6.5.3; P3-NS + Ag4-1; etc.) para generar híbridos entre los diferentes tipos celulares; y seleccionar aquellos híbridos de linfocitos B y células de mieloma animales que producen anticuerpos y son inmortales en cultivo con medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina).

4. Seleccionar hibridomas que segregan los anticuerpos de interés, en otras palabras, anticuerpos que inhiben la actividad de la MMP-10. Para ello, se toman muestras de sobrenadante de todos los pocillos que contienen hibridomas para someterlos a un inmunoensayo: se llevan a cabo ensayos de ELISA con placas recubiertas con cantidades de la MMP-10 del orden de ng o µg; después de incubar durante 15 h a 4 °C y bloquear con una proteína adecuada, se añaden los sobrenadantes de los cultivos, los pocillos se lavan y a continuación se añade un anticuerpo secundario de ratón dirigido contra las inmunoglobulinas. Después de lavar y revelar con una reacción enzimática, los pocillos en los que se detecta color o que presentan un incremento en la absorbancia pueden
 45 contener clones de hibridomas que segregan anticuerpos contra la MMP-10.

5. Seleccionar aquellos hibridomas capaces de inhibir la actividad de la MMP-10 llevando a cabo un ensayo con sustrato fluorógeno. Se usa una microplaca recubierta con diversas concentraciones de un anticuerpo dirigido contra MMP-10 (R&D systems. Clon110343) y el sustrato fluorógeno de la estromelina (MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval Trp-Arg-Lys-[DNP]-NH₂) (R&D systems: ES002. Abingdon, RU). Se mide la fluorescencia (excitación a 320 nm y emisión a 405 nm) en el espectrofluorómetro (SpectraMAX GeminiXS, Molecular Devices, CA, EE.UU.) durante 2 horas con lecturas cada 5 minutos. En relación a una concentración constante de la MMP-10 activa, se seleccionan los híbridos que reduzcan la actividad de la MMP-10 en al menos el 50 % (C_{I50}) a la concentración más baja y a continuación la pre-incubación con la proteína durante 30 minutos a 37 °C.

55 Las células que producen anticuerpos en el pocillo del cual procede el sobrenadante seleccionado se crecen y se congelan en nitrógeno líquido.

6. Asegurarse de que cada cultivo de células que segregan un anticuerpo dirigido contra MMP-10 es monoclonal. La aplicación de las técnicas de clonación o dilución limitante y crecimiento de las células aisladas en nuevas microplacas de cultivo partiendo del cultivo original o células madre que son positivas en el primer ensayo de ELISA y ensayo de actividad. Una vez que las nuevas colonias aparecidas a partir de una o más células han adquirido un tamaño suficiente, se toman los nuevos sobrenadantes de éstas y se los somete a un nuevo ensayo de ELISA y de actividad. Se repite el proceso hasta que el 100 % de los sobrenadantes analizados contiene anticuerpos contra la
 65 actividad de la MMP-10.

7. Purificar los anticuerpos a partir de los sobrenadantes mediante cromatografía líquida (cromatografía de inmunoafinidad, afinidad, intercambio catiónico, hidroxipatita, interacción hidrófoba, filtraciones en gel, etc.) en un equipo AKTA FPLC, GE Healthcare Bio-Science.

5 8. Por último, analizar la pureza, especificidad, afinidad y actividad fibrinolítica de aquellos que han sido seleccionados.

La pureza del anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) que se tiñe con azul de Coomassie para demostrar la presencia de una única banda.

10 La especificidad del anticuerpo se puede determinar mediante transferencia de Western contra otras metaloproteasas (específicamente la MMP-3 con la que comparte la mayor homología) a concentraciones en el intervalo de ng o µg y revelado mediante quimioluminiscencia.

15 La constante de afinidad del anticuerpo se puede calcular a partir de la constante de disociación (K_d), definida como el gradiente obtenido al representar los valores de absorbancia del ELISA recubierto con MMP-10 frente a concentraciones crecientes de anticuerpo.

20 La capacidad neutralizadora de la actividad fibrinolítica de este anticuerpo se puede analizar mediante un ensayo de turbidimetría de la formación y lisis de coágulos de fibrina y en un ensayo de fibrina polimerizada, por ejemplo mediante los ensayos descritos en los ejemplos 1 y 2.

Además, el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo neutralizante de la MMP-10 puede servir como producto intermedio para obtener un anticuerpo quimérico o humanizado que también es un neutralizador de la MMP-10.

25 A pesar de todo lo anterior, el método para la producción del anticuerpo neutralizante de la MMP-10 no es un aspecto crítico y por tanto la persona experta en la materia puede producir fácilmente los anticuerpos de la invención por medio de cualquier método convencional para la producción de anticuerpos.

30 Indicación terapéutica para el tratamiento anti-fibrinolítico

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

35 En una forma de realización particular, el anticuerpo de la invención es útil para el tratamiento, presentación o terapia de hemorragias o complicaciones hemorrágicas.

40 En algunos casos, las complicaciones hemorrágicas a tratar se pueden producir en pacientes con estados hiper-fibrinolíticos y defectos en la coagulación que pueden estar causados por anomalías congénitas (hemofilia A, enfermedad de von Willebrand, deficiencia en la antiplasmina PAI-1 o α_2) o por complicaciones adquiridas, por ejemplo, derivadas del tratamiento con agentes anticoagulantes o en pacientes con coagulación intravascular diseminada (DIC), ciertas cirugías o tumores de tejidos u órganos ricos en activadores de la fibrinólisis, o en situaciones de fallo para eliminar los activadores del plasminógeno, tales como enfermedad hepática severa o leucemia promielocítica aguda asociada a DIC.

45 Entre las complicaciones hemorrágicas excesivas están incluidas la hemorragia menstrual (menorragia), hemorragia gastrointestinal, hemorragia urinaria, hemorragia dental y particularmente hemorragia en pacientes con defectos en la coagulación por alguna de las causas anteriormente mencionadas (hemofilia A, enfermedad de von Willebrand, tratamiento anticoagulante, DIC, etc.).

50 En otros casos, la hemorragia y las complicaciones hemorrágicas a tratar se pueden dar en procedimientos quirúrgicos (cirugía en general, incluyendo trasplantes y biopsias), particularmente cirugía sobre órganos ricos en activadores del plasminógeno (próstata, pulmón, útero) y en cirugía en pacientes con estados hiper-fibrinolíticos o con defectos en la coagulación, como ya se ha indicado. En estos casos, el propósito es reducir la hemorragia derivada de la cirugía mediante un tratamiento (antes, durante y/o después de la cirugía) con un medicamento que comprende un anticuerpo neutralizante de la MMP-10.

55 Además, la utilización tópica de anticuerpos dirigidos contra MMP-10 podría ser útil para restaurar la comunicación vascular después de llevar a cabo un injerto vascular, que incluye el inhibidor de una formulación de tipo gel de fibrina para prevenir la hemorragia relacionada con la herida quirúrgica.

60 En el contexto de la invención, el término "tratamiento" incluye la administración del medicamento que contiene el anticuerpo neutralizante de la MMP-10 para prevenir o reducir el comienzo de los síntomas, complicaciones o indicaciones bioquímicas de un estado hiper-fibrinolítico, y más particularmente para prevenir la aparición temprana de eventos hemorrágicos. El tratamiento puede ser un tratamiento profiláctico para evitar la manifestación de los síntomas clínicos o subclínicos. También puede ser un tratamiento terapéutico para suprimir o aliviar los síntomas

después de su aparición y si fuera necesario puede ser una alternativa a la transfusión de sangre.

Composición farmacéutica

- 5 De acuerdo con la invención, los anticuerpos neutralizantes se utilizan en la preparación de una composición farmacéutica como medicamento para un tratamiento anti-fibrinolítico.

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

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

- 15 En una forma de realización específica pero no limitante de la invención, la composición farmacéutica contiene una disolución de anticuerpo o anticuerpos neutralizantes contra la MMP-10 disueltos en un vehículo aceptable, por ejemplo, un vehículo acuoso, tal como agua, agua tamponada, solución salina, glicina u otro vehículo similar. Estas disoluciones son estériles y en general están exentas de partículas. La composición farmacéutica puede contener otros principios adicionales, tales como agentes para ajustar el pH, conservantes, etc.

- 20 En otra forma de realización, la composición farmacéutica será adecuada para la administración local, en forma de gel o pasta o incluso en forma de ampolla bebibles de enjuague bucal en caso de hemorragias después de una extracción dentaria.

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

- 30 La cantidad de principio activo (anticuerpos) que se puede combinar con el vehículo para preparar una forma de dosificación unitaria en general será la cantidad que produzca un efecto terapéutico. La preparación de una composición farmacéutica parenteral en forma de unidades de dosificación facilita la administración y uniformidad de la dosis, por lo que es muy beneficioso. Estas unidades de dosificación las puede preparar una persona experta en la materia de acuerdo con técnicas convencionales y teniendo en cuenta el efecto terapéutico específico que se desea conseguir y la indicación terapéutica específica.

- 35 La dosis efectiva de la composición farmacéutica de la invención dependerá de múltiples factores, incluyendo los métodos y las formas de administración, el sitio diana de acción, el estado fisiológico del paciente, otros medicamentos administrados, o de si se trata de un tratamiento profiláctico o terapéutico. No obstante, en una forma de realización particular, la unidad de dosificación a administrar del anticuerpo neutralizante de la invención estará entre 1,0 y 10,0 mg/kg. Normalmente, el régimen de administración incluirá la administración repetida de la composición con los anticuerpos de la invención, con intervalos entre cada administración que pueden ser diarios, semanales, mensuales, bimensuales o cualquier otro que establezca el farmacólogo según las necesidades del paciente (indicación específica, gravedad, etc.) y dependiendo de los protocolos farmacológicos estándar habituales.

45 **Ejemplos de la invención**

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

- 50 Para los ejemplos, se utilizó lo siguiente:

- MMP-10 recombinante, obtenida en forma de proenzima de 68 kDa con el 20 - 30 % de enzima madura de 48 kDa (R&D Systems, 910-MP, Abingdon, RU), que se reconstituyó con tampón TCNB (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM, 0,05 % de Brij35).

- MMP-3 recombinante, obtenida en forma de proenzima de 52 kDa (R&D Systems, 513-MP, Abingdon, RU), suministrada en una disolución con Tris 12,5 mM, CaCl₂ 5 mM, 0,025 % de Brij35 y 50 % de glicerol.

- 60 - Uroquinasa (uPA) (Vedim Pharma SA; 628602, Barcelona, España).

- Activador del plasminógeno tisular recombinante (tPA) (Boeminger ingelheim; 985937 Actilyse®, Ingelheim, Alemania).

- 65 Para la evaluación de la actividad trombolítica se utilizó un método de turbidimetría, para controlar la formación y lisis del coágulo de fibrina sobre muestras de plasma, de acuerdo con el protocolo descrito previamente por von dem

Borne y colaboradores [Blood, 1995; 86; 3035 - 3042].

Además, para evaluar la actividad sobre la lisis de fibrina, se utilizaron ensayos sobre placas de fibrina siguiendo el procedimiento descrito por Edward [J. Clin. Path., 1972; 25: 335 - 337].

5

Ejemplo 1: Efecto de la MMP-10 y la MMP-3 sobre la formación y lisis de coágulos

Como se ha mencionado previamente, el efecto de la MMP-10 y la MMP-3 sobre el sistema hemostático se evaluó de acuerdo con el procedimiento descrito por von dem Borne y col. En este método, se evaluaron a lo largo del tiempo los cambios en la turbidez / absorbancia como indicadores durante la formación y lisis de coágulos para ambos procesos. La medición de la turbidez se llevó a cabo leyendo la absorbancia a 405 nm durante las fases de formación y lisis de los coágulos, utilizando un lector fotométrico, en nuestro caso un lector de ELISA (Fluostar Optima, BMG Labtech). El incremento en la turbidez / absorbancia indica la formación del coágulo de fibrina mientras que la reducción en este parámetro indica la lisis del coágulo.

10

15

Para la formación del coágulo, se mezclaron en los pocillos de una microplaca 75 µl de plasma citrado, 75 µl de tampón HEPES (HEPES 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 3,5 mM, CaCl₂ 6 mM, MgCl₂ 1,2 mM, y el 0,1 % de BSA, pH = 7,5) y 10 µl de CaCl₂ 150 mM. La placa se incubó a 37 °C y se midió la absorbancia a 405 nm durante 2 horas, con lecturas cada 30 segundos.

20

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

25

En ensayos en paralelo también se analizó el efecto sobre la formación de coágulos con la MMP-3 (200 nM). En este caso, la MMP-3 se activó primero con acetato *p*-aminofenilmercúrico 1 mM (APMA, 164610, MD Biosciences, La Jolla, EE.UU.) a 37 °C durante 24 h.

30

Como se puede observar en la Figura 1A, la MMP-10 no indujo cambios en la velocidad de formación de coágulos ni sobre la turbidez máxima alcanzada, en cualquiera de las dosis utilizadas (tabla 1). No obstante, la MMP-3 indujo una reducción del 50 % en la absorbancia / turbidez máxima del coágulo formado, probablemente por su acción proteolítica directa sobre el fibrinógeno.

35

Estos resultados muestran que la MMP-10, en contraste con lo descrito para la MMP-3, no altera la velocidad de formación del coágulo, puesto que no presenta ninguna actividad contra el fibrinógeno.

40

A continuación, se estudió la velocidad de lisis del coágulo de fibrina. Como en la sección previa, se utilizó plasma recalcificado en tampón HEPES, al que se le añadió MMP-10 (o MMP-3) simultáneamente con un activador del plasminógeno, seleccionado entre 30 U/ml de activador del plasminógeno tisular (tPA) o 135 U/ml de uroquinasa (uPA) al comienzo de las mediciones turbidimétricas.

45

Las concentraciones de tPA y uPA a usar se determinaron en estudios previos de dosis-respuesta en los que la dosis seleccionada fue aquella que lisó completamente el coágulo de fibrina en el espacio de 2 horas.

50

Como se puede observar en la Figura 1B y en la tabla 1, la MMP-10 en ausencia de tPA y uPA no produjo la lisis del coágulo de fibrina, mientras que en presencia de los dos activadores, tPA o uPA, indujo un incremento significativo en la tasa de lisis del coágulo de fibrina con la dosis máxima de MMP-10 probada (200 nM), y la reducción en el tiempo de lisis (tiempo en el cual la mitad del coágulo se había lisado) fue de 15 minutos (52,9 minutos vs. 68,3 minutos, *p* < 0,01) en presencia de tPA y de 6 minutos en presencia de uPA (42 min vs 47,5 min), *p* < 0,05). Esta reducción en el tiempo de lisis representa una reducción del 20 % en presencia de tPA y del 10 % con uPA.

En contraste, la MMP-3 no varió la tasa de lisis del coágulo en presencia de tPA.

55

Estos resultados indican que la MMP-10, en contraste con la MMP-3, no es capaz de digerir la fibrina, pero incrementa el efecto fibrinolítico de los activadores del plasminógeno y de la fibrinólisis (tPA y uPA). La MMP-10, sin tener capacidad para actuar sobre la fibrinólisis endógena, evitaría o atenuaría el comienzo de la hemorragia, lo que la convierte en un buen candidato para su utilización como adyuvante en terapia trombolítica.

60

Tabla 1. Tiempo de lisis del coágulo de fibrina (expresado en minutos) en presencia de activadores del plasminógeno (tPA o uPA)

	tPA 30 U/ml	tPA 20 U/ml	tPA 15 U/ml	uPA 135 U/ml
Control	68,3	102,0	125,3	47,5
MMP-10 50 nM	65,5	-	-	-

MMP-10 100 nM	61,2	-	-	-
MMP-10 200 nM	52,8	84,7	108,7	42,0
MMP-8 200 nM	76,3	-	-	-
Anti-MMP-10 (MAb)	No se produce lisis	-	-	No se produce lisis
Control isotipo IgG	74,3	-	-	48,3

Ejemplo 2: Efecto de la MMP-10 sobre la degradación de fibrina

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

Las placas de fibrina se prepararon partiendo de una disolución de 6 mg/ml de fibrinógeno humano (Sigma, F3879, Saint Louis, MO, EE.UU.) en tampón de Veronal (BioWhittaker, 12-624E, Cambrex, MD, EE.UU.) a 37 °C, que se filtró, y al que se le añadió un volumen igual de CaCl₂ 50 mM. Esta disolución (6 ml) se mezcló con 1 U internacional (unidades NIH) de trombina (Enzyme Research Lab; HT1200a, Swansea, RU) y se dejó polimerizar durante 6 horas.

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

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

Ejemplo 3: Inhibición de la fibrinólisis y lisis del coágulo inducida mediante tPA con anticuerpos dirigidos contra MMP-10

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

La relación de enzima: anticuerpo que bloquea la actividad enzimática se había probado previamente en un ensayo de actividad para la MMP-10 en una microplaca recubierta con un anticuerpo dirigido contra MMP-10 (R&D systems, Clon110343) y la utilización del sustrato fluorógeno estromelisinina (MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys-[DNP]-NH₂) (R&D systems; ES002, Abingdon, RU) [Lombard y col.; Biochimie, 2005: 87: 265 - 272]. Se midió la fluorescencia (excitación a 320 nm y emisión a 405 nm) en un espectrofluorómetro (SpectraMAX GeminiXS, Molecular Devices, CA, EE.UU.) durante 1 h, estableciéndose que la relación 1: 2 inhibía completamente la concentración de enzima activa (Figura 3).

Se estudió la especificidad del anticuerpo mediante transferencia de Western para descartar la existencia de reacción cruzada con otras metaloproteasas (Figura 4). El anticuerpo inhibidor de la MMP-10 sólo reconocía esta metaloproteasa, puesto que ejercía una inhibición específica sobre ella, a pesar de la elevada homología en la familia de las metaloproteasas y en particular con la otra estromelisinina MMP-3.

Los resultados muestran que el efecto coadyuvante sobre la fibrinólisis es específico de la MMP-10 puesto que éste se reduce en presencia de anticuerpo dirigido contra MMP-10. Este efecto fue muy llamativo cuando dicho anticuerpo se añadió para bloquear la actividad endógena de la MMP-10 plasmática (Figura 6). Los resultados establecen que la ausencia de MMP-10 en plasma evita la lisis del coágulo de fibrina incluso en presencia de tPA o uPA (tabla 1).

Estos resultados se corroboraron en ensayos sobre placas de fibrina polimerizada. Como se muestra en la Figura 6, en presencia de anticuerpo dirigido contra MMP-10, el área de lisis producida mediante la combinación tPA: MMP-10 se redujo (91,2 % vs. 188,6 %), mientras que el anticuerpo control no produjo ningún efecto (184,6 %). Estos datos confirman que la utilización de un anticuerpo específico para la MMP-10 neutraliza y bloquea la disolución farmacológica de coágulos de fibrina.

Ejemplo 4: Tiempo de hemorragia

Para analizar el efecto de la ausencia de MMP-10, se estudió el tiempo de hemorragia en 17 ratones con el gen de la MMP-10 inactivado (KO) y 14 ratones de tipo silvestre (WT) de 1 mes de edad. Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) intraperitonealmente y se mantuvieron sobre una manta

5 térmica a 37 °C. Los últimos 5 mm de la cola se cortaron con un escalpelo y se sumergieron en 1 ml de NaCl al 0,9 % a 37 °C. Se midió el tiempo desde el comienzo del sangrado hasta el momento en que la sangre dejó de fluir de manera espontánea. Además, se midió la cantidad de sangre perdida mediante la absorbancia a 560 nm de la sangre recogida en la disolución salina y el resultado se comparó con una curva patrón construida con volúmenes conocidos de sangre de ratón.

Resultados

10 El tiempo de hemorragia proporciona una medida adicional de la hemostasis *in vivo*.

15 Como se puede observar en la tabla 2, el tiempo de hemorragia en ratones KO para MMP-10 fue significativamente inferior que los presentados por los ratones de tipo silvestre. La pérdida de sangre durante el tiempo de hemorragia fue significativamente inferior, que indica que en ausencia de MMP-10, la capacidad para controlar la hemorragia es superior que cuando ésta está presente.

Tabla 2

	MMP-10 KO	(WT)	p
Tiempo de hemorragia (s)	44,0 ± 24,4	98,9 ± 64,0	0,006
Pérdida de sangre (µl)	4,2 ± 0,9	12,1 ± 12,1	0,038

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo neutralizante para la metaloproteinasa de la matriz 10 (MMP-10) en la preparación de un medicamento para tratamiento anti-fibrinolítico.
5
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes con estados hiper-fibrinolíticos causados por anomalías congénitas.
10
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes sometidos a un tratamiento anticoagulante.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes con coagulación intravascular diseminada.
15
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas causadas por procedimientos quirúrgicos.
20
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la preparación de un medicamento como alternativa a la transfusión sanguínea en hemorragias agudas.
8. Un anticuerpo neutralizante para la metaloproteinasa de la matriz 10 (MMP-10) para uso en tratamiento anti-fibrinolítico.
25
9. Anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 8, para uso en el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas.
10. Anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes con estados hiper-fibrinolíticos causados por anomalías congénitas.
30
11. Anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes sometidos a un tratamiento anticoagulante.
35
12. Anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas en pacientes con coagulación intravascular diseminada.
13. Anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de hemorragias y complicaciones hemorrágicas causadas por procedimientos quirúrgicos.
40
14. Anticuerpo neutralizante de acuerdo con la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de hemorragias agudas como alternativa a la transfusión de sangre.

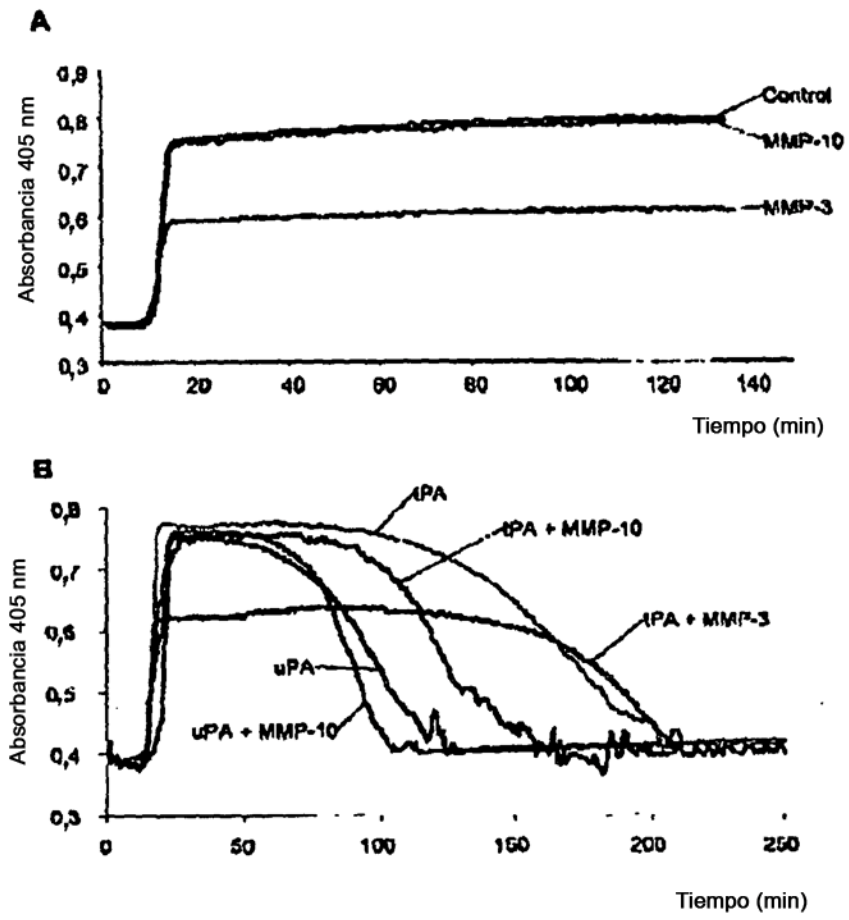


Figura 1

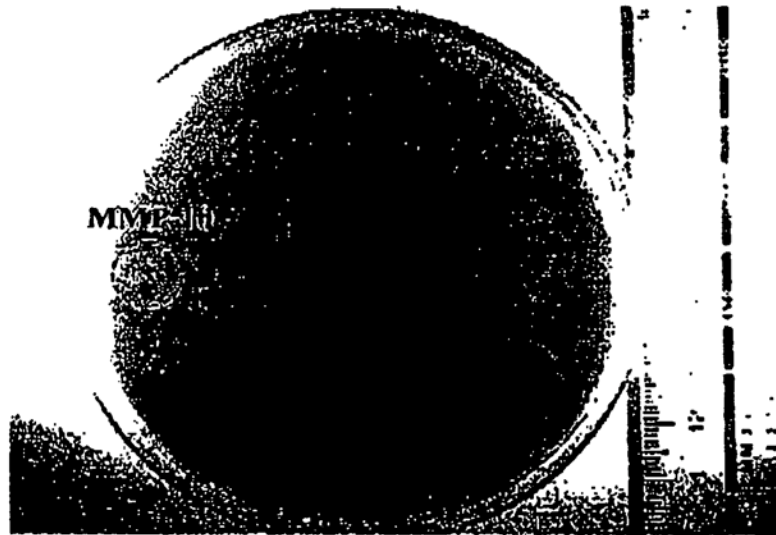


Figura 2

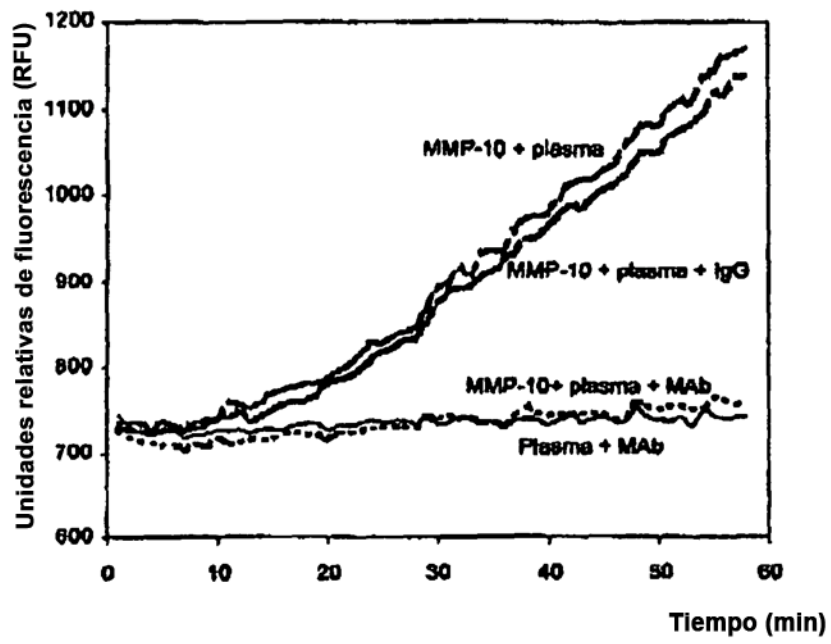


Figura 3

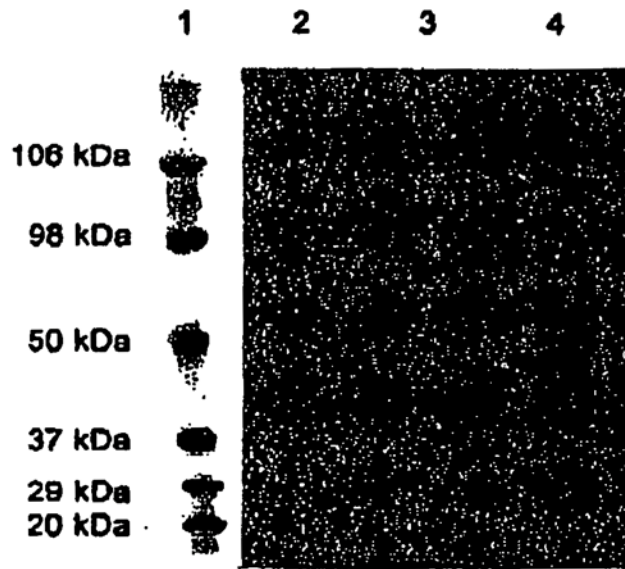


Figura 4

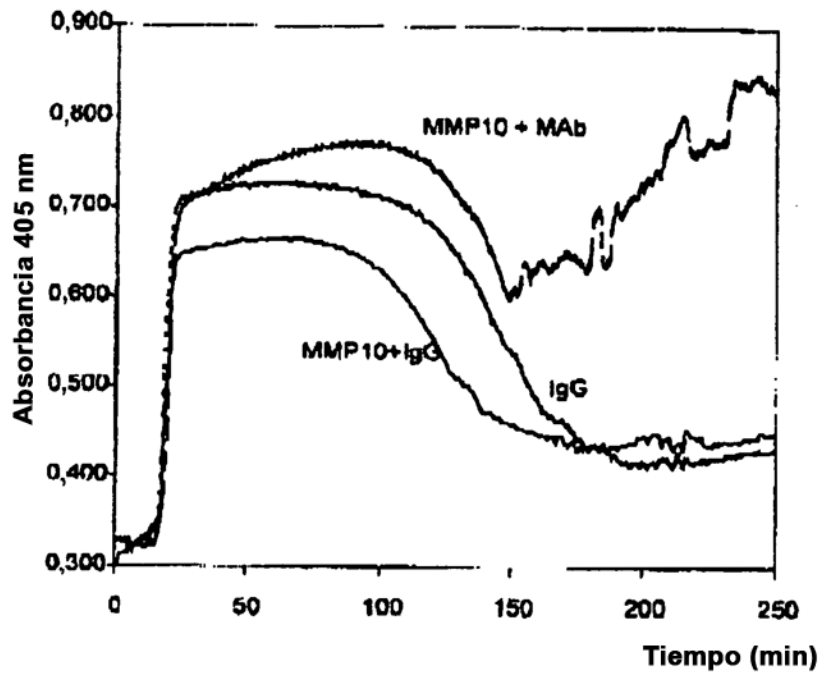


Figura 5

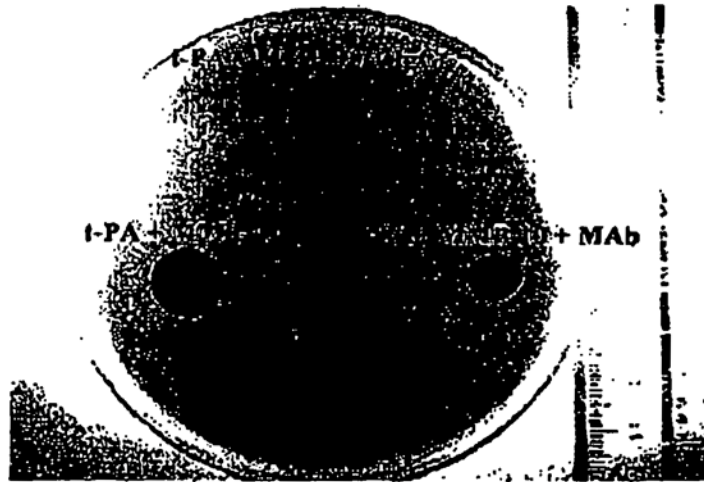


Figura 6