

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 965**

51 Int. Cl.:

A61P 7/02 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/56 (2006.01)

C07K 16/36 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2005 E 05820601 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 1830924**

54 Título: **Prevención de la formación y/o estabilización de trombos**

30 Prioridad:

23.12.2004 EP 04030593

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.06.2013

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**NIESWANDT, BERNHARD y
RENNE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 407 965 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

Prevención de la formación y/o estabilización de trombos.

El objeto de la presente invención es, en el aspecto más general, la prevención de la formación y/o estabilización de trombos tridimensionales arteriales o venosos.

- 5 En particular, la presente invención se refiere al uso de al menos un anticuerpo y/o un inhibidor para inhibir la actividad del factor XII y prevenir la formación y/o la estabilización de trombos y el crecimiento de trombos. La invención se refiere también a una formulación farmacéutica y al uso de factor XII como diana antitrombótica.

10 La lesión de la pared de los vasos desencadena la adhesión y agregación bruscas de las plaquetas de la sangre, seguido por la activación del sistema plasmático de la coagulación y la formación de trombos que contienen fibrina, que ocluyen el sitio de la lesión. Estos eventos son cruciales para limitar la pérdida de sangre post-traumática, pero pueden ocluir también vasos enfermos conduciendo a isquemia e infarto de órganos vitales. En el modelo de cascada o aluvión, la coloración de la sangre procede por una serie de reacciones que implican la activación de zimógenos por proteólisis limitada que culminan en la generación fulminante de trombina, que convierte el fibrinógeno del plasma en fibrina y activa enérgicamente las plaquetas. A su vez, las plaquetas adherentes al
15 colágeno o la fibrina facilitan la generación de trombina en varios órdenes de magnitud por exposición de la fosfatidilserina (PS) procoagulante en su superficie externa, lo que propaga el ensamblaje y la activación de complejos de proteasas de la coagulación y por interacción directa entre los receptores de las plaquetas y los factores de coagulación.

20 Existen dos caminos convergentes para la coagulación, que están desencadenados por componentes extrínsecos (la pared de los vasos) o intrínsecos (transportados por la sangre) del sistema vascular. El camino "extrínseco" es iniciado por el complejo del factor plasmático VII (FVII) con el factor tisular (TF) de las proteínas integrales de membrana, un cofactor esencial de la coagulación que está ausente en la superficie luminal pero que se expresa fuertemente en las capas subendoteliales del vaso. El TF expresado en las microvesículas circulantes podría contribuir también a la propagación de trombos por mantenimiento de la generación de trombina en la superficie de
25 las plaquetas activadas.

El camino de activación "intrínseco" o de contacto se inicia cuando el factor XII (FXII, factor de Hageman) entra en contacto con superficies cargadas negativamente en una reacción que implica quiníngeno de peso molecular alto y calicreína del plasma. FXII puede ser activado por constituyentes macromoleculares de la matriz subendotelial tales como glucosaminoglucanos y colágenos, sulfátidos, nucleótidos y otros polianiones solubles o material no fisiológico tal como vidrio o polímeros. Uno de los activadores de contacto más potentes es el caolín, y esta reacción sirve como la base mecanística para el test de coagulación clínico más importante, el tiempo de tromboplastina parcial (activado) (PTT, aPTT). En las reacciones propagadas por las plaquetas, FXII activado activa luego FXI, y FXI activa a su vez el factor IX. A pesar de su alta potencia para inducir la acumulación de la sangre in vitro, la importancia (pato) fisiológica del camino intrínseco de la coagulación desencadenado por FXII está cuestionado por el hecho de
35 que la deficiencia hereditaria de FXII así como del quiníngeno de peso molecular alto y la calicreína del plasma no está asociada con complicaciones hemorrágicas. Junto con la observación de que humanos y ratones que carecen de constituyentes del camino extrínseco, tales como TF, FVII o factor IX sufren hemorragias graves, esto ha conducido a la hipótesis actual de que la formación de fibrina se inicia in vivo exclusivamente por la cascada extrínseca (Mackman, N. (2004)). Papel del factor tisular en la hemostasis, la trombosis, y el desarrollo vascular. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1015-1022).
40

Al igual que todos los mecanismos fisiológicos, la cascada de coagulación puede llegar a activarse inadecuadamente y dar como resultado la formación de tapones hemostáticos en el interior de los vasos sanguíneos. Con ello, los vasos pueden llegar a bloquearse y verse limitado el suministro de sangre a órganos distales. Este proceso se conoce como tromboembolismo y está asociado con mortalidad alta. Adicionalmente, el
45 uso de dispositivos protésicos que están en contacto con la sangre se ve limitado severamente debido a la activación de la cascada de coagulación y el recubrimiento de la superficie protésica, comprometiendo a menudo su función. Ejemplos de tales dispositivos protésicos son hemodializadores, circuitos de by-pass cardiopulmonares, stents vasculares y catéteres residentes. En los casos en que se utilizan tales dispositivos, se emplean anticoagulantes, tales como heparina, para evitar que se deposite fibrina en la superficie. Sin embargo, algunos
50 pacientes son intolerantes a la heparina, lo cual puede causar trombopenia inducida por heparina (HIT) dando como resultado agregación plaquetaria y trombosis amenazadora para la vida. Adicionalmente, un riesgo intrínseco de todos los anticoagulantes utilizados en clínica es un riesgo asociado aumentado de hemorragia grave. Por tanto, hay necesidad de nuevos tipos de anticoagulantes que no estén asociados con tales complicaciones y que puedan utilizarse en pacientes afectados o como concepto de terapia superior de prevención de la trombosis sin tendencias
55 a hemorragia aumentadas.

Por tanto, es evidente que existe todavía necesidad de una medicación mejorada para el tratamiento o la profilaxis de la trombosis y trastornos similares. Por esta razón, es un objeto de la presente invención satisfacer dicha necesidad. Desde hace más de cinco décadas se sabe que la deficiencia del factor XII de la coagulación no está asociada con aumentos de complicaciones hemorrágicas espontáneas o relacionadas con lesiones (Ratnoff, O.M. &

Colopy, J.E. (1955). Un rasgo hemorrágico familiar asociado con una deficiencia de una fracción de plasma promotora de la coagulación. *J Clin Invest* 34, 602-13). De hecho, aunque presentando un aPTT patológico (un test clínico de coagulación que aborda el camino intrínseco de la coagulación) los humanos que son deficientes en FXII no padecen hemorragias anormales incluso durante procedimientos de cirugía mayor (Colman, R.W. Hemostasis y Trombosis. Principios básicos y práctica clínica (eds. Colman R. W., Hirsch. J., Mader V. J., Clowes A. W., & George J.) 103-122 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001). En contraste, la deficiencia de FXII había sido asociada con un riesgo incrementado de trombosis venosa (Kuhli, C., Scharrer, I., Koch, F., Ohrloff, C. & Hattenbach, L.O. (2004) Deficiencia de factor XII: un factor de riesgo trombótico para la oclusión de la vena retinal. *Am. J. Ophthalmol.* 137, 459-464., Halbmayr, W.M., Mannhalter, C., Feichtinger, C., Rubi, K. & Fischer, M. (1993) Deficiencia de factor XII (factor de Hageman): un factor de riesgo para el desarrollo de tromboembolismo. Incidencia de la deficiencia de factor XII en pacientes después de tromboembolismo venoso o arterial e infarto de miocardio recurrente. *Wien. Med. Wochenschr.* 143, 43-50). Estudios e informes de casos que respaldan esta idea se refieren al caso índice para deficiencia de FXII, de Mr. John Hageman, que murió de embolia pulmonar. La hipótesis de que la deficiencia en FXII está asociada con un riesgo protrombótico incrementado está cuestionada por una reevaluación reciente de varios informes de casos que ligan la deficiencia de FXII con trombosis (Girolami, A., Randi, M.L., Gavasso, S., Lombardi, A.M. & Spiezia, F. (2004) Las Trombosis Venosas Ocasionales Vistas en Pacientes con Deficiencia Severa (Homocigóticos) de FXII son Debidas Probablemente a Factores de Riesgo Asociados: Un Estudio de Prevalencia en 21 Pacientes y Revisión de la Bibliografía. *J. Thromb. Thrombolysis* 17, 139-143). En la mayoría de los casos, los autores identificaban factores de riesgo protrombóticos concomitantes congénitos o adquiridos en combinación con deficiencia del factor FXII que podrían ser responsables del evento trombótico con independencia de FXII. Los estudios epidemiológicos mayores utilizando pacientes bien caracterizados (Koster, T., Rosendaal, F.R., Briet, E. & Vandenbroucke, J.P. (1994) El factor de John Hageman y la trombosis venosa profunda: Leiden thrombophilia Study. *Br. J. Haematol.* 87, 422-424) y familias deficientes en FXII (Zeerleder, S. et al. (1999) Reevaluación de la incidencia de complicaciones tromboembólicas en la deficiencia congénita del factor XII – un estudio sobre 73 individuos de 14 familias suizas. *Thromb. Haemost.* 82, 1240-1246) indicaban que no hay correlación alguna entre la deficiencia de FXII y cualquier riesgo pro- o anti-trombótico.

Pixley, R.A. et al. (*J. Clin. Invest.* 91, 61-68 (1993)) da a conocer un mAb antifactor XII (mAb C6B7) que bloquea la activación del factor XII y subsiguientemente la activación del sistema de contacto in vivo restante en un modelo de babuino bacterémico hipotenso letal. El tratamiento con este mAb no afectaba a la coagulación intravascular diseminada (DIC). Stassen et al (*Thrombosis & Haemostasis*, vol. 74, No. 2, 1995-01-01, páginas 655-659) describen los efectos antitrombóticos in vivo de la aprotinina y mutantes inhibidores de la tripsina pancreática bovina.

Sorprendentemente, y en contraste con la creencia común de los expertos en la técnica, la solicitante ha descubierto que el camino intrínseco de la coagulación impulsado por el factor XII es esencial para la formación de trombos arteriales in vivo, pero no necesario para la hemostasis específica de los tejidos normales. Inesperadamente, estos resultados cambian el concepto antiguo de que la coagulación in vivo de la sangre está mediada exclusivamente por el camino extrínseco y ponen el factor XII en una posición central en el proceso de la formación patológica de trombos.

De acuerdo con lo anterior, el objeto de la invención es el uso de al menos un anticuerpo para inhibir el factor XII y prevenir la formación y/o la estabilización de trombos tridimensionales arteriales o venosos. El inhibidor respectivo del anticuerpo anti-FXII puede funcionar por tanto de tal manera que inhiba la activación de FXII y/o interfiera con otras porciones de la molécula FXII que están crucialmente implicadas en la activación de FXII.

Junto con el hecho de que el camino intrínseco no se requiere para la hemostasis, esto establece el factor XII como una nueva diana prometedor para una terapia antitrombótica poderosa. Adicionalmente, estos resultados son importantes para el desarrollo de agentes anti-FXII a fin de controlar otros (pato)mecanismos ligados al sistema de contacto tales como inflamación, activación del complemento, fibrinólisis, angiogénesis y formación de quinina.

Por tanto, la presente invención proporciona adicionalmente el uso de un anticuerpo de este tipo en el tratamiento o la profilaxis de una afección o trastorno relacionada con la formación de trombos arteriales, por ejemplo derrame cerebral o infarto de miocardio.

En particular, el uso de al menos un anticuerpo anti-FXII (v.g. como el anticuerpo F1 (MoAb F1, Ravon et al., *Blood*. 1 de diciembre 1995; 86(11):4134-43)) para inhibir la formación de trombos impulsada por FXII está de acuerdo con la presente invención.

Se proporciona una formulación farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo, que es adecuado para inhibir el factor XII y que previene la formación y/o la estabilización de trombos tridimensionales arteriales o venosos.

En particular, el anticuerpo utilizado para la formulación farmacéutica es un anticuerpo anti-FXII (v.g. como el anticuerpo FI (MoAb F1, Ravon et al., *Blood*, 1 de diciembre 1995; 86 (11): 4134-43)).

El anticuerpo puede ser también un fragmento del mismo o producto mimético que retenga la actividad inhibidora, por ejemplo análogos del dominio Inhibidor de la Proteasa Kunitz de la proteína precursora de amiloide como se expone en la patente US 6.613.890 especialmente en las columnas 4 a 8. Otros inhibidores adecuados pueden ser

Hamadarina, como ha sido expuesto por Harahiko Isawa et al. en *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 31 (2 de agosto 2002, pp. 27651 - 27658). Un inhibidor adecuado de tripsina de maíz y métodos para su producción se exponen en Zhi-Yuan Chen et al, *Applied and Environmental Microbiology*, marzo 1999, p. 1320-1324 y la referencia 19 citada en dicho lugar. Por último, pero no por ello menos importante, pequeñas moléculas aisladas por ejemplo por el uso de inhibición de FXII o respectivamente FXIIa como el ensayo en el cual está basada la selección, forman parte de la invención, así como sus usos respectivos descritos anteriormente o más adelante. Estos inhibidores de FXIIa de molécula pequeña podrían diseñarse sobre las bases de una estructura cristalina de FXII. Por tanto, varios dominios de FXII o la cadena ligera podrían expresarse recombinantemente en sistemas de expresión tales como *E. coli*, levadura o células de mamífero. A continuación, la proteína se purifica y se cristaliza utilizando procedimientos estándar como se describen para el sustrato de FXII FXI ((Jin L, et al. (2005) Las estructuras cristalinas del dominio catalítico FXIa en complejos con mutantes ecotin revelan interacciones de tipo sustrato. *J Biol Chem.* 280(6):4704-12.) Alternativamente, inhibidores de serina-proteasa de molécula pequeña podrían incluirse para estabilizar la estructura de FXII. Tales formulaciones que comprenden inhibidores de molécula pequeña de dianas proteínicas, que pueden diseñarse por ejemplo guiados por cristales de estas proteínas diana, son bien conocidos en la técnica e incluyen formulaciones farmacéuticas que pueden, por ejemplo, administrarse a un paciente sistémicamente, por ejemplo por vías parenteral, oral o tópica.

El término "parenteral" como se utiliza en esta memoria incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial e intratraqueal, instilación, aplicación por spray y técnicas de infusión. Las formulaciones parenterales se administran preferiblemente por vía intravenosa, sea en forma de bolus o como una infusión constante, o por vía subcutánea, de acuerdo con procedimientos conocidos. Portadores líquidos preferidos, que son bien conocidos para uso parenteral, incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa, soluciones de azúcar, etanol, glicoles y aceites, todos ellos estériles.

Las tabletas y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes de fijación, cargas, lubricantes y agentes humectantes, etc. Las preparaciones líquidas orales pueden encontrarse en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones, jarabes, elixires o análogos acuosos o aceitosos, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado para utilización. Tales preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes.

Las formulaciones adecuadas para aplicación tópica pueden encontrarse en la forma de suspensiones, soluciones, emulsiones, geles o, preferiblemente, ungüentos de emulsión acuosos o aceitosos. Las formulaciones útiles para aplicación en spray pueden encontrarse en la forma de un líquido pulverizable o un polvo seco.

Se expone el uso de factor XII como diana antitrombótica por inhibición del factor XII mediante al menos un anticuerpo y/o un inhibidor y prevención con ello de la formación y/o estabilización de trombos tridimensionales es el vaso.

La naturaleza, beneficio, y características adicionales de la presente invención se hacen evidentes a partir de la descripción detallada que sigue de los experimentos realizados y sus resultados cuando se leen en asociación con las figuras adjuntas descritas más adelante.

Se utilizaron ratones deficientes en factor XII para analizar la función de la cascada intrínseca de coagulación en hemostasis y trombosis. La microscopía de fluorescencia intravital y las medidas de flujo ultrasónico revelaron un grave defecto en la formación y estabilización de los trombos tridimensionales en diferentes ramas arteriales del sistema vascular. La reconstitución de los ratones mutantes con factor XII humano restableció el camino intrínseco de la coagulación *in vitro* y la formación de trombos arteriales *in vivo*. Desde el punto de vista mecanístico, la actividad procoagulante del camino intrínseco era promovida crucialmente por las plaquetas activadas. Estos resultados colocan la cascada intrínseca de coagulación de la sangre inducida por FXII en una posición central en el proceso de la formación de trombos arteriales que liga la coagulación plasmática con la agregación plaquetaria.

La Figura 1 describe el análisis de coagulación de ratones deficientes en FXII: (A) Tiempos de hemorragia de la cola de ratones de tipo salvaje (n = 12) y FXII^{-/-} (n = 11). Cada símbolo representa un individuo. (B) Recuentos de sangre periférica en miles/ μ l y parámetros de coagulación global de ratones FXII^{-/-} y ratones de tipo salvaje (wt). Las abreviaturas son recuentos de glóbulos blancos (WBC), tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) y tiempo de protrombina (PT). Los valores dan valores medios \pm SD de 10 ratones de cada genotipo. (C) Proteínas del sistema de contacto FXII, calicreína plasmática (PK) y quinínógeno de peso molecular alto (HK) sondados en 0,3 μ l de plasma wt y FXII^{-/-} por transferencia Western utilizando anticuerpos específicos. Un estándar de peso molecular se da a la izquierda. (D) Se determinaron los tiempos de coagulación por recalcificación en plasma exento de plaquetas (panel superior) y rico en plaquetas (panel inferior) de ratones C57BU6 y 129sv wt, FXII^{-/-}, FcR γ ^{-/-} y deficientes en integrina α 2 después de activación con caolín (columnas oscuras) o colágeno (columnas claras). Se analizó el efecto de JON/A en plasma C57BU6 complementado con 50 μ g/ml de anticuerpo. Se dan los valores medios \pm STD de 6 experimentos.

Figura 2. (A) Se observó la mortalidad tromboembólica después de la inyección intravenosa de colágeno (0,8 mg/kg) y epinefrina (60 μ g/kg). Todos los ratones de tipo salvaje morían en el transcurso de 5 min. Los animales que

permanecían vivos 30 min después de la exposición se consideraron supervivientes. (B) recuentos de plaquetas en ratones de control (n = 19), FXII^{-/-} (n = 14) y FcRγ^{-/-} (n = 5) 2 min después de la infusión de colágeno/epinefrina. (C) El plasma heparinizado rico en plaquetas procedente de ratones de tipo salvaje y ratones FXII^{-/-} se estimuló con colágeno (10 μg/ml) o ADP (5 μM) y se registró la transmisión de la luz en un agregómetro estándar. Los resultados que se muestran son representativos de 6 ratones por grupo. (D) Secciones teñidas con hematoxilina/eosina de pulmones de los ratones indicados 2 min después de la inyección de colágeno/epinefrina. Se contaron los trombos por campo visual con 20 aumentos. Las barras representan valores medios ± SDT de 100 campos visuales.

La Figura 3 describe la formación deficiente de trombos en ratones que carecían de factor XII in vivo. Se monitorizó la formación de trombos in vivo en las arteriolas mesentéricas después de lesión inducida con 20% de FeCl₃. (A) Se detecta la adhesión de las plaquetas simples 5 min después de la lesión en todas las cepas de ratones; 7 a 8 minutos después de la lesión se observaron los primeros trombos en ratones de tipo salvaje, mientras que en FXII^{-/-} los primeros trombos aparecían 14 a 35 minutos después de la lesión y en FXI^{-/-} 5 a 35 minutos después de la lesión. (B) Se observó la formación de trombos en el 100% de las arterias mesentéricas en los ratones de tipo salvaje, pero sólo en el 50% de los ratones FXII^{-/-} y en el 44,4% de los ratones FXI^{-/-}. (C) Los trombos formados en los ratones de tipo salvaje ocluían el vaso como promedio 25 minutos después de la lesión, mientras que los trombos formados en los ratones deficientes en FXII y FXI no conducían a oclusión. Cada símbolo representa una sola arteriola monitorizada. (D) Imágenes representativas de un experimento.

Figura 4. (A) Se analizaron tipo salvaje (n = 10), FXII^{-/-} (n = 10) y FXI^{-/-} (n = 11) en un modelo de oclusión arterial. Se indujo trombosis en la aorta por compresión fuerte con un fórceps. Se monitorizó el flujo sanguíneo con una sonda de flujo perivascular ultrasónica hasta oclusión completa. El experimento se interrumpió después de 40 min. Cada símbolo representa un individuo. (B) Se indujo lesión mecánica en la arteria carótida por una ligación. Después de la eliminación del filamento en tipo salvaje (n = 10) y FXII^{-/-} (n = 10) se midió el área del trombo en μm². (C) Las fotomicrografías muestran imágenes representativas 2 min después de la lesión.

La Figura 5 describe el defecto en la formación de trombos en animales deficientes en FXII que es restablecido por FXII humano. (A) Se observó la formación de trombos después de lesión inducida por FeCl₃ en el 100% de las arterias mesentéricas en ratones de tipo salvaje así como en ratones FXII^{-/-} inyectados con FXII humano. (B) Los trombos formados ocluían el vaso en 25 minutos como promedio después de la lesión en los ratones de tipo salvaje y en 22,7 minutos después de la lesión en ratones FXII^{-/-} inyectados con FXII humano. Cada símbolo representa un individuo. (C) Se muestran imágenes representativas. (D) Los ratones FXII^{-/-} recibieron 2 mg/kg de hFXII^{-/-} y se indujo trombosis en la aorta por compresión fuerte con un fórceps. Se monitorizó el flujo sanguíneo con una sonda ultrasónica de flujo perivascular hasta oclusión completa. El experimento se interrumpió después de 40 min. Cada símbolo representa un individuo.

La Figura 6 describe los anticuerpos anti-FXII inhibidores de la formación de trombos in vivo en ratones. Ratones de tipo salvaje recibieron 2 mg/kg de anticuerpos anti-FXII o IgG no inmune, i.v. Después de 15 min, se monitorizó la formación de trombos in vivo en las arteriolas mesentéricas después de lesión inducida con FeCl₃ al 20%. (A) Se detecta la adhesión de plaquetas simples 5 min después de la lesión en ambos grupos. Después de 7 a 8 minutos, se observaron los primeros ratones con trombos en los ratones de control tratados con IgG, mientras que en los ratones tratados con anti-FXII los primeros trombos aparecían 12 a 32 minutos después de la lesión. (B) Se observó formación de trombos en el 100% de las arterias mesentéricas en los ratones de control, pero únicamente en el 60% de los ratones tratados con anti-FXII. (C) Se muestra el tiempo hasta oclusión completa. Cada símbolo representa un individuo.

La Figura 7 describe un modelo revisado de formación de trombos arteriales. Inicialmente, en los sitios de lesiones vasculares, la formación de trombina es debida predominantemente a la exposición del factor tisular (TF) en la matriz subendotelial. TF en un complejo con FVII inicia el camino extrínseco de la coagulación. En el sitio de la lesión, la contribución del FXII que impulsa el camino intrínseco pasando por FXI para generación de trombina (FII) es menor e insignificante para la hemostasis normal. De acuerdo con ello, los individuos con deficiencia en FXII no sufren hemorragias. La trombina generada inicia la formación de coágulo por formación de fibrina y activación de las plaquetas. Propagación del crecimiento de trombos: En las superficies expuestas de los trombos en crecimiento, el camino intrínseco inducido por FXII contribuye crucialmente a la generación de trombina. El FXII activado genera fibrina adicional pasando por FXI. De acuerdo con ello, la deficiencia tanto en FXII como en FXI deteriora acusadamente la formación de trombos.

En la presente invención, se evaluó una contribución potencial del camino intrínseco de la coagulación para la formación patológica de trombos in vivo por modelos intravitales de trombosis arterial basados en microscopía y medición del flujo utilizando ratones que carecían de factor XII. Si bien la adhesión inicial de las plaquetas en los sitios de lesión no se altera en los animales mutantes, la formación y estabilización de trombos tridimensionales es acusadamente deficiente. Este defecto se observó en diferentes ramas de la vasculatura y pudo restablecerse por completo mediante factor XII humano exógeno. Estos descubrimientos establecen el camino intrínseco de la coagulación impulsado por el factor XII como enlace principal entre la hemostasis primaria y secundaria en un modelo revisado de formación de trombos.

Para analizar la función de FXII para la coagulación in vivo, se generaron ratones deficientes en FXII. Los ratones FXII^{-/-} son sanos y fenotípicamente indiferenciables de sus hermanos de camada de tipo salvaje, y fértiles. Los análisis histológicos y hemostasiológicos detallados demostraron que no existía correlación con trombosis o hemorragia incrementadas en los ratones FXII^{-/-} a pesar de un aPTT prolongado de 68 ± 17 s y un tiempo de recalcificación de 412 ± 78 s en plasma recogido retroorbitalmente (wt: 23 ± 4 y 210 ± 31 s) (Pauer, H.U., et al. (2004). Análogamente a los humanos deficientes en FXII, los ratones FXII^{-/-} no presentan tendencia alguna incrementada a hemorragia como se indica por tiempos de hemorragia en la cola similares a los encontrados en los animales de tipo salvaje ($369,5 \pm 201,7$ y $355,9 \pm 176,1$ s, respectivamente, n = 12 por grupo, Figura 1A). Los recuentos de células de sangre periférica de los ratones mutantes no diferían de los controles de tipo salvaje. Notablemente, el tiempo de protrombina (PT) de los ratones FXII^{-/-} era similar al de los ratones de tipo salvaje ($8,9 \pm 1,3$ frente a $9,1 \pm 1,3$ s), lo que indicaba que la deficiencia en FXII no afecta a la formación de fibrina por el sistema extrínseco de la coagulación (Fig. 1B). Para evaluar las diferencias potenciales en la actividad procoagulante de FXII entre humanos y ratones, se reconstituyó plasma humano deficiente en FXII (FXII < 1%) con plasma murino de tipo salvaje o viceversa y se determinó el valor PTT de las mixturas. En cualquier caso, la formación de coágulo se normalizaba, respaldando la noción de que la función de FXII para la coagulación es comparable en humanos y ratones.

En los humanos, análogamente a la deficiencia de FXII, la deficiencia de las proteínas del sistema de contacto calicreína plasmática (PK) y quinínogeno de peso molecular alto (HK) no da como resultado un riesgo incrementado de hemorragia a pesar de un aPTT prolongado. Para confirmar que la prolongación de aPTT en los ratones FXII^{-/-} no es debida a defectos adicionales de las proteínas de la fase de contacto, los autores de la invención analizaron PK y HK en plasma FXII^{-/-} y plasma de tipo salvaje. La transferencia Western indicaba que los niveles de HK y PK son equivalentes en los ratones mutantes y los de tipo salvaje (Fig. 1C). Funcionalmente, en el plasma FXII^{-/-} expuesto a colágeno o caolín, la progresión de HK y la formación de trombina se veía severamente deteriorada comparada con el plasma del tipo salvaje.

La coagulación de la sangre y la activación de las plaquetas son procesos complementarios y mutuamente dependientes. Las plaquetas interaccionan con y contribuyen a la activación de varios factores de coagulación y el producto central de la coagulación, la trombina, es un activador potente de las plaquetas. Por esta razón, se examinó a continuación con más detalle la contribución de plaquetas y FXII a la formación de coágulo. Para ello, se indujo la coagulación utilizando caolín que activa clásicamente FXII pero no tiene efecto directo alguno sobre las plaquetas, o colágeno, que activa tanto FXII como las plaquetas, donde interacciona con numerosos receptores, muy principalmente la integrina $\alpha 2\beta 1$ y GPVI. En presencia, pero no en ausencia de plaquetas, el colágeno era superior al caolín para la formación del coágulo en plasma de tipo salvaje (Figura 1D). En contraste, en plasma que contenía plaquetas FcR γ ^{-/-} deficientes en activación, la potencia relativa de caolín y colágeno, era similar al PFP y se observaba un efecto análogo con PRP de ratones integrina $\alpha 2$ ^{-/-}. La actividad procoagulante de las plaquetas se desencadena también eficientemente en la coagulación del plasma y se ha demostrado que el receptor de fibrin(ógeno) $\alpha 11\beta 3$ juega un papel crucial en este proceso, aunque los mecanismos subyacentes no se comprenden por completo. De acuerdo con estos informes, el anticuerpo JON/A bloqueante de la función de $\alpha 11\beta 3$ inhibía en gran medida el acortamiento dependiente de las plaquetas en el tiempo de coagulación (Figura 1D). En conjunto, estos resultados demostraban que las plaquetas en un estado procoagulante pueden promover la formación de coágulos inducida por FXII.

Para testar si la activación de FXII inducida por colágeno tiene consecuencias funcionales in vivo, se sometieron ratones de tipo salvaje y ratones FXII^{-/-} a un modelo de tromboembolismo pulmonar letal inducido por la infusión de una mixtura de colágeno (0,8 mg/kg de peso corporal) y epinefrina (60 μ g/kg de peso corporal). La totalidad de los ratones de control (19/19) morían en el transcurso de 5 min por trombosis pulmonar generalizada y parada cardiaca que iba acompañada por una reducción > 95% en los recuentos de plaquetas circulantes tan pronto como 2 min después de la exposición (Figura 2A, B). En estas condiciones experimentales, el 35,7% (5/14) de los ratones FXII^{-/-} sobrevivían aunque sus recuentos de plaquetas periféricas se reducían análogamente a como lo hacían los controles de tipo salvaje, lo que sugería que la protección observada no estaba basada en un defecto de activación de las plaquetas. Esta hipótesis se confirmó por estudios in vitro que demostraban que las plaquetas FXII^{-/-} expresan niveles normales de las glicoproteínas principales de la superficie, con inclusión de los receptores de colágeno, y que las células son activables normalmente por agonistas clásicos tales como trombina, adenosina-difosfato (ADP), o por el agonista específico de GPVI, el péptido afín a colágeno (como se mide por activación de la expresión de la integrina $\alpha 11\beta 3$ y la selectina P). En concordancia con esto, las plaquetas FXII^{-/-} exhibían una respuesta de agregación inalterada a colágeno, ADP (Figura 2C), PMA, o trombina.

En una serie paralela de experimentos, se expusieron ratones FcR γ ^{-/-} a colágeno/epinefrina. Estos ratones estaban completamente protegidos contra la letalidad y los recuentos de plaquetas disminuían sólo moderadamente 2 min después de la exposición, confirmando el requerimiento estricto de activación de las plaquetas para la letalidad en este modelo. Estos datos se veían respaldados adicionalmente por análisis histológico de secciones pulmonares obtenidas de ratones de los diferentes grupos. Mientras que la gran mayoría de los vasos se obstruía en los ratones de tipo salvaje, esto se veía reducido significativamente en los ratones FXII^{-/-} (supervivientes y no supervivientes). En concordancia con informes previos, no se encontraron virtualmente trombos en los pulmones de los ratones FcR γ ^{-/-} (Figura 2D). Estos resultados sugerían que, in vivo, el colágeno desencadena tanto la activación de las

plaquetas como el camino intrínseco de la coagulación dependiente de FXII que, en este modelo, actúan sinérgicamente para formar trombos pulmonares oclusivos.

La formación patológica de trombos se inicia frecuentemente por fisuración o disrupción brusca de la placa aterosclerótica en la rama arterial de la vasculatura, conduciendo a activación fuerte de las plaquetas de modo no fisiológico y actividad procoagulante en la superficie de las capas subendoteliales. Para testar el papel de FXII en estos procesos, se estudió la formación de trombos en ratones de tipo salvaje y ratones FXII^{-/-}, empleando diferentes modelos de lesión arterial. En el primer modelo, se indujo lesión por oxidación en las arteriolas mesentéricas (de 60-100 μm de diámetro) y se examinó la formación de trombos por microscopía de fluorescencia in vivo. Los ratones de tipo salvaje y FXII^{-/-} recibieron plaquetas marcadas fluorescentemente (1×10^8) del mismo genotipo y la lesión se indujo por aplicación tópica de un papel de filtro saturado con cloruro férrico (FeCl_3) al 20% durante 1 min, lo que provoca la formación de radicales libres que conducen a la disrupción del endotelio. Las interacciones de las plaquetas con la pared del vaso lesionado se iniciaron rápidamente y, 5 minutos después de la lesión, el número de plaquetas adheridas firmemente era similar en ambos grupos de ratones (Figura 3A). Sin embargo, mientras que en los ratones de tipo salvaje las plaquetas adherentes reclutaban consistentemente plaquetas adicionales de la circulación, dando como resultado la formación de agregados, este proceso era acusadamente deficiente en los ratones mutantes. En el 100% de los vasos de control (17/17), se habían formado trombos estables $> 20 \mu\text{m}$ de diámetro en el transcurso de 10 min después de la lesión, que crecían continuamente a lo largo del tiempo y conducían finalmente a la oclusión completa en el 94,1% (16/17) de los vasos dentro del periodo de observación de 40 min (tiempo medio de oclusión: $25,6 \pm 8,9$ min) (Figura 3). En contraste acusado, en los ratones mutantes la formación de microagregados o trombos ocurrida estaba completamente ausente en el 50% (7/14) de los vasos. En el 50% restante (7/14) de los vasos, se formaban trombos que eran, sin embargo, consistentemente inestables y se desprendían rápidamente de la pared del vaso. En ninguno de los vasos un trombo $> 20 \mu\text{m}$ de diámetro permanecía unido al sitio de la lesión durante más de 1 min. Como consecuencia, ningún vaso llegaba a ocluirse en los ratones FXII^{-/-} dentro del periodo de observación (40 min). Este resultado inesperado demostraba que se requiere FXII para la generación y estabilización de trombos ricos en plaquetas en las arteriolas lesionadas por FeCl_3 , y sugería que el camino de coagulación inducido por FXII contribuye esencialmente a la respuesta trombótica observada. Esta hipótesis se confirmó cuando se analizaron ratones deficientes en FXI en el mismo modelo. Dado que FXI es el sustrato principal de FXII en la cascada "intrínseca", un defecto similar en la formación de trombos habría sido de esperar en dichos ratones. De hecho, de modo muy similar a los ratones FXII^{-/-}, era detectable una adhesión virtualmente normal de las plaquetas en el sitio de lesión durante los primeros 3 minutos después de la lesión, mientras que la formación de trombos estaba inhibida por completo en el 55,6% (5/9) de los vasos. En los vasos restantes, los microagregados y trombos formados eran inestables y sufrían continuamente embolia (Figura 3). Como resultado, ninguno de los vasos se ocluía dentro del periodo de observación (40 min). Estos datos demuestran que los ratones deficientes en FXI están protegidos en un modelo de oclusión de la arteria carótida inducida por FeCl_3 .

Es sabido que la formación de trombos arteriales inducida por FeCl_3 depende de las plaquetas y la generación de trombina, pero no está claro en qué grado se asemeja este tipo de lesión al medio trombógeno producido en los vasos enfermos, v.g., después de la rotura de la placa aterosclerótica. Por tanto, a fin de excluir la posibilidad de que el deterioro masivo por oxidación inducido por FeCl_3 produzca condiciones no fisiológicas que pueden favorecer artificialmente la activación de la fase de contacto dependiente de FXII, se evaluó la función de FXII en un segundo modelo de trombosis arterial bien establecido, en el que la lesión se induce mecánicamente en la aorta y se monitoriza el flujo sanguíneo con una sonda de flujo ultrasónica. Después de un aumento transitorio inmediatamente después de la lesión, el flujo sanguíneo disminuía progresivamente durante varios minutos en todos los ratones testados. En todos los ratones testados de tipo salvaje (10/10), esta disminución daba como resultado una oclusión completa e irreversible del vaso dentro de 1,6 a 11,1 min después de la lesión (tiempo medio de oclusión $5,3 \pm 3,0$ min, Figura 4A). Se encontró un cuadro diferente en los ratones FXII^{-/-} en los que la formación de trombos estables era muy deficiente. Si bien se observaba en todos los animales una reducción progresiva en el flujo sanguíneo durante los primeros minutos después de la lesión, la oclusión ocurría sólo en 4 de 10 ratones. Además, los trombos oclusivos en dichos ratones eran en todos los casos inestables y se embolizaban rápidamente, de tal modo que el flujo sanguíneo se restablecía entre 10 s y 115 s después de la oclusión. Ninguno de los vasos reabiertos se ocluía por segunda vez. Por consiguiente, todos los ratones FXII^{-/-} exhibían tasas de flujo esencialmente normales a través del vaso lesionado al final del periodo de observación (40 min). Se obtuvieron resultados muy similares con ratones FXI^{-/-}, en los que 9 de 11 eran incapaces de establecer un trombo oclusivo dentro del periodo de observación (30 min) (Figura 5A).

El defecto acusado en la formación de trombos arteriales en los ratones FXII^{-/-} se confirmó en un tercer modelo independiente en el que se estudió el reclutamiento de plaquetas en la arteria carótida lesionada por microscopía de fluorescencia in vivo. Se purificaron plaquetas de ratones donantes, se marcaron fluorescentemente y se inyectaron en ratones receptores del mismo genotipo. Se indujo lesión vascular por ligación fuerte de la arteria carótida que causa consistentemente disrupción de la capa endotelial y frecuentemente la rotura de la lámina elástica interna seguido por adhesión rápida de las plaquetas desencadenada por el colágeno y formación de trombo en el sitio de lesión (Gruner et al., Blood 102:12/8/2005, 2003). Mientras que los animales de tipo salvaje formaban rápidamente grandes trombos estables (área de trombo: $102,821 \pm 39,344 \mu\text{m}^2$; $t = 5$ min), que no se embolizaban, únicamente se formaban agregados de tamaño pequeño y mediano en los ratones mutantes, que se desprendían

frecuentemente del sitio de lesión (Figura 4B, C). Como consecuencia, el área del trombo se reducía espectacularmente en los ratones mutantes ($8,120 \pm 13,900 \mu\text{m}^2$; $t = 5 \text{ min}$) aunque la adhesión primaria de las plaquetas en la pared del vaso parecía no ser deficiente.

5 Para testar si el defecto acusado en la formación de trombos en los ratones FXII^{-/-} es resultado de la falta de FXII en plasma o de FXII en las plaquetas, o posiblemente de efectos secundarios no identificados de deficiencia en FXII tales como alteraciones en la vasculatura, se estudió la formación de trombos arteriales en ratones FXII^{-/-} después de la administración humana de FXII (2 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal). Este tratamiento normalizaba el PTT ($27 \pm 6 \text{ s}$) y restablecía totalmente la formación de trombos arteriales. En el 100% de las arteriolas mesentéricas lesionadas por FeCl₃, se habían formado trombos $> 20 \mu\text{m}$ dentro de 10 min después de la lesión y la totalidad de los vasos se ocluían por completo dentro del periodo de observación (Figura 5A-C). Había incluso cierta tendencia hacia oclusión más rápida detectable en los ratones FXII^{-/-} reconstituidos en comparación con los ratones de control de tipo salvaje sin tratar (tiempo medio de oclusión: $22,7 \pm 8,2 \text{ min}$ frente a $25,6 \pm 8,9 \text{ min}$). Se obtuvo un resultado similar cuando la lesión se indujo mecánicamente en la aorta. En todos los vasos testados, ocurría una oclusión completa e irreversible dentro de 10 min después de la lesión (Figura 5D), confirmando que la falta de FXII en plasma da cuenta del defecto trombótico observado en los ratones FXII^{-/-}.

Los estudios descritos anteriormente demostraban que FXII es crucial para la formación de trombos arteriales y puede servir, por tanto, como diana antitrombótica.

20 Para evaluar esto directamente, se trataron ratones con 2 mg/kg de peso corporal de anticuerpos policlonales de conejo anti-FXII de ratón o anticuerpos de conejo no inmunes y se evaluó el reclutamiento de plaquetas y la formación de trombos en las arterias mesentéricas después de lesión inducida por FeCl₃. Como se muestra en la Figura 6A, la adhesión de las plaquetas en los sitios de lesión era comparable en ambos grupos de ratones. Sin embargo, mientras que en el 100% de los vasos de control se habían formado trombos $> 20 \mu\text{m}$ dentro de los 10 min después de la lesión y la totalidad de los vasos estaban ocluidos completamente dentro del periodo de observación (Figura 6B, C), se observaban únicamente trombos mayores de $20 \mu\text{m}$ en el 67% de los vasos y se había producido oclusión únicamente en el 50% de los vasos de los animales tratados con anticuerpo anti-FXII.

30 Alternativamente, para testar el impacto de los inhibidores de FXII de molécula pequeña, se infundieron ratones de tipo salvaje con el inhibidor de tripsina de maíz inhibidor FXII (CTI, 50 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal) 5 min antes de la lesión inducida por FeCl₃ en la arteria carótida (Wang et al. (2005) J. Thromb. Haemost. 3: 695-702). El tratamiento con el inhibidor prolongaba el aPTT ($62 \pm 11 \text{ s}$, $n = 4$) pero no afectaba a la hemorragia durante el procedimiento quirúrgico. En ninguno de los animales testados (0/4) se desarrollaban trombos oclusivos del vaso en el transcurso de 30 min después de la aplicación de FeCl₃.

Estos resultados demostraban que las terapéuticas anti-FXII como anticuerpos anti-FXII o inhibidores de FXII de molécula pequeña proporcionan protección significativa contra la formación de trombos arteriales.

35 Aunque la activación por contacto de FXII se ha reconocido como el punto de partida de la cascada intrínseca de coagulación de la sangre desde hace más de 50 años, se consideró que este camino es irrelevante para la coagulación de la sangre. En la presente invención, se utilizaron 3 modelos in vivo diferentes para analizar el reclutamiento de plaquetas y la formación de trombos en sitios de lesión arterial en ratones deficientes en FXII por vídeo-microscopía in situ y medidas ultrasónicas de flujo y demostraron una incapacidad acusada para formar trombos tridimensionales estables. Este defecto estaba basado en la falta de FXII en plasma, pero no en otros compartimientos, dado que se invertía por completo por inyección intravenosa de FXII humano exógeno (Figura 6) excluyendo también con ello que los efectos secundarios de la deficiencia en FXII contribuyan al fenotipo observado.

45 Estos resultados son inesperados, dado que FXII se ha considerado como una enzima antitrombótica más bien que como enzima protrombótica basándose en varios informes que demostraban una asociación de la deficiencia en FXII con una incidencia incrementada de trombosis venosa (Kuhli, C., Scharrer, I., Koch, F., Ohrloff, C. y Hattenbach, L.O. (2004) Deficiencia de factor XII: un factor de riesgo trombótico para la oclusión de la vena retinal. Am. J. Ophthalmol. 137, 459-464., Halbmayer, W.M., Mannhalter, C., Feichtinger, C., Rubi, K. y Fischer, M. (1993) Deficiencia de factor XII (factor de Hageman): un factor de riesgo para el desarrollo de tromboembolismo. Incidencia de la deficiencia de factor XII en pacientes después de tromboembolismo venoso o arterial e infarto de miocardio recurrente. Wien. Med. Wochenschr. 143, 43-50).

50 Los ratones deficientes en FXII exhiben tiempos de hemorragia normales (Figura 1A) y no muestran signos de hemorragia post-traumática espontánea o incrementada (intraoperativa), confirmando que FXII es prescindible para la hemostasis normal. A primera vista, estos resultados parecen estar en contradicción con un dogma fundamental de la hemostasis, según el cual únicamente aquellos factores cuya deficiencia está asociada con hemorragia o trombosis son relevantes para la coagulación de la sangre. Examinados más de cerca, sin embargo, los datos no objetan este teorema sino que más bien plantean la posibilidad interesante de que la hemostasis y la trombosis arterial pueden ocurrir por mecanismos diferentes.

Aunque los mecanismos de la generación sostenida de trombina expuestos anteriormente pueden ser suficientes para generar un tapón hemostático, los datos demuestran que la formación de trombos arteriales estables requiere la activación adicional del camino intrínseco de la coagulación, al menos en los ratones. No hay evidencia alguna de la posibilidad de que existan diferencias específicas de la especie en la función de FXII o un sustrato de la enzima.

5 Todos los parámetros de coagulación y el fenotipo hemostático de los ratones mutantes están en línea con la deficiencia de FXII humano y todas las alteraciones observadas en los animales se normalizaban por reconstitución con FXII humano (Figura 5). Adicionalmente, se excluye que el efecto trombótico esté restringido a un modelo experimental particular, dado que se encontró en diferentes ramas arteriales de la vasculatura y con independencia del tipo de lesión. Puede ser difícil determinar qué tipo de deterioro refleja mejor la lesión vascular producida por
10 ruptura de una placa aterosclerótica, que está considerada como el desencadenante principal de los síndromes cardiovasculares agudos. Las lesiones ateroscleróticas son ricas en constituyentes trombógenos, muy principalmente TF y colágenos fibrilares. En el proceso de la aterogénesis, se ha demostrado que la síntesis aumentada de colágeno por las células musculares lisas de la íntima y los fibroblastos contribuye en gran medida al estrechamiento luminal. La ruptura o fisuración de la placa da como resultado la exposición de las fibrillas de colágeno a la sangre fluyente lo cual desencadena la adhesión y agregación plaquetarias. Adicionalmente, aquéllas
15 inducen la activación de FXII como se ha demostrado aquí para el colágeno fibrilar tipo I, que es el tipo principal de colágeno encontrado en la pared de los vasos. Sin embargo, los colágenos no son probablemente el único activador (pato) fisiológico de FXII en los sitios de lesión. Otros candidatos podrían ser sustancias liberadas por las células en desintegración o expuestas en la ECM con inclusión de HSP90 o polianiones solubles e insolubles, v.g. nucleosomas o glucosaminoglucanos.

Entre estos activadores de FXII, los colágenos son con mucho los más trombógenos, dado que activan también fuertemente las plaquetas. En los sitios de lesión, las plaquetas están ligadas a la ECM por la interacción reversible del GPIb-V-IX plaquetario con el vWf ligado al colágeno que reduce la velocidad de las células y permite por tanto la fijación a otros receptores. Entre ellos, el receptor GPVI del colágeno tiene importancia fundamental dado que activa
25 las integrinas $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 11\beta 3$ que median luego la adhesión estable y contribuyen a la activación celular. Adicionalmente, la activación de las plaquetas por el complejo GPVI/ cadena FcR γ induce un estado procoagulante de las células que se caracteriza por la exposición de fosfatidilserina (PS) y la producción de ampollas y microvesículas de membrana (exposición a PS). La integrina $\alpha 2\beta 1$ facilita directamente este proceso por señales "fuera-adentro" e indirectamente por reforzar las interacciones GPVI-colágeno. Está establecido que las membranas que contienen PS aceleran fuertemente dos reacciones centrales del proceso de coagulación, las reacciones de
30 tenasa y protrombinasa. La presente invención demuestra que las plaquetas procoagulantes facilitan la coagulación dependiente de FXII in vitro por un mecanismo que implica a la vez el complejo GPVI/cadena FcR γ y $\alpha 2\beta 1$ (Figura 2). Esto podría explicar al menos parcialmente por qué los ratones deficientes en $\alpha 2\beta 1$, a pesar de una adhesión plaquetaria inalterada en los sitios de lesión arterial, exhiben defectos parciales en la formación de trombos oclusivos. Además de los colágenos, el plasma coagulante estimula fuertemente la actividad procoagulante de las
35 plaquetas por un mecanismo dependiente de la integrina $\alpha 11\beta 3$. En los presentes experimentos, el bloqueo de $\alpha 11\beta 3$ inhibían prácticamente por completo la participación de las plaquetas en la coagulación dependiente de FXII, lo que indicaba que la actividad anticoagulante bien conocida de los antagonistas de $\alpha 11\beta 3$ puede estar basada en parte en el inhibidor del camino intrínseco de la coagulación impulsado por FXII. En su conjunto, la presente invención indica que el sistema de contacto impulsado por FXII y la activación de las plaquetas pueden ser procesos mutuamente dependientes que cooperan en la formación patológica de los trombos.

Basándose en los resultados experimentales, se propuso un modelo de formación patológica de trombos que se representa esquemáticamente en la Figura 7. En los sitios de lesión vascular, la primera capa de plaquetas entra en
45 contacto con los colágenos en un ambiente que está enriquecido adicionalmente en TF y fibrina. Por esta razón, no es sorprendente que la adhesión de las plaquetas a la pared deteriorada del vaso no se vea empeorada en los ratones FXII $^{-/-}$ y es muy probable que estas células estuvieran activadas completamente y en un estado procoagulante. En cambio, en un trombo en crecimiento están ausentes los colágenos y las concentraciones de TF proporcionadas por microvesículas pueden ser menores en comparación con la pared del vaso y con actividad reducida por el TFPI liberado en grandes cantidades por las plaquetas activadas. En estas condiciones, se requieren
50 mecanismos adicionales para mantener la generación espacio-temporal de trombina a fin de activar plaquetas nuevamente reclutadas y, provocar su actividad coagulante por la vía de la formación de fibrina. La incapacidad acusada de los ratones FXII $^{-/-}$ para establecer trombos estables demuestra inequívocamente que el camino intrínseco de la coagulación impulsado por FXII es un factor esencial en este proceso. Junto con la observación de que los ratones con TF bajo exhiben también trombosis arterial deficiente, estos resultados sugieren que ambos
55 caminos extrínseco e intrínseco tienen que ser operativos y actuar sinérgicamente para promover la formación de un trombo tridimensional y finalmente oclusivo. En contraste, la falta de hemorragias de los ratones FXII $^{-/-}$ indica que el crecimiento de los trombos en la tercera dimensión puede no ser necesario para sellar un orificio en la pared del vaso. Esto podría explicar por qué el camino extrínseco, que produce la primera capa delgada de fibrina y plaquetas activadas, es suficiente para mediar la hemostasis normal. Los resultados obtenidos por los autores de la invención plantean la posibilidad interesante de que la formación de un trombo tridimensional atiende a funciones distintas de
60 la hemostasis. Éstas podrían incluir la detención del flujo sanguíneo en ciertas áreas de traumatismos tisulares a fin de prevenir la distribución de patógenos invasores o toxinas en el torrente sanguíneo.

Procedimientos Experimentales

Animales

- Todos los experimentos y cuidados fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales local. Se produjeron mutantes clásicos de ratón que carecían del factor XI (FXI^{-/-}), factor XII (FXII^{-/-}), integrina $\alpha 2$ ($\alpha 2$ ^{-/-}) como se ha descrito (Gailani, D., Lasky, N.M., y Broze, G.J., Jr. (1997). Un modelo murino de deficiencia en el factor XII. Blood Coagul. Fibrinolysis 8, 134-144; Pauer, H.U., Renne, T., Hemmerlein, B., Legler, T., Fritzlar, S., Ad-ham, I., Muller-Esterl, W., Emons, G., Sancken, U., Engel, W., and Burfeind, P. (2004). Delección deliberada del factor XII de la coagulación murino, un modelo para activación in vivo de la fase de contacto. Thromb. Haemost. 92, 503-508; Holtkotter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Muller, W., Hafner, M., Schulte, V., Krieg, T., and Eckes, B. (2002). Los ratones deficientes en integrina alfa 2 se desarrollan normalmente, y son fértiles, pero exhiben interacción parcialmente deficiente de las plaquetas con el colágeno. J. Biol. Chem. JID - 2985121 R277, 10782-10794). Como control se utilizaron ratones C57B/6J (FXI^{-/-}) o Sv129 (FXII^{-/-}). Ratones deficientes en la cadena FcR γ (Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., y Ravetch, J.V. (1994). La delección de la cadena FcR gamma da como resultado defectos pleiotrópicos en las células efectoras. Cell 76, 519-529) eran de: (Taconics, Germantown).

Generación de anticuerpos anti-FXII

- Se aisló el RNA celular total del hígado de un ratón 129sv tipo salvaje y se realizó la síntesis FXII-cDNA con el "Kit RT-PCR de un solo paso" de Qiagen de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La cadena pesada del factor FXII (posiciones 61-1062, correspondientes a los residuos 21-354) se amplificó utilizando 25 pmoles de cada uno de los cebadores 5 y 3 (ttgatccccaccatggaagaactccaag y ttgaattcgcgatgaacgaggaca g) introduciendo un sitio de restricción BamHI y EcoRI, respectivamente con el protocolo siguiente: 30 s a 95°C, 60 s a 58°C y 1 min a 72°C durante 30 ciclos en un ciclador térmico (Biometra, Göttingen, Alemania). El producto PCR se clonó en el sitio BamHI y EcoRI del vector de expresión pGEX-2T (Pharmacia). Después de la secuenciación, la proteína se expresó en la cepa BL21 de E. coli. Las bacterias que crecían exponencialmente se estimularon con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido 0,5 mM durante 1 h, se cosecharon, se suspendieron de nuevo en Tris-HCl 10 mM, de pH 7,4, que contenía EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, 10 μ g/ml de hidrocloreuro de benzamidina, 10 μ g/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y se trataron por ultrasonidos durante 3 min en pulsos de 15 s cada uno. Después de centrifugación a 15.000 x g durante 20 min a 4°C, se retiró el sobrenadante y se transfirió a una columna de GST-Sepharose (Pharmacia) para purificación. La proteína eluida tenía una pureza > 95% como se deducía de la SDS-PAGE teñida con Coomassie. Se generaron anticuerpos policlonales contra la cadena pesada de GST FXII en conejos siguiendo procedimientos estándar. Se seleccionaron anticuerpos a partir del suero hiperinmune utilizando columnas con cadena pesada de FXII fusionada a la proteína de fijación de maltosa (MBP). Estas proteínas de fusión se expresaron y purificaron utilizando el sistema de expresión pMAL-c2 y columnas de resina de amilosa análogamente a lo descrito para el constructo de fusión GST.

Preparación de las plaquetas

- Los ratones se sangraron bajo anestesia con éter desde el plexo retroorbital. Se recogió la sangre en un tubo que contenía 20 U/ml de heparina, y se obtuvo plasma rico en plaquetas (prp) por centrifugación a 300 g durante 10 min a la temperatura ambiente (RT). Para las plaquetas lavadas, se centrifugó prp a 1000 g durante 8 min y se resuspendió el pellet dos veces en tampón Tyrodes-Hepes modificado (NaCl 134 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, KCl 2,9 mM, NaHCO₃ 12 mM, Hepes 20 mM, glucosa 5 mM, 0,35% de seroalbúmina bovina, pH 6,6) en presencia de prostaciclina (0,1 μ g/ml) y apirasa (0,02 U/ml). Las plaquetas se resuspendieron luego en el mismo tampón (pH 7,0, 0,02 U/ml de apirasa) y se incubaron a 37°C durante al menos 30 min antes del análisis.

Citometría de flujo

- Se diluyó sangre entera heparinizada en ratio 1:20 con tampón Tyrode-HEPES modificado (NaCl 134 mM, Na₂HPO₄ 0,34 mM, KCl 2,9 mM, NaHCO₃ 12 mM, HEPES [ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico] pH 7,0) que contenía glucosa 5 mM, 0,35% de seroalbúmina bovina (BSA), y CaCl₂ 1 mM. Las muestras se incubaron con anticuerpos marcados con fluoróforo durante 15 minutos a la temperatura ambiente y se analizaron directamente en un FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) (Nieswandt, B., Schulte, V., y Bergmeier, W. (2004). Análisis citométrico de flujo de la función plaquetaria del ratón. Methods Mol. Biol. 272, 255-268).

Agregometría

- Para determinar la agregación de las plaquetas, se midió la transmisión de la luz utilizando prp (200 μ l con 0,5 x 10⁶ plaquetas/ μ l). La transmisión se registró en un agregómetro FibrinTimer de 4 canales (APACT Laborgeräte und Analysensysteme, Hamburgo, Alemania) durante 10 min y se expresó como unidades arbitrarias con 100% de transmisión ajustada con plasma. La agregación plaquetaria se indujo por adición de colágeno (10 μ g/ml) y ADP (5 μ M).

Experimentos de tiempo de hemorragia

- Se anestesiaron ratones por inyección intraperitoneal de tribromoetanol (Aldrich) (0,15 ml/10 g de peso corporal) y se cortó un segmento de 3 mm de la punta de la cola con un escalpelo. Se monitorizó la hemorragia de la cola absorbiendo suavemente el glóbulo de sangre con un papel de filtro sin contacto con el sitio de la herida. Cuando no se observó más sangre en el papel después de intervalos de 15 segundos, se determinó que había cesado la hemorragia. Cuando fue necesario, se detuvo la hemorragia manualmente después de 20 minutos. En caso indicado, se trataron los ratones con 100 µg/ratón de hFXII.

Preparación de las plaquetas para microscopía intravital

- Se analizó la sangre de ratón (1 vol) en 0,5 vol de tampón Hepes que contenía 20 U/ml de heparina. La sangre se centrifugó a 250 g durante 10 minutos y el plasma rico en plaquetas se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo. Las plaquetas se marcaron con 5-carboxifluoresceína-diacetato-succinimidil-éster (DCF) y se ajustaron a una concentración final de 200×10^6 plaquetas/250 µl (Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F., and Hofmann, F. (1999). Adhesión y agregación incrementadas de plaquetas que carecen de guanosina-3',5'-monofosfato-quinasa cíclica I. J. Exp. Med 189, 1255-1264).

Modelo de trombosis in vivo con lesión inducida por FeCl₃.

- Ratones macho y hembra en la edad de 4-5 semanas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 2,2,2-tribromoetanol y 2-metil-2-butanol (Sigma) (0,15 ml/10 g de peso corporal de una solución al 2,5%). Se inyectaron por vía intravenosa plaquetas marcadas fluorescentemente. Se exteriorizó cuidadosamente el mesenterio a través de una incisión abdominal en la línea media. Se visualizaron las arteriolas (35-50 µm de diámetro) con un microscopio invertido Zeiss Axiovert 200 (x 10) equipado con una fuente de lámpara fluorescente HBO de 100 vatios y una cámara CCD (CV-M300) conectada a una videgrabadora S-VHS (AG-7355, Panasonic, Matsushita Electric, Japón). Después de aplicación tópica de FeCl₃ (20%) que inducía la lesión del vaso y la denudación del endotelio, se monitorizaron las arteriolas durante 40 min o hasta que se produjo la oclusión completa (detección del flujo sanguíneo durante > 1 min). Se determina la adhesión firme de las plaquetas como número de plaquetas marcadas fluorescentemente que se depositan en la pared del vaso hasta 5 minutos después de la lesión, caracterizándose el trombo como un agregado de plaquetas en un diámetro mayor que 20 µm, y caracterizándose el tiempo de oclusión del vaso como el tiempo requerido para que la sangre deje de fluir durante al menos 1 minuto. En todos los experimentos, se seleccionaron como máximo 2 arteriolas de cada ratón basándose en la calidad de exposición. Se estudiaron un total de 17 arteriolas de tipo salvaje, 14 FXII^{-/-} y 9 FXI^{-/-} arteriolas.

Microscopía intravital - arteria carótida

- La microscopía intravital de la arteria carótida lesionada se realizó esencialmente como se ha descrito (Massberg, S., Gawaz, M., Gruner, S., Schulte, V., Konrad, I., Zohlnhofer, D., Heinzmann, U., y Nieswandt, B. (2003). Un papel crucial de la glicoproteína VI para reclutamiento de plaquetas a la pared arterial lesionada in vivo. J Exp Med JID - 2985109R 197, 41-49). Resumidamente, se anestesiaron ratones por inyección intraperitoneal de ketamina/xilazina (ketamina 100 mg/kg, Parke-Davis, Karlsruhe, Alemania; xilazina 5 mg/kg, Bayer AG, Leverkusen, Alemania). Se implantaron catéteres de polietileno (Portex, Hythe, Inglaterra) en la vena yugular derecha y se infundieron por vía intravenosa plaquetas fluorescentes (200×10^6 /250 µl). Se indujo lesión carotídea para denudación endotelial por ligación fuerte. Antes de y después de la lesión vascular, se visualizaron in situ las plaquetas fluorescentes por videomicroscopía in vivo de la arteria carótida común derecha utilizando un microscopio Zeiss Axiovert (objetivo de inmersión en agua 20x, W20x/0,5, Zeiss, Göttingen, Alemania) con una lámpara de mercurio HBO de 100 vatios para epi-iluminación. La adhesión plaquetaria y la formación de trombos se registró durante 5 minutos después de la inducción de la lesión, y las imágenes grabadas en videocinta se evaluaron utilizando un programa de análisis de imágenes asistido por computadora (Visitron, Munich, Alemania).

Tromboembolismo pulmonar

- Los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 2,2,2-tribromoetanol y 2-metil-2-butanol (Aldrich) (0,15 ml/10 g de peso corporal de solución al 2,5%). Los ratones anestesiados recibieron una mezcla de colágeno (0,8 mg/kg) y epinefrina (60 µg/kg) inyectada en la vena yugular. Las incisiones de los ratones supervivientes se cosieron, y se dejó que se recuperaran los animales. Se analizaron estudios de necropsia e histológicos sobre pulmones fijados en formaldehído al 4% y las secciones en parafina se tiñeron con hematoxilina/eosina.

Recuento de plaquetas

- El recuento de plaquetas se determinó por citometría de flujo en un FACScalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania). Los resultados se expresan como valor medio ± S.D. o como porcentaje del control (wt, n = 19; FXII^{-/-}, n = 14 y FcRγ^{-/-}, n = 5).

Tiempo de oclusión

La cavidad abdominal de los ratones anestesiados se abrió longitudinalmente y se preparó la aorta abdominal. Se colocó una sonda de flujo ultrasónica alrededor de la aorta y se indujo trombosis por una compresión fuerte con un fórceps. Se monitorizó el flujo sanguíneo hasta que se produjo la oclusión completa. El experimento se interrumpió manualmente después de 45 minutos. En caso indicado, se sustituyó el factor XII humano por vía intravenosa inmediatamente antes del experimento.

Análisis Histopatológico

Se sacrificaron los ratones, se extirparon rápidamente los pulmones y se fijaron a 4°C durante 24 h en formalina al 4% tamponada (pH 7,4; Kebo). Se deshidrataron los tejidos y se incrustaron en parafina (Histolab Products AB), se cortaron en secciones de 4 µm, y se montaron. Después de retirada de la parafina, los tejidos se tiñeron con hematoxilina Mayers (Histolab Products AB) y eosina (Surgipath Medical Industries, Inc.).

Electroforesis en Gel de SDS-poliacrilamida, Transferencia Western, e Inmunoimpresión

Se separó el plasma (0,3 µl/pista) por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% (p/v) en presencia de 1% (p/v) de SDS (Laemmli, 1970). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 30 min a 100 mA. Las membranas se bloquearon con PBS que contenía 4% (p/v) de leche en polvo seca y 0,05% (p/v) de Tween-20, pH 7,4. Las membranas se sondaron con 0,5 µg/ml del anticuerpo monoclonal contra MBK3 (Haaseman J. Immunology 1988). Los anticuerpos fijados se detectaron utilizando anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa contra IgG de ratón (dilución 1:5000) seguido por un método de detección por quimioluminiscencia.

Ensayos de coagulación

Para la determinación del tiempo de coagulación por recalcificación, se incubaron 100 µl de plasma de ratón anticoagulado con citrato (0,38% citrato de sodio), con 100 µl de cada uno de colágeno tipo Horm (Nycomed, Munich, Alemania), ácido elágico, sulfato de condroitina (ambos de Sigma), caolín o tampón (concentraciones finales 30 µg/ml) durante 120 s a 37°C en un "Coagulómetro de bolas" KC10 (Amelung, Lemgo, Alemania). Para testar el efecto de la activación de las plaquetas sobre la coagulación dependiente de FXII, las plaquetas lavadas se resuspendieron en tampón Tyrode que incluía Ca²⁺ 4 mM y ionóforo Ca²⁺ A23187 5 µM (Sigma) durante 10 min antes de la adición al plasma exento de plaquetas. La formación del coágulo se inició por recalcificación con 100 µl de solución de CaCl₂ 25 mM, registrándose el tiempo hasta la formación del coágulo utilizando el cronómetro de coagulación AC4 (Amelung).

Análisis de la coagulación

Se determinaron parámetros de coagulación globales y simples con un sistema automático de coagulación de la sangre (BCS, Dade Behring) con reactivos Dade Behring de acuerdo con los protocolos para muestras humanas detallados por el fabricante. Los principios de los protocolos de ensayo BCS están disponibles en los prospectos de paquetes Dade Behring, que pueden encontrarse en el sitio web de Dade Behring (<http://www.dade-behring.com>). Se midieron los dímeros D con el ELISA de Asserachrom (Roche). Se determinaron los recuentos de sangre periférica en el equipo Sysmex XE 2100 de acuerdo con protocolos estándar.

35 Medidas de trombina

La generación de trombina se midió de acuerdo con el método de Aronson et al. (Circulation, 1985), con ligeras modificaciones. Se pusieron partes alícuotas de plasma rico en plaquetas o exento de plaquetas (0,5 ml) en tubos de polipropileno con fondo redondo que se recubrieron con colágeno tipo Horms (100 µg/ml, 24 h, 4°C), y se añadieron 20 µl de Ca²⁺ 1 M para iniciar la coagulación. Se añadieron las muestras (10 µl) a los pocillos de una placa de microtitulación que contenían 90 µl de citrato de sodio al 3,8% a intervalos de 2,5-10 minutos durante 60 min. El color se desarrolló durante 2 min por la adición de 50 l de S-2238 de 2 mmoles/l (H-D-Phe-Arg-NH-NO₂-HCl, un sustrato específico de trombina; Chromogenix, Mölndal, Suecia) en 1 mol/litro de Tris (pH 8,1). La absorbancia del producto coloreado liberado se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm utilizando un lector de placas de microtitulación Vmax (Easy Reader, EAR 340AT, SLT Lab Instruments GmbH, Viena, Austria).

45 Las medidas se obtuvieron por triplicado en cada punto.

Evaluación estadística

El análisis estadístico se realizó utilizando el test de Student no apareado.

REIVINDICACIONES

1. Al menos un anticuerpo anti-factor XII/XIIa para uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo constituido por formación de trombos venosos o arteriales por prevención de la formación y/o la estabilización de trombos patológicos y con ello el crecimiento de trombos tridimensionales intraluminales relacionado con dicho trastorno.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo anti-FXII.
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho anticuerpo inhibe la activación de FXII.
4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dicho anticuerpo inhibe FXIIa.
5. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la formación de trombos venosos o arteriales es un derrame cerebral o infarto de miocardio.

Figura 1

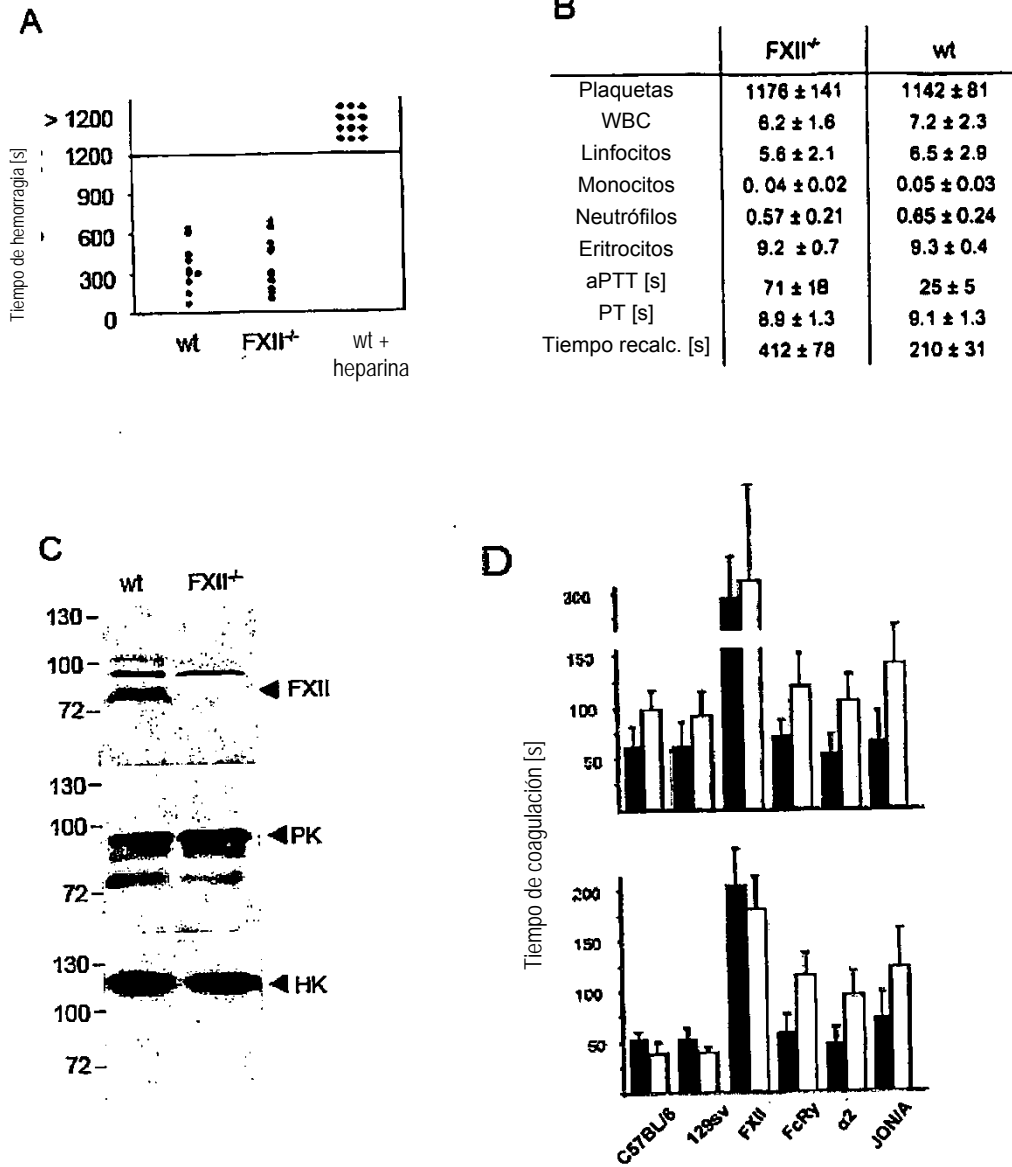


Figura 2

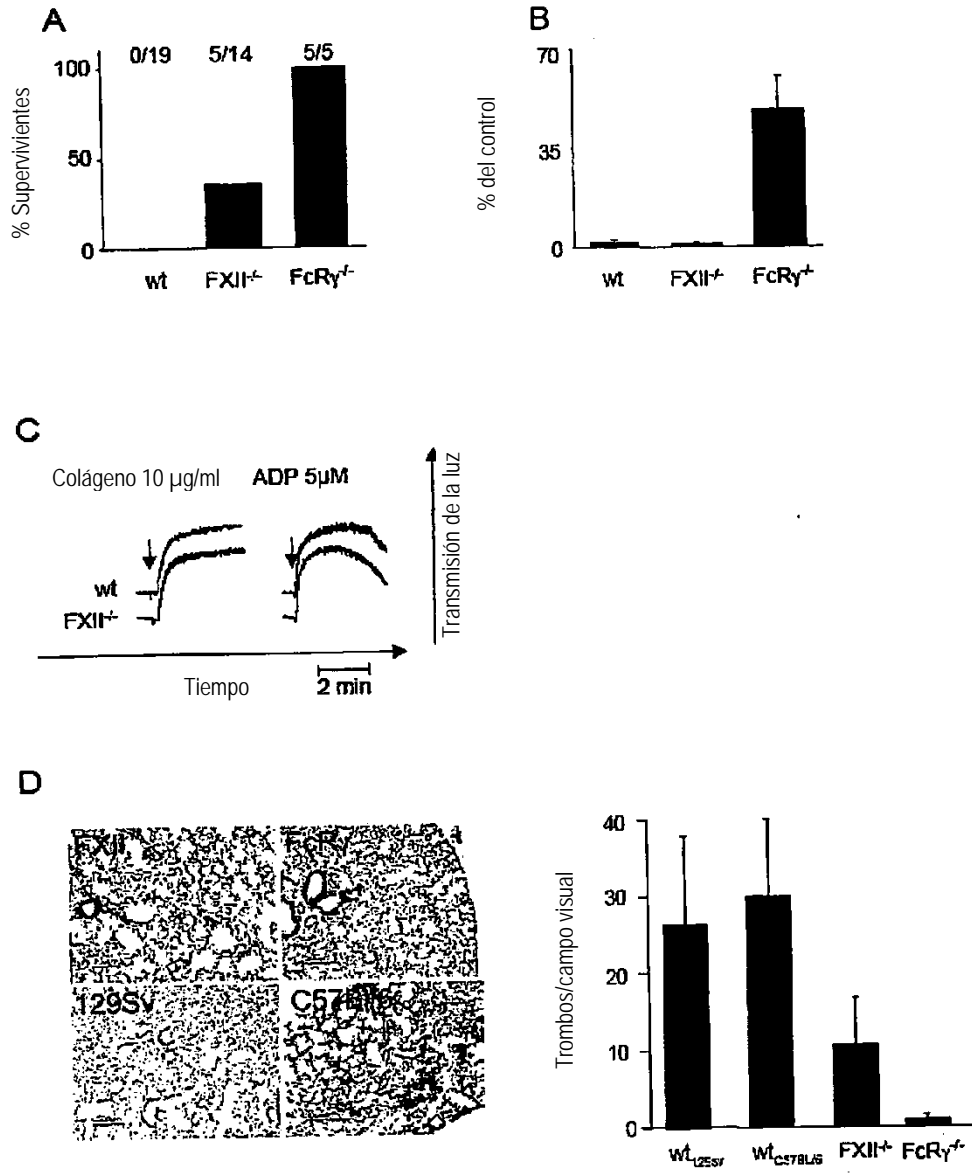


Figura 3

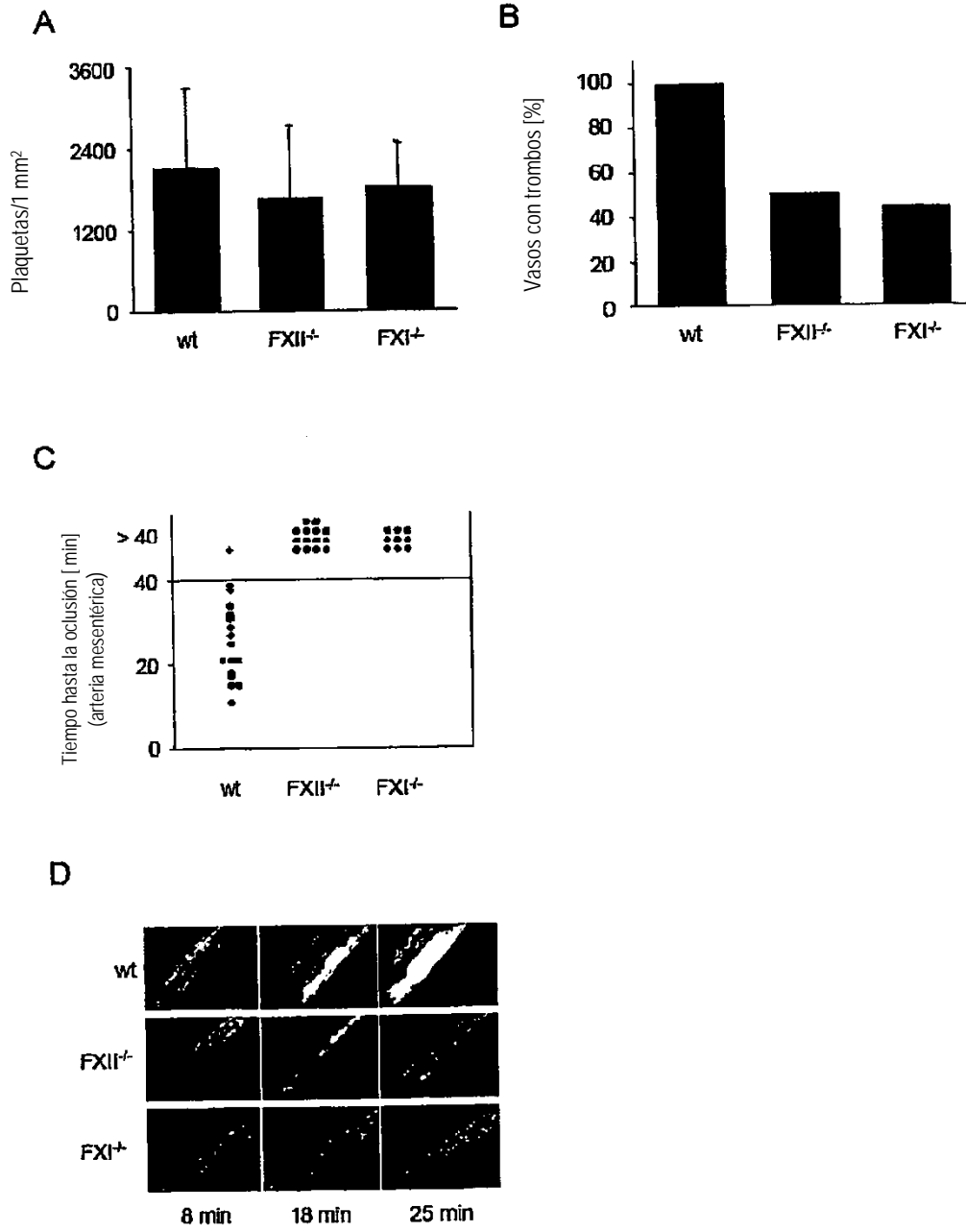


Figura 4

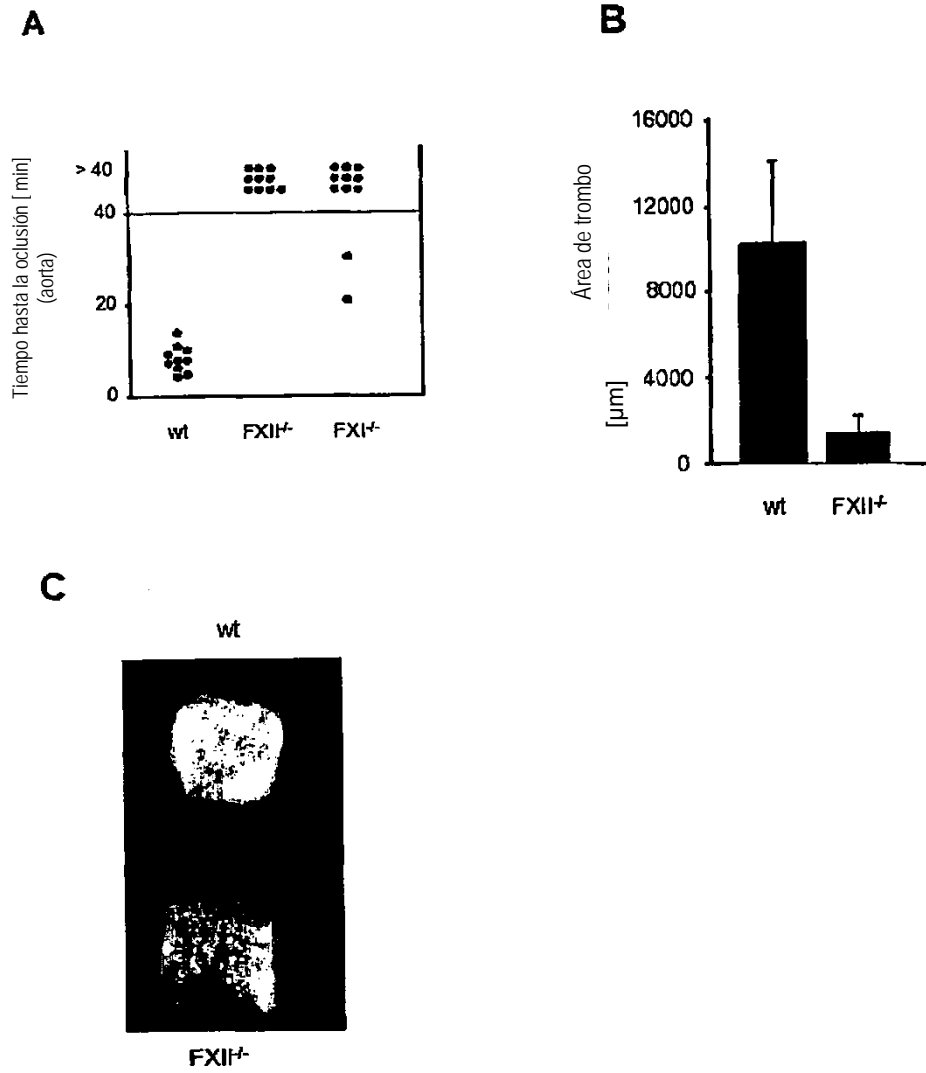


Figura 5

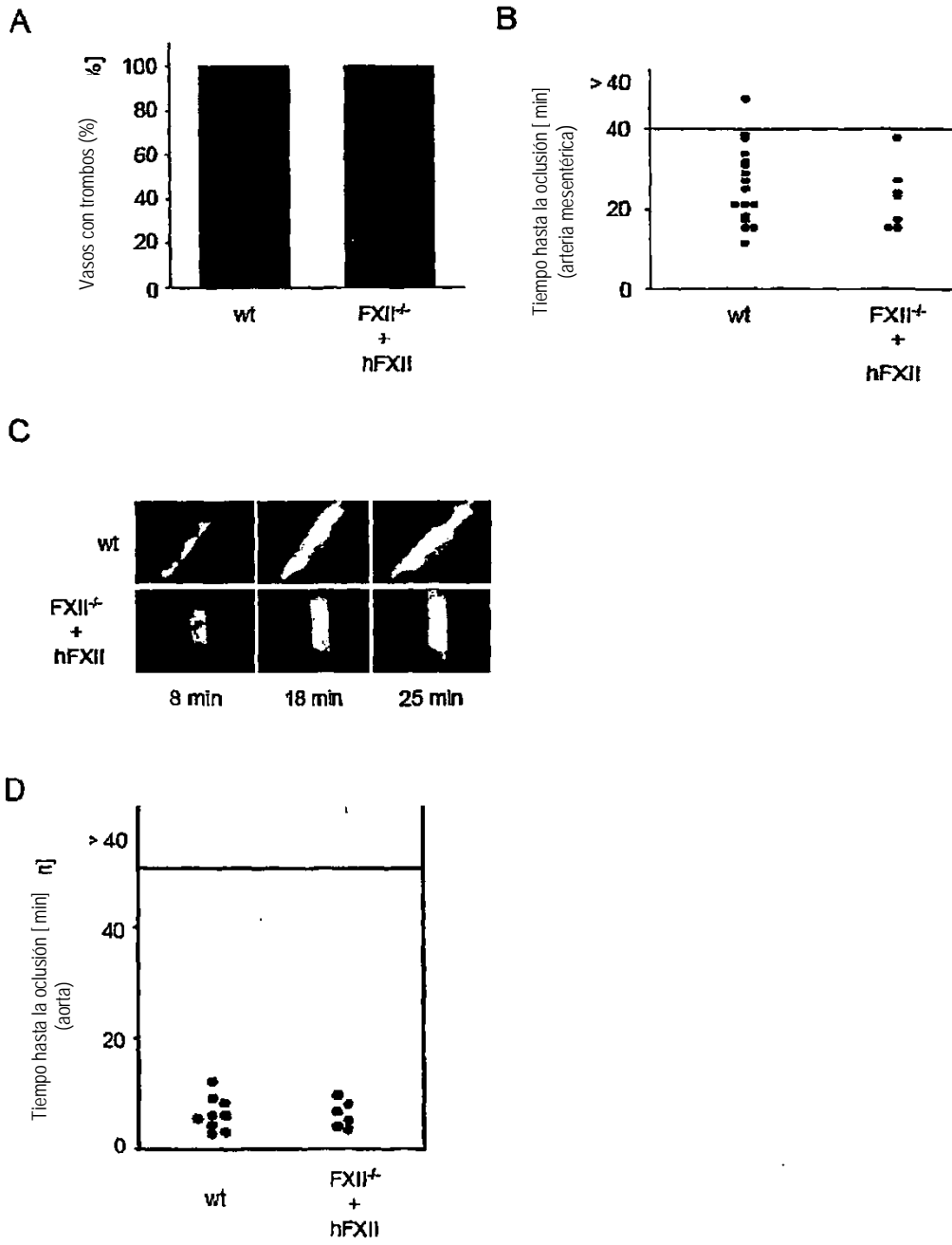


Figura 6

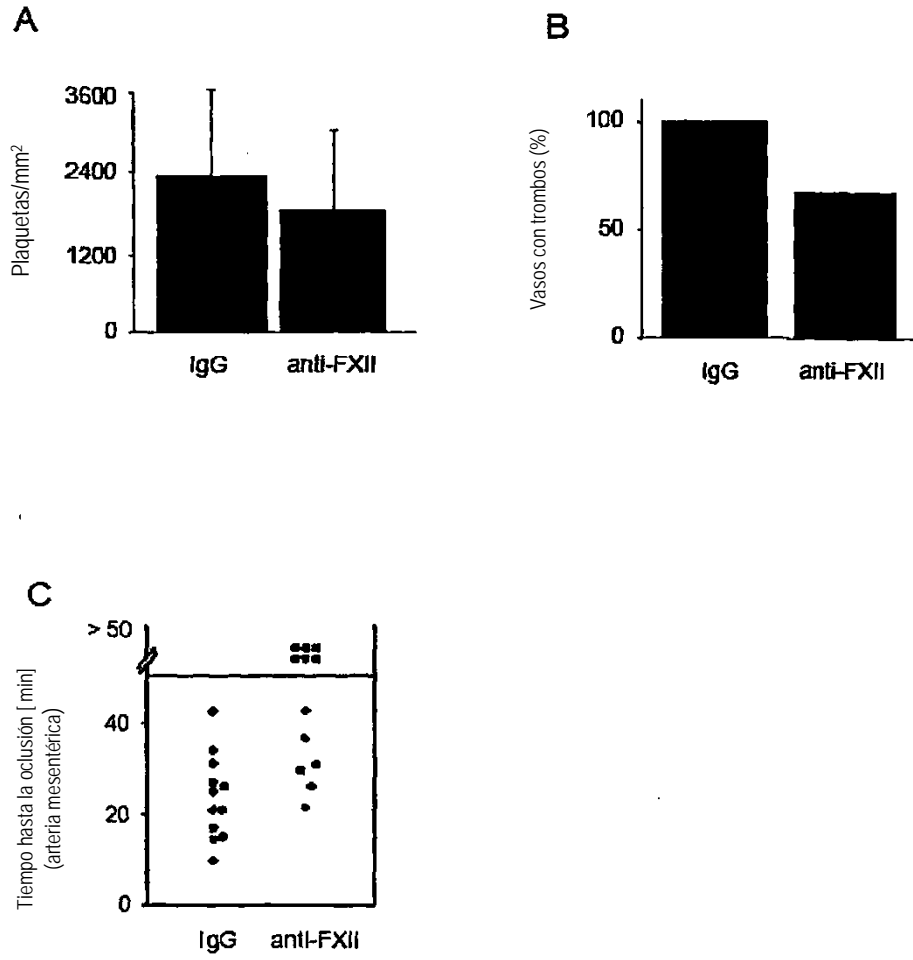
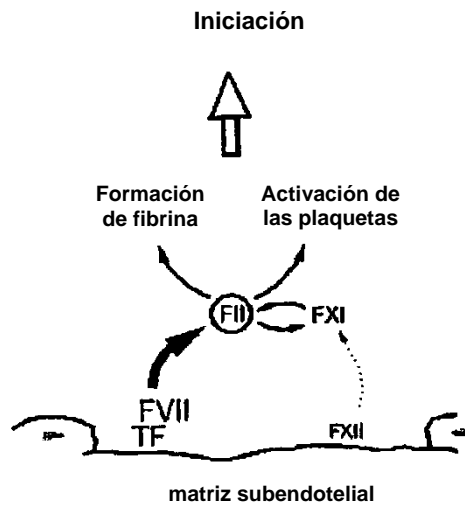


Figura 7

A



B

