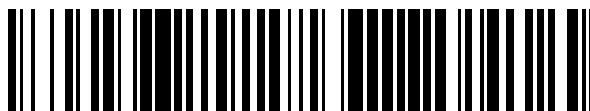


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 717**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 41/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2009 E 09715588 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2252324**

54 Título: **Fosfatasa alcalina para aumentar la actividad del sistema inmune en un mamífero con riesgo de enfermedades inflamatorias**

30 Prioridad:

29.02.2008 WO PCT/EP2008/001767

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

05.09.2013

73 Titular/es:

**ALLOKSYS LIFE SCIENCE B.V. (100.0%)
Gildenbring 74
3981 JG Bunnik, NL**

72 Inventor/es:

BRANDS, RUDI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 421 717 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

Fosfatasa alcalina para aumentar la actividad del sistema inmune en un mamífero con riesgo de enfermedades inflamatorias

5 La presente invención se refiere a la profilaxis de mamíferos, y especialmente mamíferos humanos, con riesgo de afecciones y enfermedades inflamatorias como consecuencia de una intervención quirúrgica.

Las fosfatasas son un grupo de enzimas capaces de desfosforilar o fosforilar un sustrato, es decir, la enzima hidroliza los monoésteres del ácido fosfórico en un ion fosfato y una molécula con un grupo hidroxilo libre o viceversa.

10 Las ectofosfatasas son una subclase de las fosfatasas que funcionan extracelularmente, es decir, son capaces de desfosforilar un sustrato extracelular en el espacio extracelular. Esto contrasta con las fosfatasas intracelulares (también denominadas quinasas) que (des)fosforilan un sustrato intracelular dentro de la célula, es decir, en el espacio intracelular. Las fosfatasas intracelulares están a menudo involucradas en la transducción de señales.

15 Las ectofosfatasas pueden estar en forma de proteínas integrales de membrana o de proteínas ancladas a GPI que exhiben su dominio catalítico, es decir, el dominio implicado en la desfosforilación real de un sustrato, al espacio extra-celular. Como alternativa, las ectofosfatasas pueden estar presentes en el espacio extracelular como proteínas de secreción o solubles.

20 Se ha publicado que las ectofosfatasas, y especialmente las fosfatasas alcalinas (también denominadas en la técnica como AP, ALP o Aphos), están implicadas en la atenuación de ataques inflamatorios a través de su actividad fosfatasa en sustratos tales como, entre otros, endotoxinas y nucleótidos. Otras ectofosfatasas, como CD39 y CD73 (nucleotidasas, apirinas), están implicadas en la prevención de la trombólisis.

La fosfatasa alcalina (ALP) (EC 3.1.3.1) es una enzima hidrolasa responsable de la eliminación de grupos fosfato de muchos tipos de moléculas, incluyendo nucleótidos, proteínas, y alcaloides. Como su propio nombre indica, las fosfatasas alcalinas son más eficaces en un medio alcalino.

25 En humanos, las ectofosfatasas, como la fosfatasa alcalina, están presentes en todos los tejidos por todo el cuerpo, pero se concentran sobre todo en el hígado, vías biliares, riñón, hueso y placenta.

Las especies conocidas de fosfatasas alcalinas son, por ejemplo, fosfatasa alcalina bacteriana (BAP), fosfatasa alcalina de camarón (SAP), fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP), fosfatasa alcalina de intestino bovino (bIAP), y fosfatasa alcalina de placenta (PLAP) y su versión con el extremo C terminal truncado que carece de los últimos 24 aminoácidos (que constituyen el dominio de transmembrana) fosfatasa alcalina secretada (SEAP).

30 Las fosfatasas alcalinas humanas se clasifican en fosfatasas alcalinas no específicas de tejido (también conocidas como TNSAP o de tipo óseo / de hígado / de riñón) y fosfatasas alcalinas específicas de tejido (del tipo placentaria / intestinal y de células germinales). Al tipo TNSAP también pertenecen, por ejemplo, la fosfatasa alcalina presente en la leche y la expresada por los glóbulos blancos de la sangre.

35 La ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 1, también denominada en la técnica como CD39 o apirasa, es una enzima de metabolización de nucleótidos que pertenece a una familia de hidrolasas anhídrido ácido. Ejemplos de otras enzimas que pertenecen a esta familia son la GTP fosfohidrolasa, pirofosfatasa y tiamina-trifosfatasa.

La ectofosfatasa fue identificada por primera vez en 1949 y en 1963 fue parcialmente purificada a partir de la patata. La enzima también se identifica por su número de registro EC 3.6.1.5.

40 Las apirinas son glicoproteínas de transmembrana de origen natural que pueden activar las rutas intracelulares por activación. Las apirinas se encuentran en un gran número de especies microbianas tales como *E. coli*, *Aspergillus fumigatus* y *Kluyveromyces lactis*, en plantas tales como *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, y *Oryza sativa*, en insectos tales como *Drosophila melanogaster* y en mamíferos tales como *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*.

45 Una enzima apirasa comprende tres dominios, un dominio extracelular, uno de transmembrana y uno intracelular. El dominio extracelular comprende una región catalítica conservada responsable de la actividad catalítica de la enzima extracelular.

50 El dominio catalítico cataliza la hidrólisis de ATP para producir AMP y ortofosfato. Tal actividad por lo tanto se puede caracterizar como ATP-difosfatasa o ATP difosfohidrolasa. También puede actuar sobre el ADP, de nuevo produciendo AMP y ortofosfato. Esta actividad se puede caracterizar como ADPasa o ADP fosfohidrolasa. Basándose en las actividades enzimáticas combinadas del dominio catalítico, la enzima también puede ser considerada como una ATP-ADPasa.

Las funciones fisiológicas de las apirinas referidas se dirigen a su posible participación en el mantenimiento de la hemostasia y a la inhibición de la agregación plaquetaria a través de la hidrólisis de ADP extracelular, que se libera a partir de trombocitos activados después de una lesión vascular.

5 La CD73, también una ectofosfatasa, convierte nucleótidos monofosfato como AMP en nucleosina + fosfato. (La nucleosina no es inflamatoria, mientras que el ATP y el ADP y, en menor grado AMP son restos proinflamatorios, una vez presentados extracelularmente.

La patente WO2005/074978 describe el uso de fosfatasa alcalina para evitar los efectos inflamatorios de los LPS en el recubrimiento mucoso de la cavidad corporal de los mamíferos. Con este fin, la fosfatasa alcalina se administra por vía oral.

10 La patente WO2007/055760 describe una composición proteica que comprende una combinación de lactoferrina y fosfatasa alcalina. La composición se describe como adecuada en el tratamiento de células epiteliales dañadas o no dañadas, mediante estimulación de la proliferación o inhibición de la muerte celular.

15 La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que, además de las actividades de las ectofosfatasas referidas anteriormente, este grupo de enzimas fosfatasas también es capaz de modular la actividad del sistema inmune, es decir, son capaces de aumentar, mantener, estimular, o prevenir el deterioro de un sistema inmune comprometido.

20 Dicho sistema inmune comprometido puede ser, por ejemplo, consecuencia de una operación quirúrgica, de enfermedades del sistema digestivo, enfermedades respiratorias, enfermedades de la piel, heridas por quemaduras, inhalación de humo, intoxicación, pérdida de sangre severa, intoxicación alimentaria, quimioterapia, radioterapia, trauma severo y enfermedades del hígado.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una fosfatasa alcalina para el uso tal y como se define en la reivindicación adjunta.

25 El término "profilaxis", tal y como se utiliza en presente invención, se utiliza para indicar una medida que se toma para evitar una enfermedad o afección, en el presente caso evitando el progreso o el inicio de una enfermedad inflamatoria.

En consecuencia, el presente uso de fosfatasa alcalina se refiere a la administración del medicamento presente a un mamífero, y especialmente a un mamífero humano, que sufre o tiene riesgo de una enfermedad inflamatoria, evitando de este modo, o atenuando, una afección inflamatoria o el tratamiento de la misma cuando se considere oportuno.

30 Se ha descrito anteriormente que el uso de suplementos de ectofosfatasas como tratamiento profiláctico da como resultado niveles de citoquinas proinflamatorias reducidos en varios modelos de inflamación animales. La presente invención demuestra que utilizando suplementos de fosfatasa alcalina en pacientes sometidos a cirugía no sólo se observan tales respuestas antiinflamatorias, sino que también se evoca una inducción de una fosfatasa alcalina endógena secundaria que se inhibe por L-HA (L-homo arginina), que se sabe que actúa como inhibidora AP no específica de tejido.

Se administró por vía intravenosa un bolo de AP (bIAP), seguido de una infusión intravenosa de 36 horas (5,6 IU/kg/hora) a los pacientes con resultado de un pico de niveles de plasma de AP inmediatamente posterior a la administración con un perfil cinético compatible con la AP administrada.

40 Sorprendentemente, sin embargo, la AP endógena que aparece es una AP con un perfil cinético que tiene un tiempo de residencia de plasma total observado del orden de aproximadamente 20-22 horas. Este tipo fosfatasa inducida es sensible a homocisteína-1 y por consiguiente es más probablemente una AP no específica de tejido (por ejemplo, de tipo hígado). Otra enzima fosfatasa alcalina TNSAP candidata (tipo de óseo) no se mostró inducida.

45 Por lo tanto, cuando se describe la administración de AP durante la inflamación aguda para combatir la inflamación local o sistémica e inducida por endotoxina y por otros sustratos que contienen fosfatos, la profilaxis con AP mejora la defensa frente a una nueva agresión inflamatoria mediante la activación de la liberación de fosfatasas alcalinas que se mantienen en circulación.

La implicación sorprendente de ésta proporciona, entre otras, las siguientes ventajas:

- AP actúa como una proteína de fase aguda, donde los niveles altos de AP fisiológicamente activa tienen un efecto antiinflamatorio de protección;

50 - Los niveles plasmáticos prequirúrgicos favorecen el resultado clínico en la inflamación aguda;

- Los pacientes que sufren o están en riesgo de afecciones/enfermedades inflamatorias están protegidos por el pre-tratamiento o tratamiento con la AP activa fisiológicamente, que elevará sus niveles fisiológicos endógenos

5 - El retratamiento con un suplemento de AP durante la cirugía o en momentos puntuales después de la cirugía prolongará la inducción de la fosfatasa alcalina endógena. De esta manera se prolongan los efectos antiinflamatorios de la fosfatasa alcalina

Según la presente invención, la profilaxis se produce por una inducción de los niveles de ectofosfatasa endógenos, es decir, un aumento en los niveles de ectofosfatasa producidos por los propios mamíferos y no producidos por una fuente heteróloga tal como, por ejemplo, la administración de un suplemento de fosfatasa alcalina adicional.

10 A continuación, se expondrá con mayor detalle la presente invención con los ejemplos siguientes en donde se hace referencia a las figuras adjuntas donde:

Figura 1: muestra la cinética de la fosfatasa alcalina (AP) en un paciente de CABG representativo que reciben AP intestinal bovina durante 36 horas (bolo antes de la cirugía), seguido de una infusión con 5,6 unidades de kilo de peso corporal durante un periodo de 36 horas). Se observa un segundo pico de actividad AP en plasma que aparece entre 1,5 y 12 horas después de la cirugía con tiempo de residencia plasmática prolongado. Se muestra la cinética de la fosfatasa alcalina (AP) en un paciente representativo con placebo para su comparación.

Figura 2: muestra que la fosfatasa alcalina endógena inducida (AP) es del tipo no específica de tejido como lo demuestra la sensibilidad de L-HA del segundo pico. La inducción de AP endógena (máximo en t=4 horas después de la cirugía inicial) después de la administración de suplementos de AP antes de la cirugía. Los efectos de 5 mM de L-HA en AP medidos en el plasma sanguíneo de un paciente con CABG tratado con administración de un suplemento de bIAP.

Figura 3: Niveles promedio de fosfatasas alcalinas, en comparación con el placebo en todos los pacientes evaluados. Se observa que en los pacientes tratados con placebo los niveles circulantes de aphos disminuyen bruscamente a partir de los niveles basales en un 50% aproximadamente.

25 EJEMPLOS

Ejemplo 1

Un bolo de AP (bIAP), seguido de una infusión intravenosa de 36 horas (5,6 IU / kg / hora) se administró por vía intravenosa a los pacientes dando como resultado un nivel máximo de AP en plasma inmediatamente después de la administración con un perfil cinético compatible con la AP administrada. (bIAP, t_{1/2} de aproximadamente 10 minutos).

Haciendo referencia a las **figuras 1 y 3**, se muestra que después de un bolo inicial con fosfatasa alcalina intestinal bovina (bIAP), el nivel plasmático total de fosfatasa alcalina aumenta y, posteriormente, se aclara con rapidez. Sin embargo, se observó un segundo pico entre 1,5 y 35 horas, que alcanza un máximo entre 4-12 horas después de la cirugía.

35 Este segundo pico de la fosfatasa alcalina observado en pacientes tratados con bIAP no es el resultado de la infusión continua de bIAP durante 36 horas ya que la cantidad de Aphos infundida sólo representaría un aumento de los niveles plasmáticos basales normales. El tiempo de residencia en plasma de esta fosfatasa alcalina se prolonga hasta aproximadamente un T_{1/2} de aproximadamente 22 horas, compatible con la fosfatasa alcalina no específica de tejido endógena.

40 En los pacientes tratados con placebo, no se observó ningún aumento en los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina, sino más bien una fuerte disminución de los niveles plasmáticos 1,5 hora después del inicio de la cirugía. A continuación, se observa un retorno lento (aumento) a los niveles normales iniciales durante las horas posteriores (seguimiento durante 35 horas).

45 Es evidente que los niveles plasmáticos de la fosfatasa alcalina endógena caen bruscamente tras la cirugía y se restauran a su debido tiempo. Por lo tanto, se puede afirmar que la fosfatasa alcalina endógena en plasma se "utiliza" durante la cirugía y no se repone de una manera rápida.

Sorprendentemente, se encontró que mediante el uso de suplementos de AP como tratamiento profiláctico en pacientes sometidos a cirugía evoca una inducción de una AP secundaria endógena (**figuras 1 y 3**) que es inhibida por L-HA (L-homo arginina), que se sabe que actúa como un inhibidor de AP no específica de tejido (**figura 2**)

50 La AP endógena que surge es una AP con un perfil cinético que tiene un tiempo total de residencia plasmática aparente del orden de aproximadamente 20-22 horas. Este tipo de fosfatasa inducida era sensible a homoarginina-1 y por consiguiente lo más probable es que sea AP no específica de tejido (por ejemplo, de tipo hígado).

Ejemplo 2

Los resultados anteriores demuestran la conveniencia del tratamiento profiláctico con ectofosfatasa en cirugía inducida por daño por isquemia-reperfusión, trauma, radioterapia, quimioterapia, enfermedad aguda de los viajeros, protección de la salud de los trabajadores, la protección aguda, y aumentar la funcionalidad inmune innato en, por ejemplo, pacientes inmuno comprometidos.

Potenciar la AP endógena a fin de combatir los efectos proinflamatorios aguas abajo del daño local o distante por isquemia-reperfusión mediante la administración parenteral de una formulación adecuada de AP.

La fosfatasa se puede administrar por vía intravenosa. Esta última será oportuna en el caso de una formulación con una alta biodisponibilidad. Como la reacción de potenciación de la fosfatasa endógena muestra una cinética que sugiere la síntesis de novo o retardada de depósitos desconocidos, también serán aplicables formulaciones de "liberación lenta" que liberan su contenido en un plazo de hasta 6 horas, estableciendo de ese modo un nivel de concentración de fosfatasa en circulación que puede actuar como desencadenante de la respuesta de potenciación de la fosfatasa endógena.

Después de la cirugía, los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina endógena caen bruscamente sólo para ser restaurados y regresar a los niveles normales durante un período de tiempo muy por encima del tiempo de la cirugía. A partir de aquí, el suplemento de la fosfatasa alcalina perdida antes o incluso durante la cirugía va a compensar y proteger a los pacientes de una isquemia-reperfusión derivada de una agresión proinflamatoria de "una señal extraña (por ejemplo, endotoxina) o de peligro" (por ejemplo, nucleótidos extracelulares).

Los niveles circulantes suplementarios o la AP expuesta fisiológicamente activa son importantes en afecciones donde no hay disponible suficiente capacidad de unión a endotoxina (no se reivindica).

La suplementación de AP a los pacientes con por ejemplo enfermedad hepática puede ayudar a combatir el SIRS resultante o la endotoxemia. En la Enfermedad Hepática Crónica (CLD) la actividad total de AP en el plasma aumenta con la progresión de la patología. Se observan, por lo tanto cantidades totales de AP cada vez mayores (APhos, ALP), en hepatitis crónica (CH), cirrosis hepática (CH) y carcinoma hepatocelular (HCC). La fuente de este aumento de la AP es diferente. Se observa así un aumento predominante de la AP intestinal de peso molecular alto (HIALP) en LC (aumento de 21,1% a 49,3 del total), mostrando esta AP intestinal menor aumento en CHC.

HIALP es una fosfatasa intestinal que está anclada a GPI y se segrega (se vierte) al plasma y se une a diversas sustancias. En este sentido HIALP refleja precisamente el estado polimérico de AP (ALP5). También en la cirrosis biliar primaria y en la hepatitis autoinmune la cantidad de HIALP es aproximadamente el 44,4% del total.

El aumento de la HIALP intestinal derivada es una consecuencia de la reducción de TNSAP en el plasma, debido al mal funcionamiento del hígado. La diabetes mellitus, la cirrosis hepática, y la insuficiencia renal crónica muestran todas una frecuencia alta de la variante de ALP intestinal de hasta el 45% (23,8% del control). Esta variante ALP intestinal tiene un dominio de unión a membrana.

Hasta cierto punto los LPS se unen y se neutralizan en el plasma. Se ha publicado que los pacientes con enfermedad hepática alcohólica muestran una reducción de la capacidad de unión a endotoxina y la severidad de la enfermedad esta relacionada con la capacidad de hacer frente a la translocación de las endotoxinas derivadas del intestino que entran en circulación. Los factores que pueden unirse y neutralizar las endotoxinas en la sangre son entre otros las lipoproteínas de alta y baja densidad, las proteínas bactericidas/de permeabilidad creciente (BPI) y los anticuerpos antiendotoxina.

Profilaxis: Aplicación en la protección de viajeros/trabajadores de la salud frente a la inflamación intestinal, respiratoria y de la piel.

La administración de fosfatasa al inicio de actividades laborales físicas en ambientes altamente contagiosos (es decir, personal sanitario) puede activar una protección adicional que sea suficiente durante un tiempo limitado. Dado que la actividad de la fosfatasa que se administra por vía parenteral es inmediata, también se puede administrar a los viajeros una dosis parenteral en caso de inflamación debida a una infección aguda.

Dicha dosificación se puede administrar por vía subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Aunque la infección, como tal, no se evitará, las respuestas inflamatorias perjudiciales sistémicas a tales infecciones se pueden combatir más eficazmente (la fosfatasa no actúa como un antimicrobiano, sino que actúa aguas abajo evitando efectos proinflamatorios). Por lo tanto, potenciar la ectofosfatasa endógena con un tiempo de residencia de plasma relativamente estable de 20 a 22 horas protegerá contra la inflamación inducida por patógenos. Junto con una profilaxis con las vacunas apropiadas, antibióticos, antivirales o compuestos anti-fungicos se puede establecer una mejor protección.

La aplicación parenteral de fosfatasa (alcalina) después de un trauma severo (no se reivindica).

Las afecciones traumáticas como la ocasionada por quemaduras graves, inhalación/intoxicación de humo o pérdida de sangre severa o la intoxicación por alimentos grave es una causa directa de inducción de SIRS. Al administrar una fosfatasa se evitan los efectos proinflamatorios perjudiciales aguas abajo de dicha afección traumática potenciando el depósito de fosfatasa endógena fisiológicamente activa, que posteriormente puede actuar evitando la generación de restos proinflamatorios.

La suplementación profiláctica de AP antes de la radiación o de un tratamiento de quimioterapia, con el fin de potenciar la funcionalidad inmune innata (no se reivindica)

La radiación y el tratamiento de quimioterapia están relacionados con la destrucción masiva de los sistemas celulares, lo que conduce al proceso proinflamatorio. También se reduce la resistencia frente la infección y la inflamación posterior. La suplementación con AP antes del tratamiento potenciará la resistencia endógena a la inflamación producida por el tratamiento y por lo tanto va a mejorar la afección y la calidad de vida del paciente afectado.

Ejemplo 3

La fosfatasa alcalina es una enzima ecto-enzima endógena ubicua en el cuerpo humano. Esta ectofosfatasa se expresa ampliamente en muchos órganos que están expuestos directamente o indirectamente al medio externo, como el tracto gastrointestinal y los pulmones.

Se propuso un papel fisiológico de la fosfatasa alcalina en 1997 por Poelstra et al (1). La fosfatasa alcalina desfosforila y por lo tanto desintoxica de las endotoxinas (lipopolisacáridos) a niveles de pH fisiológicos (2;3). Los nucleótidos extracelulares también son sustratos de la fosfatasa alcalina. Estos nucleótidos, normalmente retenidos en el citosol, se liberan al espacio extracelular cuando las células son células dañadas y se detectan como señales de "peligro" para sistema inmune innato. Las ectofosfatasas convierten estos nucleótidos en nucleosinas no inflamatorias (4). Las afecciones hipóxicas, que resultan de un trauma quirúrgico puede dar como resultado isquemia y reacciones inflamatorias posteriores.

Durante el bypass cardiopulmonar (CPB) la hipoperfusión del intestino puede dar como resultado una pérdida de la función de barrera, y como consecuencia las endotoxinas bacterianas, normalmente confinadas en la luz del intestino por una barrera de células endovasculares, pueden entrar en la circulación sistémica (5-7). La cantidad de endotoxinas liberadas parece estar relacionada con el tiempo de fijación y el tiempo de CPB (7). La liberación de endotoxinas está considerada como un factor importante en la respuesta inflamatoria posterior a CPB.

Los estudios previos en animales utilizando fosfatasa alcalina intravenosa mostraron efectos terapéuticos prometedores en la reducción de la respuesta inflamatoria (8-10).

En un estudio clínico en pacientes con sepsis grave la infusión continua de bIAP mejora significativamente la función renal (11). Tuin et al. (12) demostraron que, tras la administración de LPS, en hígado de rata tanto in vitro como in vivo, se produce la síntesis de novo de fosfatasa alcalina.

Materiales y Métodos

En este estudio doble ciego, controlado con placebo, los pacientes sometidos a injerto optativo no emergente por bypass en una arteria coronaria fueron asignados al azar para recibir ya sea fosfatasa alcalina intestinal bovina (bIAP) o placebo. El estudio fue aprobado por "The Institutional Review Board", el 16 de marzo de 2006. El fármaco de estudio bIAP fue fabricado por Biozyme Ltd (Bleanavon, Gales, Reino Unido) y Alloksys Life Sciences BV (Bunnik, Países Bajos). El placebo consistió en una solución de infusión estéril para infusión que no contiene bIAP (contenido de 1 ml) en un vial de 2 ml en 1 ml de solución amortiguadora acuosa que contiene 20 mM de Tris-HCl, 5 mM de cloruro de magnesio, 0,1 mM de cloruro de zinc, pH 7,3, con 25% de glicerol y albúmina de suero humana como estabilizador.

Medición de la fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina se midió usando un ensayo cinético de PNPP (p-nitrofenol fosfato) (13). Las muestras se descongelaron y se calentaron gradualmente hasta 21 grados Celsius. Se mezclaron doscientos (200) µl de una muestra de suero con 1 ml de PNPP-sustrato (Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Países Bajos) y MgCl₂ (concentración final 2 mM) en una solución amortiguadora de Tris-glicerina a pH 9,6 en una cubeta de 10 mm. Las muestras se midieron cinéticamente a 405 nm en un fotospectrofotómetro de Biorad SmartSpec durante 60 segundos con intervalos de 20 segundos. La actividad de la fosfatasa alcalina de hueso se midió mediante un ensayo de inmunocaptura de Metra Biosystem.

Inhibición de la enzima

Se utilizó L-homoarginina (LHA) (Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, Países Bajos) como inhibidor de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP), para investigar el origen de la fosfatasa alcalina. La LHA tiene

una influencia mínima sobre bIAP, pero tiene impacto en la inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina no específica de tejido ('LBK') (14).

Para el ensayo de inhibición, se diluyó la bIAP hasta una concentración de 0,08 U/L y se añadieron 100 µl de muestra a un tubo de vidrio. Se añadieron cinco mM de LHA (concentración final) y se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación se llevó a cabo un ensayo de cinética de PNPP de manera similar al que se describió anteriormente pero ahora se tomaron mediciones durante 180 segundos con intervalos de 20 segundos. Con fines farmacocinéticos, se midieron los niveles de fosfatasa alcalina en humanos en el Laboratorio del Hospital Catharina por métodos químicos clínicos de rutina. (Cobas-Bio analizador centrífugador, Roche Diagnostics, Suiza).

Administración del fármaco estudiado, fundamentos para la seguridad y la distribución aleatoria

Se administró el fármaco estudiado fosfatasa alcalina intestinal bovina (bIAP) o placebo en forma de un bolo intravenoso de 1.000 unidades internacionales (IU), justo antes de la inducción de la anestesia, seguido directamente de una infusión intravenosa continua de 5,6 U/kg unidades por kilogramo de peso corporal por hora a una velocidad de flujo de 4 ml/h durante 36 horas con el fin de mantener niveles supranormales de fosfatasa alcalina en la sangre. Un estudio de fase I con bIAP demostró que la infusión continua durante 72 horas de hasta un total de 48.000 IU de bIAP (para 80 kg de peso corporal) era segura y se toleraba bien.

Durante un período de 90 días después de la administración, no se encontró ninguna incompatibilidad inmunológica como se evidencia por la falta de inducción de anticuerpos específicos frente bIAP. No se observaron efectos adversos relacionados con el fármaco (15). El farmacéutico responsable del ensayo en el departamento de farmacia llevó a cabo la distribución aleatoria de los fármacos en estudio.

Técnica de CPB

Después de una esternotomía media y de la preparación de la arteria mamaria interna, todos los pacientes recibieron 3 mg/kg de heparina (Leo Pharma, Países Bajos) por vía intravenosa. Debido a que se añadió una dosis baja (200 ml, 1.000 de KIU/ml) de aprotinina (Bayer Health Care Farmacia) inicialmente a todos los pacientes, se repitió la administración de 1 mg/kg heparina cada hora durante el CPB, independientemente del ACT.

El circuito de CPB consistía en una bomba centrífuga BP80 Biomedicus (Medtronic, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.), un oxigenador de membrana (Sorin Srl. Avant, Mirandola, Italia o Medtronic Affinity, Minneapolis, Mn, EE.UU., o Gish Biomedical, Rancho Santa Margarita, California, EE.UU.), un depósito venoso plegable fabricado a medida (Sorin Biomedica, Mirandola, Italia) y un depósito de cardiotorax venosa rígida de dos cámaras Avant D980 (Sorin Srl., Mirandola, Italia). El fluido cebador consistía en 800 ml de NaCl 0,9%, 500 ml de Voluven® (Fresenius Kabi, Países Bajos), 200 ml de Manitol 20% (Baxter Health Care, Países Bajos), 200 ml de aprotinina 1000 KIU/ml, 25 ml de NaHCO₃ 8,4% y 7.500 IU de heparina. Se aplicó el bypass cardiopulmonar normotérmico a todos los pacientes. Para la protección del miocardio, se utilizó ya sea cardioplejia con sangre caliente o bien cardioplejia cristaloide fría de St. Thomas, dependiendo de la preferencia del cirujano. Al final del bypass cardiopulmonar la heparina se neutralizó con cloruro de protamina (Valeant Pharmaceuticals, Países Bajos).

Análisis estadístico

La evaluación se realizó con la ayuda del Sistema SAS (Software Release 9.13). Los datos fueron verificados por completo y se realizó una segunda verificación de la plausibilidad. Se utilizó la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon para comparar las variables continuas de los dos grupos, la prueba de chi-cuadrado de Pearson se utilizó para investigar la frecuencia (porcentaje) de los parámetros, y se consideró una probabilidad estadísticamente significativa de $p < 0,05$. Sin embargo, aparte de la variable principal de valoración (frecuencia de la reacción proinflamatoria principal) todos los valores de p dados son sólo descriptivos.

Resultados

Un total de 63 pacientes (bIAP $n=32$, placebo $n=31$) se inscribieron en este estudio. No se identificaron problemas significativos relativos a la seguridad. Excepto para el BMI que era significativamente mayor en el grupo de placebo ($25,7 \pm 2,7$ frente a $27,4 \pm 3,5$, $p=0,037$), no hubo diferencias estadísticamente significativas en los datos demográficos. Los dos grupos resultaron similares en cuanto al número de injertos, el CBP y el tiempo de clampeo y tipo de cardioplejia usado. Además, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el resultado postoperatorio.

Como se ha descrito en otros documentos (ref. Kats et al, 2008), se observó una respuesta inflamatoria aguda grave sólo en un pequeño grupo de pacientes del grupo de placebo. Estos 5 pacientes mostraron una respuesta TNF α fulminante (nivel medio del valor de 108 pg/ml, en un rango de 0,10 a 476 pg/ml) observada a las 4 horas de la inducción de la cirugía. Esta respuesta TNF α fue seguida por un aumento en los niveles plasmáticos de IL-6 (un promedio nivel máximo de 683 pg/mL, en un rango de 9 a 2386 pg/mL) y de IL-8 (un promedio del nivel máximo de 642 pg/mL, en un rango 13 -1696 pg/ml). Esta respuesta TNF α postquirúrgica no se observó en el grupo tratado con

blAP ($p < 0,02$). La respuesta inflamatoria general como se deduce de los niveles de citoquinas, proteína C reactiva (PCR), AST y ALT fue baja tanto en el grupo de blAP como en el placebo.

Niveles postquirúrgicos de fosfatasa alcalina en plasma

5 Los niveles preoperatorios de fosfatasa alcalina eran de $70,03 \pm 7,12$ IU/l en el grupo tratado con blAP, y de $70,50 \pm 15,63$ IU/l en el grupo tratado con placebo ($p = ns$). En el grupo tratado con placebo, en 31 de los 31 pacientes se observó una disminución de los niveles de fosfatasa alcalina en plasma en las 2 horas posteriores a la cirugía ($34,89 \pm 9,59$ IU/l). Esta reducción en los niveles de fosfatasa alcalina en plasma fue seguida de la normalización de este nivel después de 24 horas.

10 En el grupo tratado con blAP en la totalidad de los 32 pacientes se encontró un aumento inicial de los niveles plasmáticos de fosfatasa alcalina como consecuencia de la administración del bolo (464 ± 176 IU/l). Junto al aumento inicial se observó un aumento significativo de la fosfatasa alcalina de plasma aproximadamente a las 4-6 horas posteriores a la cirugía (355 ± 95 IU/l). Esta fosfatasa alcalina podía ser inhibida por L-homoarginina y por lo tanto probablemente representa una fosfatasa alcalina no específica de tejido (fosfatasa alcalina de tipo TNSALP) (14).
15 Mediante el análisis de isoenzimas se excluye que este aumento postquirúrgico de fosfatasa alcalina en plasma pueda atribuirse al incremento de la fosfatasa alcalina de tipo óseo. Por lo tanto la fuente más probable es fosfatasa alcalina de tipo hepático.

Curiosamente, la reducción de la fosfatasa alcalina postquirúrgica en pacientes tratados con placebo también afecta a la cantidad de fosfatasa alcalina de tipo óseo circulante con porcentajes similares a los de la fosfatasa alcalina total, aunque la fosfatasa alcalina de tipo óseo -como se ha indicado anteriormente- no se induce paralelamente a la fosfatasa alcalina de tipo TNSALP plasmática postquirúrgica aparente.

Discusión

La familia de las fosfatasas alcalinas está compuesta por las fosfatasas alcalinas no específicas de tejido, como la fosfatasa alcalina de hígado, ósea y la fosfatasa alcalina de riñón, y las fosfatasas alcalinas específicas de tejidos, como la fosfatasa alcalina intestinal, de placenta y análoga de placenta (16).

25 Un papel fisiológico de la fosfatasa alcalina fue propuesto por Poelstra et al. en 1997 (1). La fosfatasa alcalina intestinal es capaz de desintoxicar endotoxinas, un producto de las bacterias gram-negativas, que es abundante en medio externo y en el lumen del tracto intestinal. El resto fosforilado del lípido-A de la endotoxina, que se considera esencial para sus acciones biológicas, es un sustrato de la fosfatasa alcalina, que desfosforila enzimáticamente la parte tóxica del lípido-A en un monofosforil lípido-A, un metabolito no inflamatorio y un en fosfato inorgánico (2; 3).

30 Junto con los LPS como sustrato de la fosfatasa alcalina, esta ectofosfatasa también convierte nucleótidos proinflamatorios que se liberan durante ataques isquémicos y que normalmente conducen a un aumento local de las citoquinas proinflamatorias como el TNF α en la zona donde tiene lugar la operación. Torre Amione demostró que el aumento de los TNF locales durante la cirugía cardíaca se puede evitar mediante la administración de un bloqueante de TNF α como el Etanercept (17). De manera similar a este hallazgo el presente estudio muestra que blAP es capaz de evitar una respuesta TNF α drástica, ya que dicha respuesta TNF α se observó solamente en el grupo placebo.

40 Durante CABG con el uso de CPB se produce un incremento de la translocación de los LPS desde el intestino (18; 19). Además se ha demostrado que en la zona donde tiene lugar la operación, dependiendo de tiempo de CPB y del camleo cruzado, se producen ataques isquémicos seguidos de un aumento local de nucleótidos. Tanto la isquemia-reperfusión mediada por endotoxina como los nucleótidos extracelulares liberados son activadores potentes de la inflamación y son un sustrato tanto para la fosfatasa alcalina suplementaria como endógena.

Normalmente los LPS se transportan con el quimo y se absorben por las células de Kupffer y los hepatocitos. Se propone que estos LPS sean detoxificados predominantemente mediante la actividad de la fosfatasa alcalina de tipo intestinal y de la fosfatasa alcalina residente del plasma. Varios autores informaron que las células de Kupffer pueden funcionar eliminando los conjugados de fosfatasa alcalina-LPS de la circulación, reduciendo de ese modo los niveles de fosfatasa alcalina totales (2;20), lo que también se ha demostrado en nuestro estudio en el grupo de placebo, donde hay una reducción inicial de la fosfatasa alcalina del plasma.

50 En ausencia de una cantidad suficiente de actividad de fosfatasa alcalina, su función de eliminación de endotoxinas puede ser subóptima, dando como resultado la agravación adicional de los efectos inflamatorios mediados por endotoxinas. Por lo tanto, nosotros en nuestro estudio hemos suplementado con fosfatasa alcalina bovina para combatir la inflamación inducida por endotoxina en CABG con el uso de CPB.

Un hallazgo interesante de este estudio es la diferencia en los niveles de fosfatasa alcalina entre los tratados con blAP y el grupo tratado con placebo. En los pacientes tratados con placebo se observó una reducción de los niveles de fosfatasa alcalina en plasma 2 horas después de la cirugía. Se observaron niveles plasmáticos normalizados después de 24 horas. La reducción de los niveles de fosfatasa alcalina en plasma después de la administración de endotoxina había sido previamente descrita por Verweij et al. en estudios con animales (20).

En el grupo tratado con bIAP, se observó un aumento inicial de la concentración plasmática de fosfatasa alcalina debido a la administración del bolo. El comportamiento cinético de esta fosfatasa alcalina 1 del plasma era compatible con la fosfatasa alcalina administrada, con una semivida física de unos 10 minutos (8).

5 Junto al aumento inicial en el nivel de fosfatasa alcalina, se observó un aumento secundario significativo de la fosfatasa alcalina en plasma 4-6 horas aproximadamente después de la cirugía. Este fosfatasa alcalina endógena se inhibe con L-homoarginina y por lo tanto representa probablemente una fosfatasa alcalina no específica de tejido, con una semivida física de aproximadamente 20 horas (14). A juzgar por la cantidad de postquirúrgica de esta fosfatasa alcalina no específica de tejido circulante, la fuente más probable es la fosfatasa alcalina de tipo hepática, ya que se demostró que la otra fuente abundante en el plasma, la fosfatasa alcalina ósea, no aumentó.

10 El presente estudio muestra que la profilaxis con fosfatasa alcalina mejora la defensa frente a una nueva agresión inflamatoria mediante la activación de la liberación de la fosfatasa alcalina que se mantiene en circulación.

15 La implicación sorprendente de este hallazgo tiene importantes consecuencias. La fosfatasa alcalina puede actuar como una proteína de fase aguda, los niveles altos de fosfatasa alcalina activa fisiológicamente tienen un efecto anti-inflamatorio de protección. Los niveles en plasma pre-operatorio pueden predecir el resultado clínico en una inflamación aguda de una forma similar a la descrita para los niveles de anticuerpos anti-endotoxina elevados en plasma (21, 22).

Por consiguiente, los pacientes están protegidos por el pre-tratamiento con fosfatasa alcalina activa fisiológicamente la cual aumentará sus niveles fisiológicos endógenos.

Conclusión

20 La administración de un bolo intravenoso de fosfatasa alcalina a pacientes sometidos a injerto por bypass en una arteria coronaria da como resultado un aumento posterior en los niveles de fosfatasa alcalina del plasma circulante 4 a 6 horas después del inicio de la cirugía. El origen de esta fosfatasa alcalina se atribuye a la fosfatasa alcalina no específica de tejido, más probablemente a la fosfatasa alcalina de tipo hígado. Esta fosfatasa alcalina endógena puede jugar un papel en el sistema inmune de defensa innato.

25 REFERENCIAS

(1) Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Hardonk MJ, Meijer DK. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. Lab Invest 1997 Mar;76(3):319-27.

(2) Bentala H, Verweij WR, Huizinga-van der Vlag A, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. Shock 2002 Dec;18(6):561-6.

(3) Poelstra K, Bakker WW, Klok PA, Kamps JA, Hardonk MJ, Meijer DK. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. Am J Pathol 1997 Oct;151(4):1163-9.

(4) Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, Khoury J, Mittelbronn M, Ibla J, et al. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J Immunol* 2007 Jun 15;178(12):8127-37.

(5) Oudemans-van Straaten HM, Jansen PG, Hoek FJ, van Deventer SJ, Sturk A, Stoutenbeek CP, et al. Intestinal permeability, circulating endotoxin, and postoperative systemic responses in cardiac surgery patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1996 Feb;10(2):187-94.

(6) Nilsson L, Kulander L, Nystrom SO, Eriksson O. Endotoxins in cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990 Nov;100(5):777-80.

(7) Rocke DA, Gaffin SL, Wells MT, Koen Y, Brock-Utine JG. Endotoxemia associated with cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987 Jun;93(6):832-7.

(8) Beumer C, Wulferink M, Raaben W, Fiechter D, Brands R, Seinen W. Calf intestinal alkaline phosphatase, a novel therapeutic drug for lipopolysaccharide (LPS)-mediated diseases, attenuates LPS toxicity in mice and piglets. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 Nov;307(2):737-44.

(9) van Veen SQ, Dinant S, van Vliet AK, van Gulik TM. Alkaline phosphatase reduces hepatic and pulmonary injury in liver ischaemia -- reperfusion combined with partial resection. *Br J Surg* 2006 Apr;93(4):448-56.

(10) van Veen SQ, van Vliet AK, Wulferink M, Brands R, Boermeester MA, van Gulik TM. Bovine intestinal alkaline phosphatase attenuates the inflammatory response in secondary peritonitis in mice. *Infect Immun* 2005 Jul;73(7):4309-14.

(11) Pickkers P, Snellen F, Rogiers P, Bakker J, Jorens P, Meulenbelt J, et al. Clinical pharmacology of exogenously administered alkaline phosphatase. *Eur J Clin Pharmacol* 2008 Dec 2.

(12) Tuin A, Huizinga-van d, V, van Loenen-Weemaes AM, Meijer DK, Poelstra K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 Feb;290(2):G377-G385.

(13) Bergmeyer H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*. II[3rd edition], 269-270. 1983.

(14) Lin CW, Fishman WH. L-Homoarginine. An organ-specific, uncompetitive inhibitor of human liver and bone alkaline phosphohydrolases. *J Biol Chem* 1972 May 25;247(10):3082-7.

(15) Ramael S. A phase I study to investigate the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of Calf Intestinal Alkaline Phosphatase 72-h infusions in healthy volunteers. SGS Biopharma Research Unit Stuivenberg, SGS Biopharma B103613 report, 2004. 2008.

(16) Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 1990 Jan 15;186(2):133-50.

(17) Torre-Amione G, Wallace CK, Young JB, Koerner MM, Thohan V, McRee S, et al. The effect of etanercept on cardiac transplant recipients: a study of TNFalpha antagonism and cardiac allograft hypertrophy. *Transplantation* 2007 Aug 27;84(4):480-3.

(18) Andersen LW, Baek L, Degn H, Lehd J, Krasnik M, Rasmussen JP. Presence of circulating endotoxins during cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987 Jan;93(1):115-9.

(19) Kharazmi A, Andersen LW, Baek L, Valerius NH, Laub M, Rasmussen JP. Endotoxemia and enhanced generation of oxygen radicals by neutrophils from patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989 Sep;98(3):381-5.

(20) Verweij WR, Bentala H, Huizinga-van d, V, Miek vL-W, Kooi K, Meijer DK, et al. Protection against an Escherichia coli-induced sepsis by alkaline phosphatase in mice. Shock 2004 Aug;22(2):174-9.

(21) Bennett-Guerrero E, Ayuso L, Hamilton-Davies C, White WD, Barclay GR, Smith PK, et al. Relationship of preoperative antiendotoxin core antibodies and adverse outcomes following cardiac surgery. JAMA 1997 Feb 26;277(8):646-50.

(22) Rothenburger M, Soeparwata R, Deng MC, Schmid C, Berendes E, Tjan TD, et al. Prediction of clinical outcome after cardiac surgery: the role of cytokines, endotoxin, and anti-endotoxin core antibodies. Shock 2001;16 Suppl 1:44-50.

(23) Mangano DT, Miao Y, Vuylsteke A, Tudor IC, Juneja R, Filipescu D, et al. Mortality associated with aprotinin during 5 years following coronary artery bypass graft surgery. JAMA 2007 Feb 7;297(5):471-9.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Fosfatasa alcalina para utilización en la profilaxis de pacientes sometidos a una intervención quirúrgica, teniendo dichos pacientes riesgo de enfermedades inflamatorias como consecuencia de la cirugía, por inducción de fosfatasa alcalina endógena, donde dicha profilaxis comprende la administración intravenosa de una cantidad terapéuticamente eficaz de fosfatasa alcalina a dichos pacientes sometidos a una intervención quirúrgica.

Figura 1/3

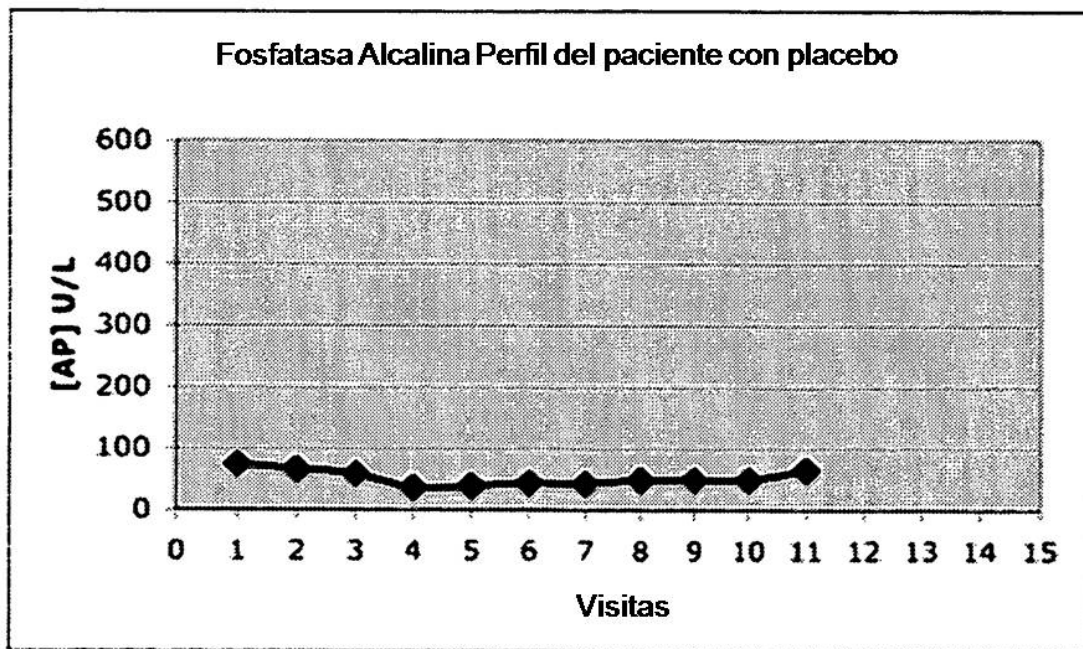
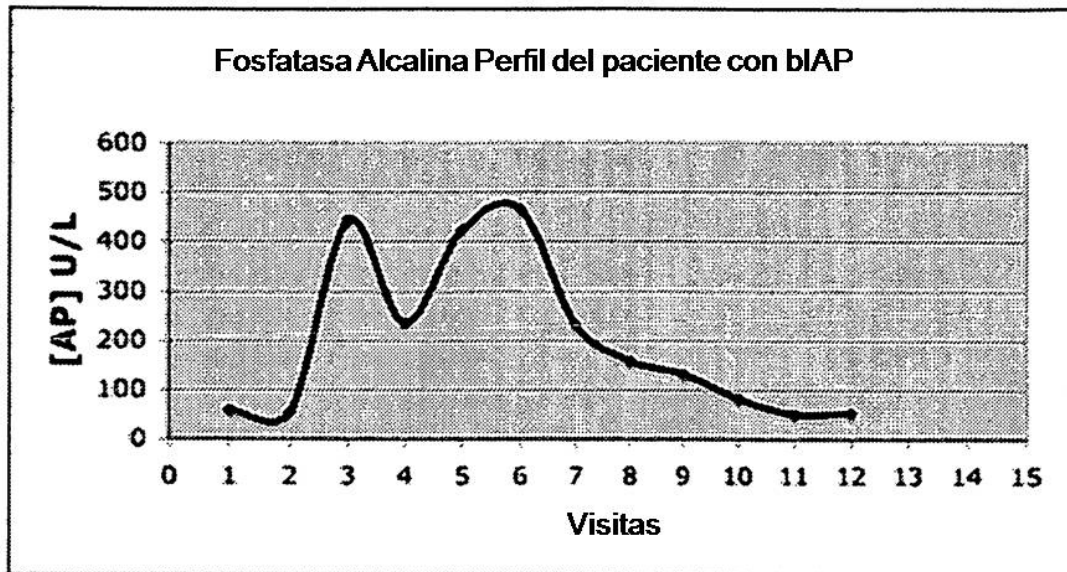


Figura 2/3

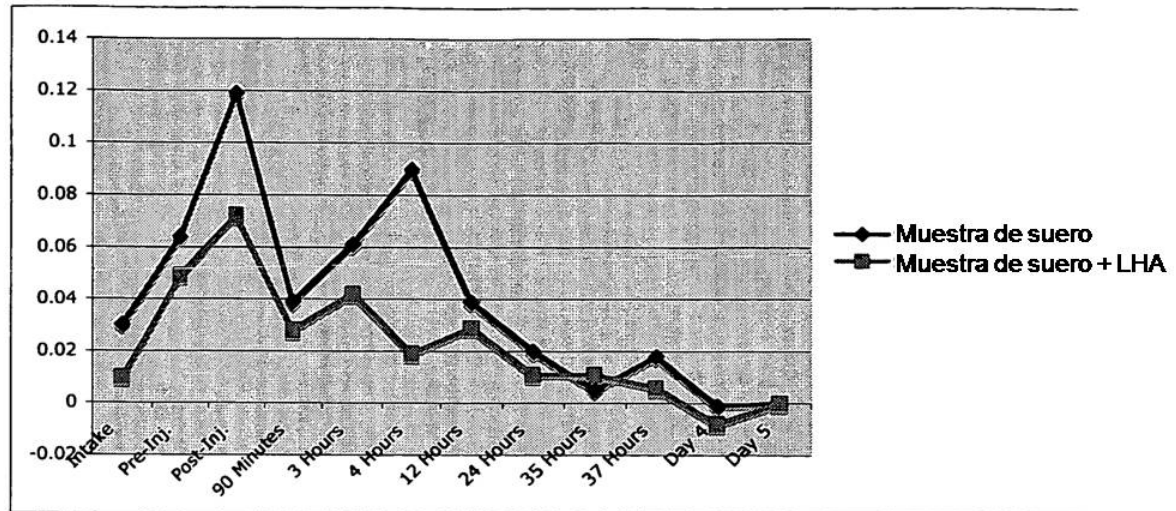


Figura 3/3

