

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 932**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2003 E 03768168 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1593391**

54 Título: **Remedio para la degeneración de los discos intervertebrales**

30 Prioridad:

**25.12.2002 JP 2002373527**  
**30.06.2003 JP 2003187675**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.11.2013**

73 Titular/es:

**KOMORI, HIROMICHI (50.0%)**  
**2-11-19, Nukuikitamachi Koganei-shi**  
**Tokyo 184-0015, JP y**  
**HARO, HIROTAKA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HARO, HIROTAKA**

74 Agente/Representante:

**ZUAZO ARALUZE, Alexander**

**ES 2 427 932 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

Remedio para la degeneración de los discos intervertebrales

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales que comprende una proteasa derivada de ser humano, concretamente MMP-7, como principio activo. El agente se administra directamente a la parte afectada por una enfermedad asociada con la degeneración de los discos intervertebrales, y es eficaz para la hernia de disco, el lumbago, la discopatía y la espondilosis, fomentando la resorción natural de la hernia discal, no usándose el agente que comprende MMP-7 en combinación con una sustancia que induce angiogénesis para el tratamiento de hernias.

15 **Técnica anterior**

Los discos intervertebrales, los cuerpos cartilaginosos en forma de disco interpuestos entre vértebras adyacentes, están compuestos cada uno por un anillo fibroso externo que rodea el núcleo pulposo interno, y comprenden componentes cartilaginosos tales como proteoglicanos, agreganos, colágeno tipo II y similares. Los discos intervertebrales pierden su elasticidad debido a la reducción del contenido en agua en los discos que se produce principalmente como resultado del envejecimiento, con una pérdida concomitante de componentes cartilaginosos y la acumulación de tejido fibroso, lo que conduce a la destrucción de la estructura doble de núcleo pulposo interno y anillo fibroso externo. Este cambio se denomina "degeneración de los discos intervertebrales". La degeneración de los discos intervertebrales progresa con el aumento de la edad, comenzando en la tercera década, produciéndose la degeneración de prácticamente todo el tejido de los discos intervertebrales a los 70 años. La hernia discal se produce cuando el núcleo pulposo degenerado rompe el frágil tejido fibroso y se adentra en el conducto raquídeo, comprimiendo la raíz del nervio y la cola de caballo y produciendo dolor o parálisis. El lumbago también puede estar provocado por un metabolismo óseo anómalo, una lesión externa, un tumor o similar, pero habitualmente resulta de la degeneración de los discos intervertebrales.

La obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM) se usa ampliamente para el diagnóstico de la degeneración de los discos intervertebrales. Dado que no implica exposición como con los rayos X, puede usarse para un examen frecuente. La obtención de imágenes secuenciales ha confirmado un mecanismo de resorción natural por el cual el volumen de las hernias discales disminuye con el tiempo. Además, el uso de un agente de contraste, gadolinio-ácido dietilentriaminopentaacético (Gd-DTPA), ha mostrado una neovascularización abundante en las hernias discales cuando se observa un efecto de imagen en el tejido herniado de discos intervertebrales, lo que sugiere que se produce más resorción natural. Este principio puede utilizarse para el diagnóstico y el pronóstico.

El examen inmunohistológico de muestras quirúrgicas humanas extraídas de masas de hernia discal ha revelado un aumento de la neovascularización y la infiltración de numerosas células inflamatorias que consisten principalmente en macrófagos en la matriz de cartilago de masas de hernia discal (Haro *et al.*, Spine 21(1996), 1647-1652). Se ha confirmado que los macrófagos que se infiltran y los condrocitos de discos intervertebrales expresan de manera abundante las metaloproteinasas de matriz (MMP) MMP-3 y MMP-7 (Haro *et al.*, Spine 22(1997), 1098-1104 y Haro *et al.* J. Spinal. Disorders 12(1999), 245-249). Las MMP son enzimas que funcionan mayoritariamente en el intervalo neutro y se expresan fisiológicamente de manera intraarticular y en el tejido de los discos intervertebrales. Los proteoglicanos y agreganos, los componentes mayoritarios del tejido de cartilago, son los sustratos de MMP-3 y MMP-7. Por tanto, se asume que MMP-3 y MMP-7 desempeñan papeles importantes en la degradación y resorción de hernias discales.

Cuando se cultivan discos intervertebrales de ratón de tipo natural conjuntamente con macrófagos activos, la reducción en la masa de los discos intervertebrales es mayor que con el cultivo conjunto de macrófagos y discos intervertebrales derivados de un ratón deficiente en MMP-3. Experimentos usando ratones de tipo natural y ratones deficientes en MMP-3 han confirmado que las MMP-3 tienen un efecto quimiotáctico sobre los macrófagos provocando que migren hacia los discos intervertebrales (las MMP-3 funcionan como factor quimiotáctico para los macrófagos) (Haro *et al.*, J. Clin. Invest. 105(2)(2000), 133-141).

Las MMP-7 inducen la citocina inflamatoria TNF- $\alpha$ , y se ha notificado que TNF- $\alpha$  fomenta la producción de MMP-3 en células de discos intervertebrales (Haro *et al.*, J. Clin. Invest. 105(2)(2000), 143-150). Sin embargo, nunca se ha intentado usar proteasas derivadas de ser humano tales como MMP-3 y MMP-7 expresadas en hernias discales humanas como agentes terapéuticos.

El tratamiento quirúrgico para las hernias discales intenta generalmente conseguir la descompresión de los nervios retirando la masa de la hernia discal. Sin embargo, dado que el estado es común entre los grupos de edad de la adolescencia y la madurez y relativamente frecuente entre atletas, se ha buscado un tratamiento no invasivo con el fin de evitar una cirugía.

El tratamiento mediante inyección de enzimas tales como quimopapaína extraída de plantas en hernias discales ya

se ha puesto en práctica en los EE.UU. y en Europa, pero se han notificado reacción inmunitaria y neurotoxicidad. Además, aunque se ha notificado que la inyección de quimopapaína en sitios de hernia discal restaura gradualmente las cavidades de hernia discal producidas por proteólisis, esto se atribuye a la hiperplasia no de la matriz cartilaginosa sino del tejido conjuntivo fibroso. Observaciones histológicas de discos caninos en los que se ha inyectado quimopapaína han revelado supuestamente un reemplazo del centro del núcleo pulposo por tejido fibrocartilaginoso (Kudo *et al.*, J. Vet. Med. Sci. 1993, Apr., 55(2) 211-5). Según experimentos realizados por los presentes inventores, casos en los que se inyectó quimopapaína en hernias discales caninas mostraron una degradación de la matriz cartilaginosa por todo el núcleo pulposo y el anillo fibroso, estando los condrocitos supervivientes notablemente reducidos y muy dañados. Por tanto, se cree que la lisis de una hernia discal con quimopapaína o bien reduce o bien elimina la capacidad regenerativa de los discos intervertebrales. Dado que los condrocitos conservan su función mientras están suspendidos en la matriz, la matriz es indispensable para la regeneración de los discos intervertebrales. La consideración de estos hechos conocidos públicamente con el conocimiento confirmado por los presentes inventores sugiere que en los métodos convencionales en los que se administran proteasas directamente a los sitios de hernia discal para la eliminación del núcleo pulposo degenerado, es difícil preservar la matriz que se requiere para mantener la capacidad regenerativa de discos intervertebrales de los condrocitos.

El documento EP 1 407 783 A1, publicado el 14/04/2004, reivindica la fecha de prioridad del 26/06/2001 y se presentó el 26/06/2002, es decir su fecha de presentación es anterior a la fecha de prioridad de la presente solicitud. Por tanto, el documento EP 1 407 783 A1 es una solicitud anterior que reivindica una composición que comprende MMP-7 en combinación con una sustancia que induce angiogénesis para su uso en el tratamiento de una hernia.

El documento JP11169176 reivindica el uso de MMP-3 para proporcionar un medicamento para el tratamiento de las hernias de discos intervertebrales.

### Descripción de la invención

Sorprendentemente, se descubrió que la inyección de MMP-7, tipos de proteasas derivadas de ser humano, en hernias discales fomenta la resorción de hernias discales pero no daña los condrocitos normales. Específicamente, fue posible degradar hernias discales mientras se mantenía la capacidad regenerativa de discos intervertebrales. Tal como se mencionó anteriormente, la matriz es absolutamente esencial para mantener la función de los condrocitos. La presente invención se basa en el conocimiento revolucionario de que la inyección de MMP-7, que son proteasas derivadas de ser humano, en una hernia discal fomenta la resorción selectiva de la hernia discal mientras preserva los condrocitos normales. La invención proporciona un tratamiento completamente novedoso de las hernias discales que no conlleva un riesgo de lesión en los condrocitos normales tal como sucede usando la quimopapaína conocida hasta la fecha.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales que comprende como principio activo una proteasa derivada de ser humano de la que se cree que contribuye a la resorción natural de una hernia discal humana, y que se administra directamente a los discos intervertebrales degenerados. La invención proporciona además una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de trastornos asociados con la degeneración de los discos intervertebrales mediante el cual las proteasas derivadas de ser humano se administran directamente a los discos intervertebrales degenerados. Los trastornos objetivo para el tratamiento de la invención son los estados asociados con la degeneración de los discos intervertebrales e incluyen hernia discal, lumbago, discopatía y espondilosis.

Puede hablarse de las MMP-7 mencionadas anteriormente como sustancias de las que se cree que contribuyen a la resorción de una hernia discal basándose en la investigación hasta la fecha. Las MMP-7 (E.C. 3.4.24.33), también conocidas como matrilisinas o PUMP, degradan el colágeno tipo IV y tipo X, la elastina, la fibronectina, la gelatina, la laminina y el proteoglicano.

Estas proteasas se han producido y proporcionado recientemente mediante tecnología recombinante. Los presentes inventores han utilizado y confirmado la eficacia de esas proteasas mediante la inyección en estados asociados con la degeneración de los discos intervertebrales, tal como hernia discal. Además, se confirmó que estas proteasas derivadas de ser humano no corren el riesgo de dañar los condrocitos normales tal como el que muestra la quimopapaína, y la presente invención se completó en base a esto.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un par de gráficos de barras que muestran cambios en el peso húmedo de especímenes de hernia discal cultivadas con MMP-3, MMP-7, mezclas de las mismas, quimopapaína como control positivo y un control (medio DMEM).

La figura 2 es un conjunto de fotografías que muestran los resultados de la tinción con safranina O de muestras de tejido obtenidas cultivando especímenes de hernia discal con MMP-3, MMP-7, mezclas de las mismas y quimopapaína como control positivo.

La figura 3 es un conjunto de fotografías que muestran los resultados de la tinción con safranina O de muestras vertebrales preparadas inyectando MMP-3, MMP-7, quimopapaína como control positivo y solución salina normal (NS) en discos intervertebrales de conejo y sacrificando los animales tras una semana.

5 La figura 4 es una micrografía de una muestra de tejido de hernia discal (teñida con hematoxilina-eosina) extraída de una hernia discal espontánea de un teckel enano.

10 La figura 5 es una imagen fluoroscópica que muestra una hernia discal espontánea de beagle tras la inyección de MMP-7.

La figura 6 es un par de imágenes de IRM (ponderadas en T1 con lípidos) antes (Pre) y después (Post) de la inyección de MMP-7 en una hernia discal espontánea de beagle.

15 La figura 7 es un par de imágenes de IRM (ponderadas en T2 con agua) antes (Pre) y después (Post) de la inyección de MMP-7 en una hernia discal espontánea de beagle.

20 La figura 8 es un par de imágenes de IRM (ponderadas en T2 con agua) antes (Pre) y después (Post) de la inyección de MMP-3 en una hernia discal espontánea de beagle.

La figura 9 es una fotografía que muestra muestras vertebrales cortadas preparadas inyectando MMP-7 y una solución salina normal como control en hernias discales espontáneas de beagle y sacrificando los animales tras una semana.

25 La figura 10 es un par de fotografías que muestran los resultados de la tinción con safranina O de muestras vertebrales preparadas inyectando MMP-7 y solución salina normal como control en hernias discales espontáneas de beagle y sacrificando los animales entonces tras una semana; se muestran los resultados para inyección de MMP-7 e inyección de solución salina normal.

30 La figura 11 es una fotografía que muestra los resultados de la tinción con safranina O de una muestra vertebral preparada inyectando MMP-7 en una hernia discal espontánea de beagle y sacrificando los animales tras una semana.

35 La figura 12 es una fotografía que muestra los resultados de la tinción con safranina O de una muestra vertebral preparada inyectando solución salina normal como control en una hernia discal espontánea de beagle y sacrificando los animales tras una semana.

40 La figura 13 es una imagen que muestra los resultados de una inmunotransferencia de tipo Western para someter a prueba la degradación de proteoglicano mediante MMP-7.

La figura 14 es una imagen que muestra los resultados de la tinción con safranina O de una muestra patológica preparada inyectando quimopapaína en una hernia discal canina y sacrificando el animal una semana tras la inyección.

#### 45 **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

La presente invención proporciona un agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales, seleccionándose las enfermedades del grupo que consiste en hernia discal, lumbago, discopatía o espondilosis y comprendiendo el agente como principio activo proteasa MMP-7 derivada de ser humano y administrándose directamente al sitio del estado asociado con la degeneración de los discos intervertebrales y no usándose el agente que comprende MMP-7 en combinación con una sustancia que induce angiogénesis para el tratamiento de hernias. La proteasa como principio activo es una proteasa de matriz extracelular, concretamente MMP-7.

55 El agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales según la invención se administra directamente a, por ejemplo, un sitio de hernia discal. El método de administración del agente de la invención puede ser administración en el disco intervertebral cerca de la hernia. En punción discal, por ejemplo, se hace avanzar una aguja de punción por vía subcutánea bajo control fluoroscópico. Entonces se hace avanzar el cilindro interno en la dirección del disco protruido para la punción selectiva de la hernia discal protruida, y se inyecta el agente farmacológico de la invención. También puede administrarse mediante inyección en el espacio epidural. La administración del agente de la invención de esta manera puede promover la resorción natural de la hernia discal.

65 El uso de un agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales según la invención requiere un diagnóstico en el que se observe un síntoma neural tal como radiculopatía, síndrome de la cola de caballo o mielopatía y se confirme el estado de compresión del nervio y el sitio

y la gravedad de la degeneración de los discos intervertebrales, tal como hernia discal, mediante obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). El examen discográfico también es importante para la obtención de imágenes de la masa de hernia discal en el sitio que va a tratarse, con el fin de juzgar de manera precisa el sitio y la magnitud de la hernia discal.

5 Por tanto, un modo de la invención es un método de tratamiento para una hernia discal en el que se examina un paciente del que se sospecha que tiene degeneración de los discos intervertebrales, tal como una hernia discal, mediante IRM y discografía y, si se encuentra que el paciente tiene una degeneración de los discos intervertebrales tal como una hernia discal, se administra una proteasa MMP-7 derivada de ser humano directamente al sitio de la hernia discal según sea apropiado para la patología, para promover la resorción natural del tejido de hernia discal.

10 La dosificación del agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales según la invención diferirá dependiendo de la gravedad de la degeneración de los discos intervertebrales, tal como hernia discal, el estado del paciente, el tipo de proteasa, etc. El agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales según la invención se administra directamente al sitio afectado, y su dosificación estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  a 100 mg y preferiblemente de 100  $\mu\text{g}$  a 1 mg por administración. La frecuencia de administración es preferiblemente de una a varias veces, y puede aumentarse dependiendo del grado de resorción.

## 20 Ejemplos

Ahora se explicará la presente invención en mayor detalle mediante los siguientes ejemplos.

25 Ejemplo 1 Experimento de cultivo de órganos usando un espécimen quirúrgico de hernia discal humana

Se cortó finamente un espécimen de disco lumbar herniado extraído quirúrgicamente (almacenado a 4°C) y se midió el peso húmedo para su dispensación en partes de espécimen de 60-80  $\mu\text{g}$ , que se colocaron en una placa de 96 pocillos. Se añadieron las disoluciones de muestra descritas a continuación y se llevó a cabo su cultivo durante 24 horas en un incubador de  $\text{CO}_2$  a 37°C.

30 (1) Control/medio DMEM 200  $\mu\text{l}$

(2) MMP-3 recombinante humana (45 kDa) 20  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$

35 (3) MMP-7 recombinante humana (19 kDa) 20  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$

(4) MMP-3 recombinante humana 10  $\mu\text{g}$  + MMP-7 recombinante humana 10  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$

40 (5) MMP-3 recombinante humana 20  $\mu\text{g}$  + MMP-7 recombinante humana 20  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$

(6) Quimopapaína 1, 5, 10, 50, 100, 500 pkt (picoKatal)/200  $\mu\text{l}$

45 Se disolvieron la MMP-3 recombinante humana (CHEMICON) y la MMP-7 recombinante humana (CHEMICON) en medio DMEM a 4°C. Se usó la quimopapaína como control positivo, disolviendo quimopapaína (ICN Biomedicals) en una disolución que contenía EDTA 1 mM, mercaptoetanol 0,067 mM y clorhidrato de cisteína 5,5 mM, y llevando a cabo una incubación a 25°C, pH 6,2 durante 30 minutos para su activación antes de la adición al medio DMEM.

50 Se midió el peso húmedo del producto de cultivo obtenido y se realizaron cálculos estadísticos. Los resultados se muestran en la figura 1. Tal como puede observarse claramente en la figura 1, el uso de MMP-3, MMP-7 o ambas en combinación redujo significativamente el peso húmedo en comparación con el control.

55 A continuación, se colocó el espécimen en paraformaldehído al 4% para preparar una muestra de tejido que se tiñó entonces con safranina O, dando los resultados mostrados en la figura 2. Como resultado, los órganos cultivados con adición de MMP-3, MMP-7 o quimopapaína mostraron una reducción en la tinción (resorción de hernia discal) que era superior a la del control.

Ejemplo 2 Experimento para la inyección en un disco intervertebral de conejo

60 Se trataron conejos blancos japoneses (3-4 kg) mediante el procedimiento descrito a continuación y se examinaron los efectos de la inyección de agentes farmacológicos en los discos intervertebrales.

1. El tratamiento de medicación previa fue la inyección subcutánea de 0,5-1,0 ml/kg de clorhidrato de ketamina.

65 2. Se fijaron los cuerpos y se ancló con cinta una vía a lo largo de la vena de la oreja con una aguja con aletas 23G. Se diluyó pentobarbital sódico hasta la mitad de la concentración (0,5 mg/ml) con solución salina normal y se

inyectaron 0,5-1,0 ml/kg de una sola vez para anestesia intravenosa. Después de esto se inyectaron entonces porciones de 1 ml apropiadas. Entonces se afeitaron los cuerpos con una maquinilla y se fijaron en la posición de decúbito lateral (aproximación posterior).

5 3. Se usó un conjunto de paños y bisturí eléctrico (Air tome) para cortar, se abrió la zona subcutánea y se separó el músculo del cuerpo vertebral y las costillas para exponer los discos intervertebrales.

4. Se inyectaron los siguientes agentes farmacológicos directamente en los discos intervertebrales.

10 (1) MMP-3 recombinante humana 10 µg/100 µl y 40 µg/100 µl (concentrada con Microcon YM-3)

(2) MMP-7 recombinante humana 10 µg/100 µl y 40 µg/100 µl (concentrada con Microcon YM-3)

15 (3) Quimopapaína 1 kpt y 5 kpt

(activada mediante disolución en disolución que contenía EDTA 1 mM, mercaptoetanol 0,067 mM y clorhidrato de cisteína 5,5 mM, e incubación a 25°C, pH 6,2 durante 30 minutos)

20 (4) Control: solución salina normal (NS)

Se inyectó una porción de 100 µl del agente farmacológico en el disco intervertebral. Se administraron diferentes concentraciones del agente farmacológico en dos ubicaciones del disco intervertebral, y se administró la solución salina normal sola en una única ubicación del disco intervertebral, tras lo cual se insertó un alambre de marcaje en el cuerpo vertebral.

25 5. Se cerró cada capa con una aguja de nailon y se soltaron los conejos en sus jaulas.

6. Una semana tras la inyección, se inyectaron 3 ml de clorhidrato de ketamina y tras asegurar la vía, se fijó una aguja con aletas 23G en la vena de la oreja y se administraron 3 ml de pentobarbital sódico (1 mg/ml) (total: 5-7 ml).

30 7. Se extrajo el cuerpo vertebral en bloque y se fijó con una disolución de formalina al 4% para preparar una muestra de tejido.

35 8. Se desparafinó la muestra de tejido y se tiñó durante 5 minutos con Fast Green al 0,03% disuelto en ácido acético acuoso al 1%. Tras lavar con ácido acético acuoso al 1%, se tiñó adicionalmente durante 7 minutos con safranina O al 0,25%.

40 Los resultados se muestran en la figura 3. Los grupos a los que se les había inyectado MMP-3, MMP-7 y quimopapaína tuvieron una tinción significativamente reducida en comparación con el grupo control. El grupo al que se le inyectó MMP-3 también produjo estrechamiento de los discos intervertebrales.

#### Ejemplo 3 Experimento para la inyección en una hernia discal canina

45 Los perros, y particularmente los beagles, tienen una alta incidencia de hernia discal, presentando parálisis de ambas extremidades inferiores en casos graves. La histología de la hernia discal canina es sumamente similar a la histología de la hernia discal humana. Se preparó una muestra a partir de tejido extraído quirúrgicamente del 1<sup>er</sup>/2<sup>o</sup> disco lumbar herniado de un teckel enano de 7 años, 6,35 kg, que había sufrido una hernia discal y parálisis de las extremidades inferiores, y se tiñó con hematoxilina-eosina y se obtuvieron imágenes en una micrografía, mostrada en la figura 4. Esta muestra de tejido demuestra que la hernia discal canina es sumamente adecuada como modelo para la hernia discal humana.

50 Se inyectaron agentes farmacológicos en las hernias discales de beagles con hernia discal espontánea y se examinaron los efectos de la siguiente manera. Se usó un beagle de 7 años, 12,75 kg, para una prueba de MMP-7 recombinante humana, y se usó un beagle de 7 años, 14,4 kg, para una prueba de MMP-3 recombinante humana. Se obtuvieron imágenes del disco mediante IRM antes de la inyección del agente farmacológico, para confirmar la altura de disco normal, la altura de degeneración y la altura de hernia discal.

60 Administración de MMP-7: Se le inyectaron al beagle 20 µg/200 µl en el disco entre la 12<sup>a</sup> vértebra torácica (T12) y la 13<sup>a</sup> vértebra torácica (T13), y 10 µg/100 µl en el disco entre la 13<sup>a</sup> vértebra torácica (T13) y la 1<sup>a</sup> vértebra lumbar (L1) y el disco entre la 1<sup>a</sup> vértebra lumbar (L1) y la 2<sup>a</sup> vértebra lumbar (L2). Como control, se inyectaron 200 µl de solución salina normal en el disco entre la 2<sup>a</sup> vértebra lumbar (L2) y la tercera vértebra lumbar (L3).

65 Administración de MMP-3: Se le inyectaron al beagle 10 µg/100 µl en el disco entre la 11<sup>a</sup> vértebra torácica (T11) y la 12<sup>a</sup> vértebra torácica (T12), 20 µg/200 µl en el disco entre la 12<sup>a</sup> vértebra torácica (T12) y la 13<sup>a</sup> vértebra torácica (T13), y 10 µg/100 ml en el disco entre la 13<sup>a</sup> vértebra torácica (T13) y la 1<sup>a</sup> vértebra lumbar (L1). Como control, se

inyectaron 200 µl de solución salina normal en el disco entre la 10ª vértebra torácica (T10) y la 11ª vértebra torácica (T11).

5 La inyección de los agentes en los discos intervertebrales se llevó a cabo usando una aguja espinal bajo control fluoroscópico (figura 5). La jeringuilla usada fue una jeringuilla de tuberculina (volumen total: 1 ml). Se repitió la medición con IRM una semana tras la inyección. Las imágenes de IRM de los discos antes y tras la inyección se muestran en las figuras 6 a 8.

10 La figura 6 es un par de imágenes de IRM ponderadas en T1 que muestran los resultados usando MMP-7, y la figura 7 es un par de imágenes ponderadas en T2 que muestran los resultados usando MMP-7. Las imágenes ponderadas en T1 son eficaces para visualizar una hernia discal real, mientras que las imágenes ponderadas en T2 son eficaces para visualizar la resolución del tejido de cartilago de los discos intervertebrales. La hernia discal observada entre T12 y T13 antes de la inyección ha experimentado claramente resorción en la imagen tras la inyección. La figura 8 es un par de imágenes ponderadas en T2 con contenido en agua que muestran los resultados usando MMP-3, en los que se observa resorción de la hernia discal debido a la inyección del agente.

15 Entonces se sacrificó el beagle al que se le administró MMP-7 y se extrajo en bloque la unidad vertebral que comprendía el disco en el que se había realizado la inyección, se fijó con una disolución de paraformaldehído al 4% y se sometió a un procedimiento de descalcificación, tras lo cual se preparó una muestra de tejido (figura 9). Específicamente, a la fijación con la disolución de paraformaldehído al 4% le siguió el aclarado con PBS 10 mM y deslipidación con etanol y cloroformo. A continuación, se usó una disolución descalcificada (método Plank Rychlo: Wako, Japón) para un procedimiento de descalcificación. Tras confirmar la descalcificación adecuada, se realizó una incrustación en parafina para obtener una muestra de tejido.

25 Tras desparafinar la muestra de tejido, se tiñó durante 5 minutos con Fast Green al 0,03% disuelto en ácido acético acuoso al 1%. Tras lavar entonces con ácido acético acuoso al 1%, se tiñó adicionalmente durante 7 minutos con safranina O al 0,25%.

30 La figura 10 muestra fotografías de tiras de la misma (imagen macroscópica). La tira marcada como "Tras la inyección de MMP-7" es una tira de la ubicación en la que se inyectaron 200 µl de MMP-7 (vértebras torácicas 12ª y 13ª) y la tira marcada como "Tras la inyección de solución salina normal" es una tira tomada de entre las vértebras lumbares 2ª y 3ª donde se inyectó solución salina normal. Se muestran las tiras en mayor detalle en las figuras 11 y 12. La figura 11 muestra la tira en la que se inyectó MMP-7, junto con la misma imagen macroscópica en la parte inferior de la figura 10 mostrada en la esquina superior izquierda. Se muestra la imagen macroscópica con un aumento de 2x en el centro de la página y se muestra una parte de la imagen aumentada 2x con un aumento de 10x adicional en la parte inferior de la página. La figura 12 muestra la tira en la que se inyectó solución salina normal, mostrándose la imagen macroscópica en la esquina superior izquierda, un aumento de 2x en el centro y un aumento de 10x en la parte inferior. Cuando se comparan la figura 10, la figura 11 y la figura 12, se observa que la inyección de MMP-7 redujo significativamente la tinción en comparación con solución salina normal. Esto indica que la inyección de MMP-7 había destruido la estructura del núcleo pulposos. Por el contrario, con la inyección de solución salina normal sólo se encontró alteración de la estructura del núcleo pulposos en el sitio de inyección, y la tinción no se vio alterada. Por tanto, no se encontró destrucción de la matriz cartilaginosa.

45 En la figura 11 que muestran los resultados de la inyección de MMP-7, el núcleo pulposos en el que se inyectó MMP-7 aparece como una matriz degradada, pero los condrocitos normales se preservaron en las otras zonas del núcleo pulposos y en el anillo fibroso. Por tanto, se concluyó que los condrocitos normales conservaron su función de producir la matriz cartilaginosa y regenerar el disco intervertebral.

50 Ejemplo 4 Examen biológico molecular usando una hernia discal canina

De la misma manera que en el ejemplo 3, a un beagle (7 años, 14,0 kg de peso corporal) con hernia discal espontánea se le inyectaron 20 µg/200 µl de MMP-7 en el disco entre la 2ª vértebra cervical (C2) y la 3ª vértebra cervical (C3), y 200 µl de solución salina normal en el disco entre la 3ª vértebra cervical (C3) y la 4ª vértebra cervical (C4). Se extrajo la proteína de los discos una semana tras la inyección y se usó anticuerpo de proteoglicanos de cartilago adulto humano para el examen biológico molecular de la degradación del cartilago de los discos intervertebrales mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se ha confirmado la reacción cruzada de anticuerpo de proteoglicanos de cartilago de adulto humano con canino y se ha demostrado que el anticuerpo reconoce la proteína de núcleo y la cadena lateral de queratán sulfato.

60 Tras sacrificar el beagle, se extrajo inmediatamente la unidad vertebral y se almacenó en hielo. A continuación, se separó cuidadosamente el tejido intervertebral en el sitio objetivo usando un bisturí o similar para evitar la contaminación con el tejido circundante. Se puso el tejido de muestra en una placa de 10 cm y entonces se añadió una disolución que comprendía un comprimido con inhibidor de proteinasa (Roche: comprimido con cóctel de inhibidores de proteinasa) disuelto en 4 ml de una disolución tampón RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) y se machacó en la placa. La composición de la disolución tampón RIPA era tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 150 mM, Triton-100 al 1%, desoxicolato sódico al 0,5% y SDS al 0,1%. Tras agitar durante la noche a

4°C, se tomó la disolución en la placa y se centrifugó a 4°C, 3000 rpm durante 5 minutos. Se usó el sobrenadante como extracto de proteína para el experimento.

5 Como control positivo para el contraste con la proteína de disco intervertebral de beagle, se usó proteína extraída de cartílago de rodilla humana normal obtenido durante la extirpación quirúrgica de un tumor óseo que rodeaba la articulación de la rodilla.

10 Se ajustó la concentración de cada disolución de extracto de proteína mediante un ensayo de proteína y entonces se añadió tampón de muestra Laemmli, se hirvió la mezcla a 95°C durante 3 minutos y se llevó a cabo SDS-PAGE (80 V, 180 min.) usando gel al 12% (PAG Minigel, Daiichi Pure Chemicals). Entonces se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (0,1 A, 45 min.). Tras hacerlo reaccionar entonces con anticuerpo de proteoglicanos de cartílago de adulto humano de Chemicon (Temecula, CA, EE.UU.), se dio color al producto con un kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, R.U.). Los resultados se muestran en la figura 13. En la fotografía, M representa un marcador de peso molecular, PC representa el control positivo usando proteína extraída de cartílago de rodilla humana normal, C2/3 representa proteína extraída de un disco intervertebral en el que se había inyectado MMP-7, C3/4 representa proteína extraída de un disco intervertebral en el que se había inyectado solución salina normal y C5/6 representa proteína extraída de un disco intervertebral sin tratar (entre las vértebras cervicales 5ª y 6ª).

20 Las bandas de desde 40 kDa hasta 100 kDa representan la proteína de núcleo y las cadenas laterales de queratán sulfato que contienen el dominio G1. La ausencia de una única banda refleja la presencia de diversos productos de descomposición debido a la descomposición del proteoglicano mediante enzimas fisiológicas, dado que el espécimen era un espécimen clínico. En el caso del control positivo (PC) que usó proteína extraída de cartílago de rodilla humana normal, diversas enzimas degradadoras de proteoglicanos tales como las MMP y agreganasa estaban presentes y por tanto se detectaron productos de descomposición de proteoglicano. También se detectaron productos de descomposición de proteoglicanos con inyección de solución salina normal (C3/4) y la muestra sin tratar (C5/6). En comparación, la inyección de MMP-7 redujo claramente la cantidad de productos de descomposición de proteoglicano. Este resultado demuestra que las MMP-7 habían degradado el proteoglicano en la hernia discal.

30 El experimento de cultivo de órganos usando un espécimen de hernia discal extirpado quirúrgicamente (ejemplo 1) demostró claramente que la hernia discal se degradaba mediante MMP-3 y MMP-7. Además, el experimento de inyección en un disco intervertebral de conejo (ejemplo 2), el experimento de inyección en una hernia discal espontánea de beagle (ejemplo 3) y el examen biológico molecular usando una hernia discal canina (ejemplo 4) mostraron claramente que la degradación del disco intervertebral y la matriz de hernia discal se produce por la inyección en los discos intervertebrales de MMP-3 y MMP-7. Estos hallazgos confirmaron que MMP-3 y MMP-7 son eficaces para el tratamiento de una hernia discal.

#### Ejemplo de referencia

40 Una semana tras la inyección de quimopapaína en la hernia discal de un cánido, se sacrificó y se preparó y se tiñó una muestra patológica de la misma manera que en el ejemplo 3. En la figura 14 se muestran fotografías. En este caso, la matriz cartilaginosa se degradó por todo el núcleo pulposo y el anillo fibroso, sobreviviendo muy pocos condrocitos. Por tanto, se concluyó que la inyección de quimopapaína en el sitio de la hernia discal produce un daño a los condrocitos normales, reduciendo de este modo la capacidad regenerativa de discos intervertebrales en comparación con la inyección de MMP-7 según la invención.

#### Aplicabilidad industrial

50 El agente para el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales según la invención, mediante el cual se administra la proteasa derivada de ser humano MMP-7 directamente al sitio de una enfermedad asociada con la degeneración de los discos intervertebrales, permite curar dichas enfermedades rápidamente. Las enfermedades se seleccionan del grupo que consiste en hernia discal, lumbago, discopatía y espondilosis. Las proteasas derivadas de ser humano son sumamente superiores a las enzimas derivadas de plantas tales como quimopapaína que se han aplicado convencionalmente en la práctica clínica, porque no provocan reacciones inmunitarias graves tales como anafilaxia, y no dañan los condrocitos normales.

**REIVINDICACIONES**

1. MMP-7 o agente que comprende MMP-7 para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales, seleccionándose las enfermedades del grupo que consiste en hernia discal, lumbago, discopatía o espondilosis, administrándose MMP-7 o un agente que comprende MMP-7 directamente al sitio afectado por la enfermedad, y no usándose MMP-7 o un agente que comprende MMP-7 en combinación con una sustancia que induce angiogénesis para el tratamiento de hernias.  
5
2. Composición farmacéutica que comprende MMP-7 o un agente que comprende MMP7 para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales, seleccionándose las enfermedades del grupo que consiste en hernia discal, lumbago, discopatía o espondilosis, administrándose MMP-7 o un agente que comprende MMP-7 directamente al sitio afectado por la enfermedad, y no usándose MMP-7 o un agente que comprende MMP-7 en combinación con una sustancia que induce angiogénesis para el tratamiento de hernias.  
10  
15
3. Uso de MMP-7 o un agente que comprende MMP-7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas con la degeneración de los discos intervertebrales, seleccionándose las enfermedades del grupo que consiste en hernia discal, lumbago, discopatía o espondilosis, administrándose MMP-7 o un agente que comprende MMP-7 directamente al sitio afectado por la enfermedad, y no usándose MMP-7 o un agente que comprende MMP-7 en combinación con una sustancia que induce angiogénesis para el tratamiento de hernias.  
20

Fig. 1

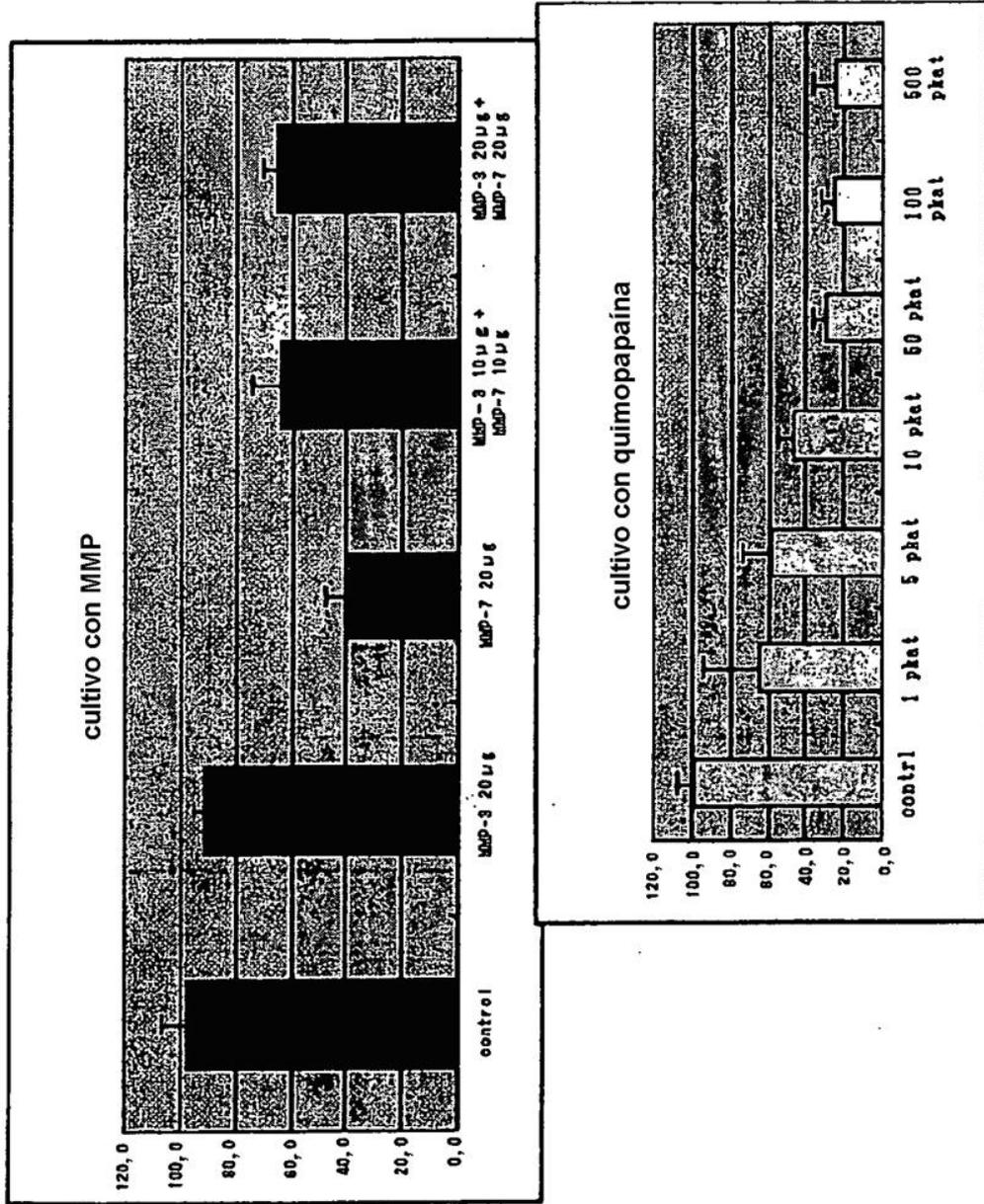


Fig. 2

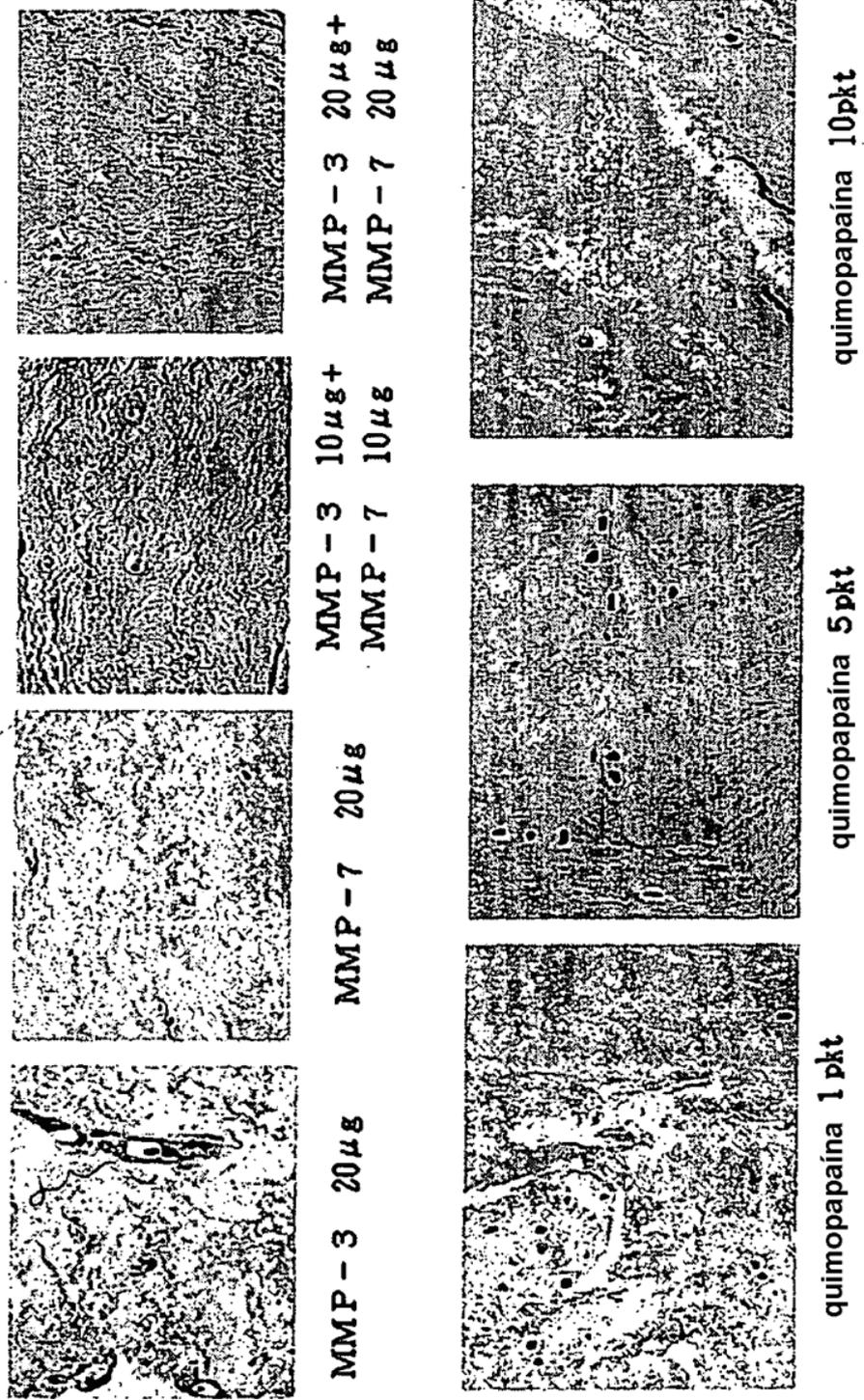


Fig. 3

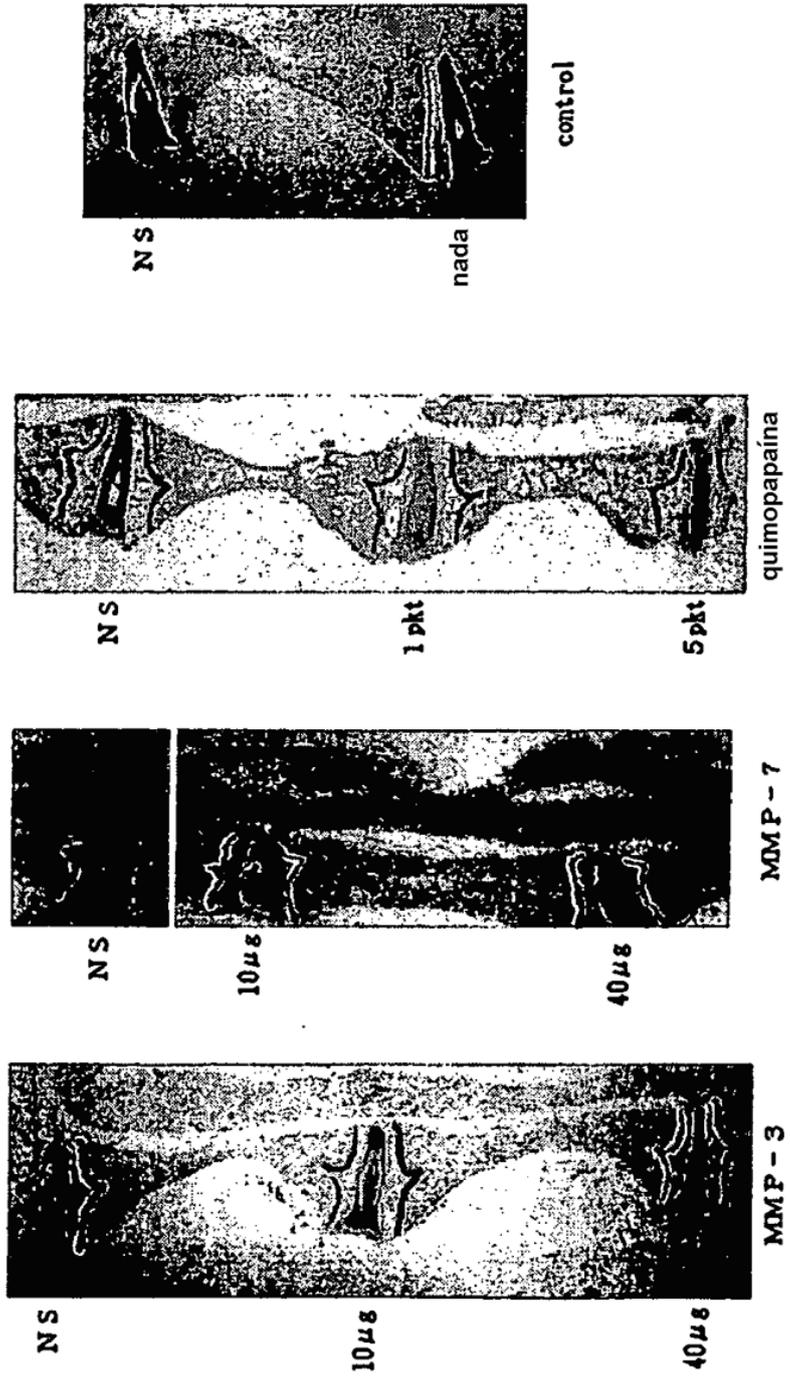


Fig. 4

Espécimen de hernia canina (HE)

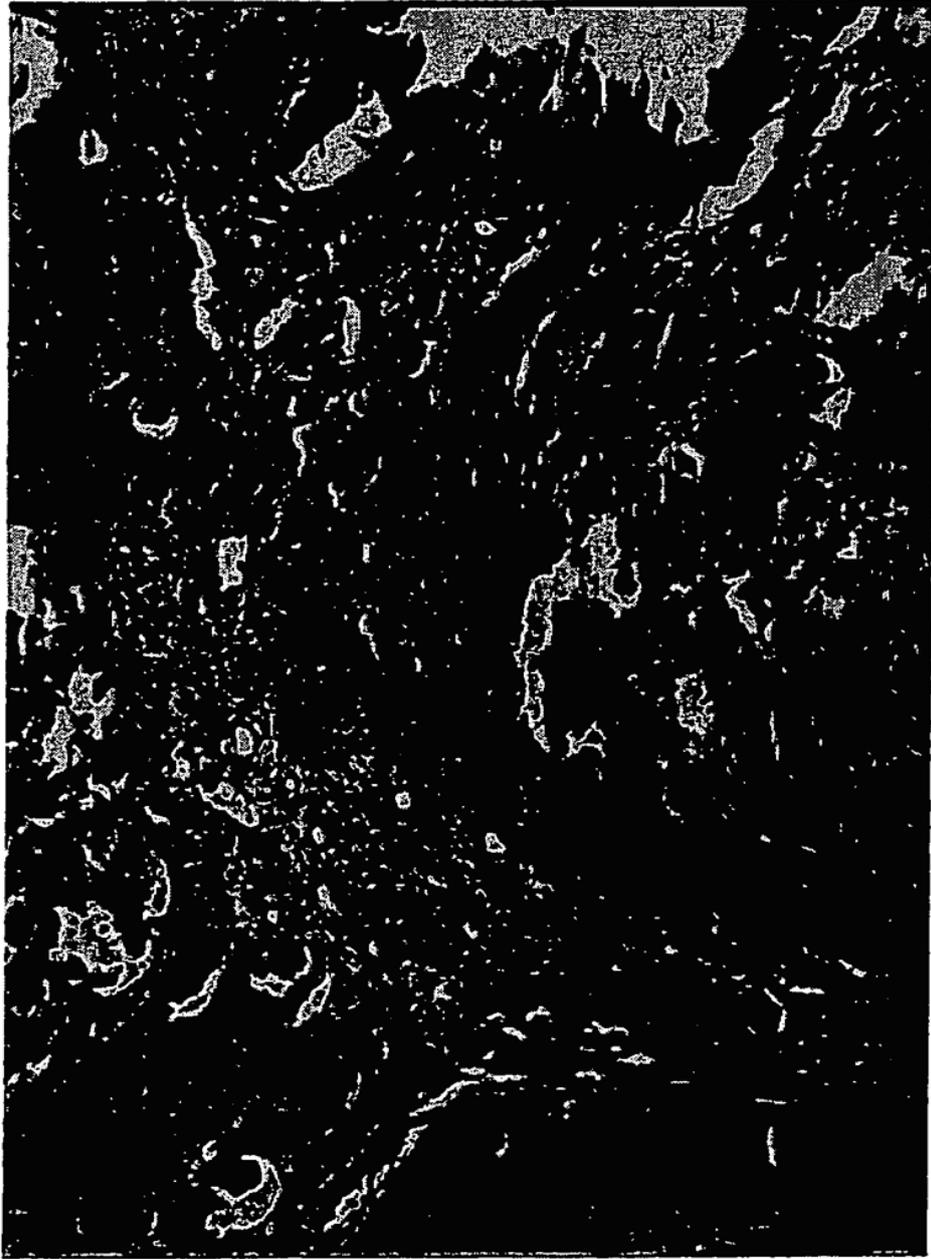
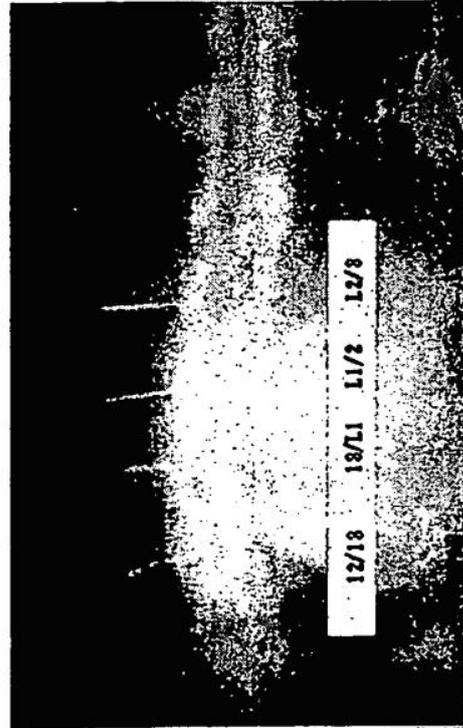
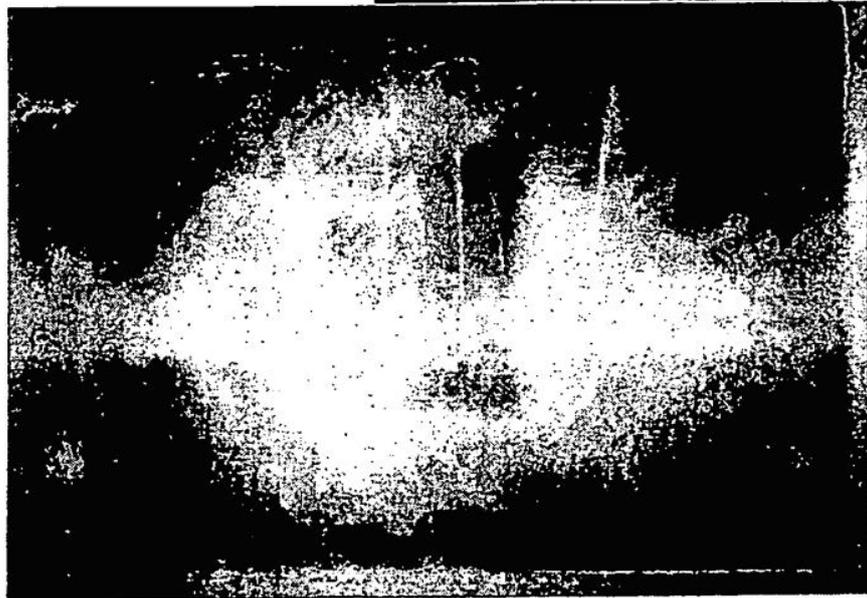


Fig. 5

### Administración de MMP-7

10/18  
Beagle n.º 2  
7 años, 12,75 kg  
**MMP - 7**  
12/18 MMP - 7 200  
18/1 100  
L1/2 100  
L2/3 NS 100



12/18 18/L1 L1/2 L2/3

Fig. 6

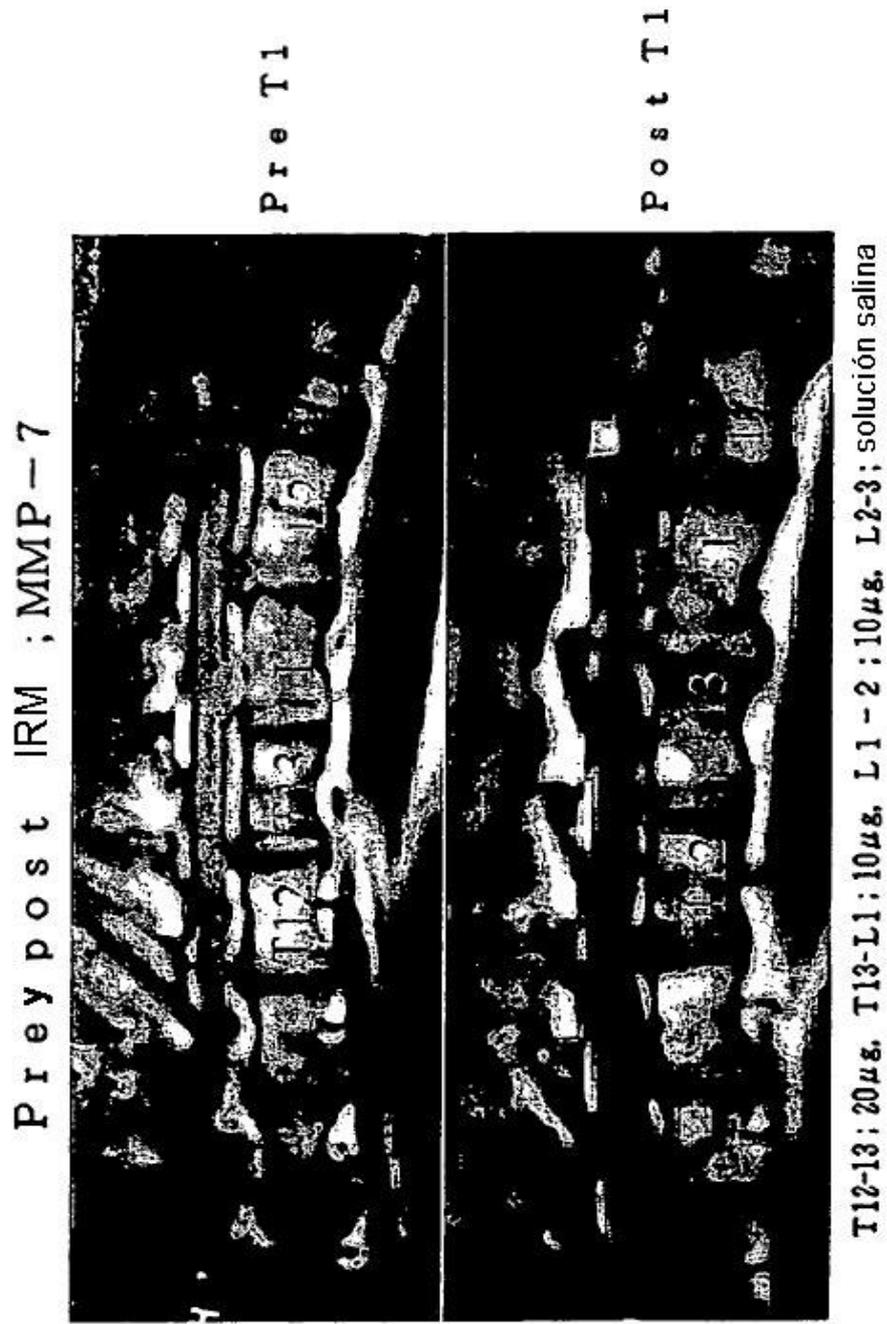


Fig. 7

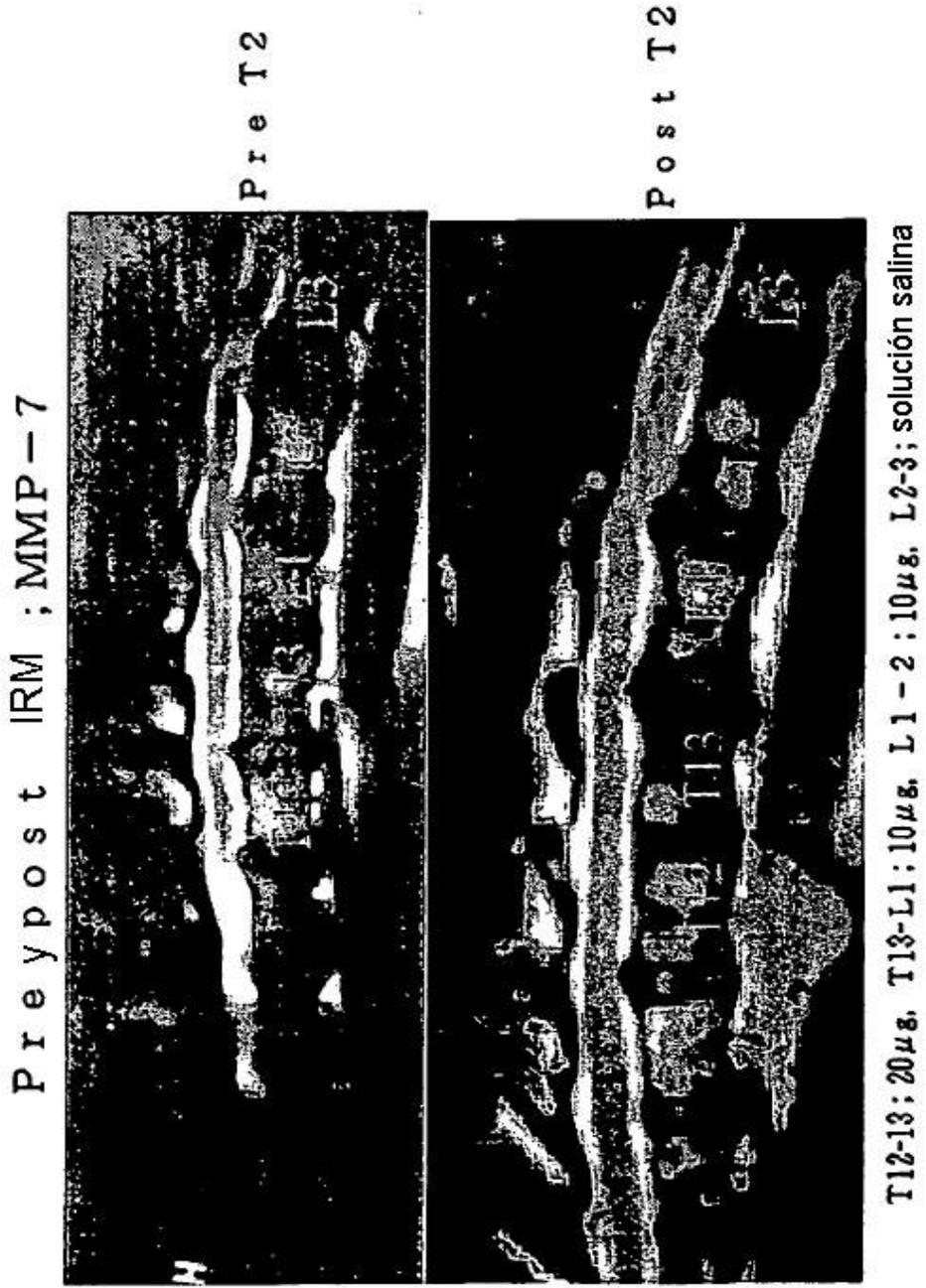


Fig. 8

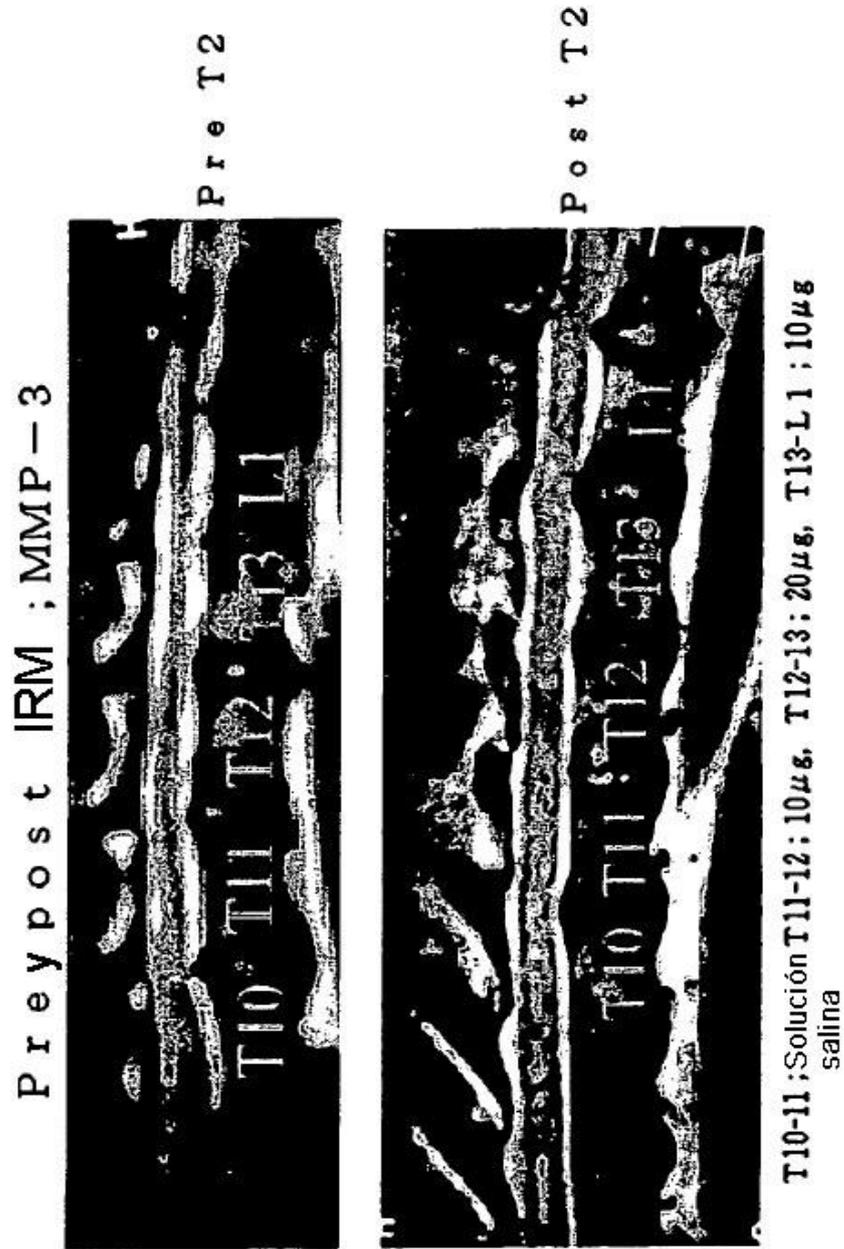


Fig. 9

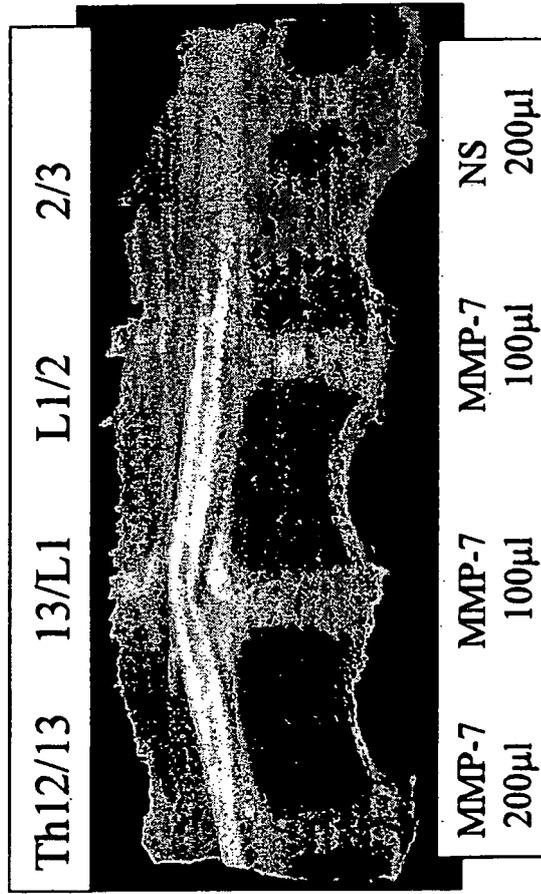


Fig. 10



Tras la inyección de NS



Tras la inyección de MMP-7  
Macro., tinción con safranina O

Fig. 11

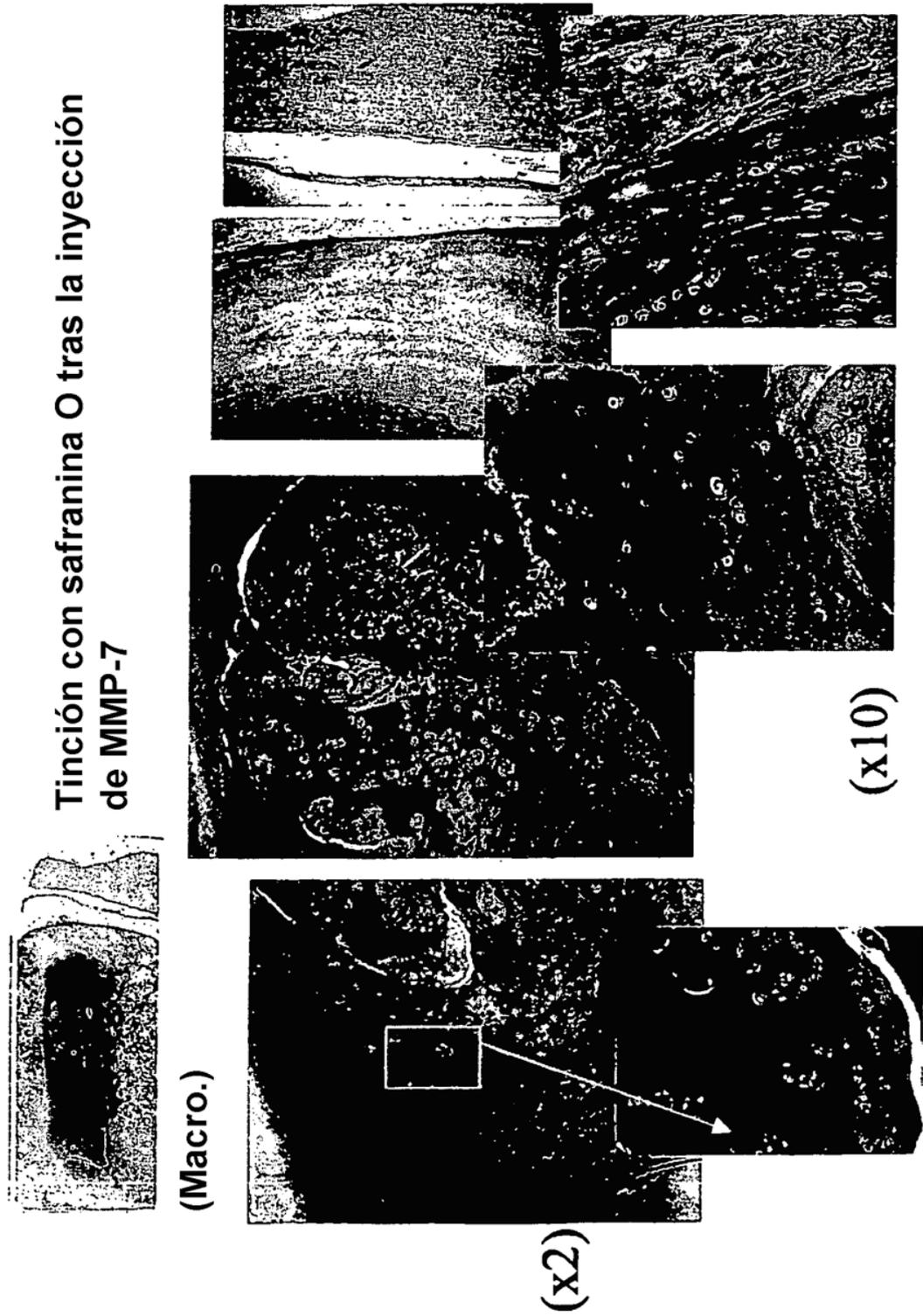
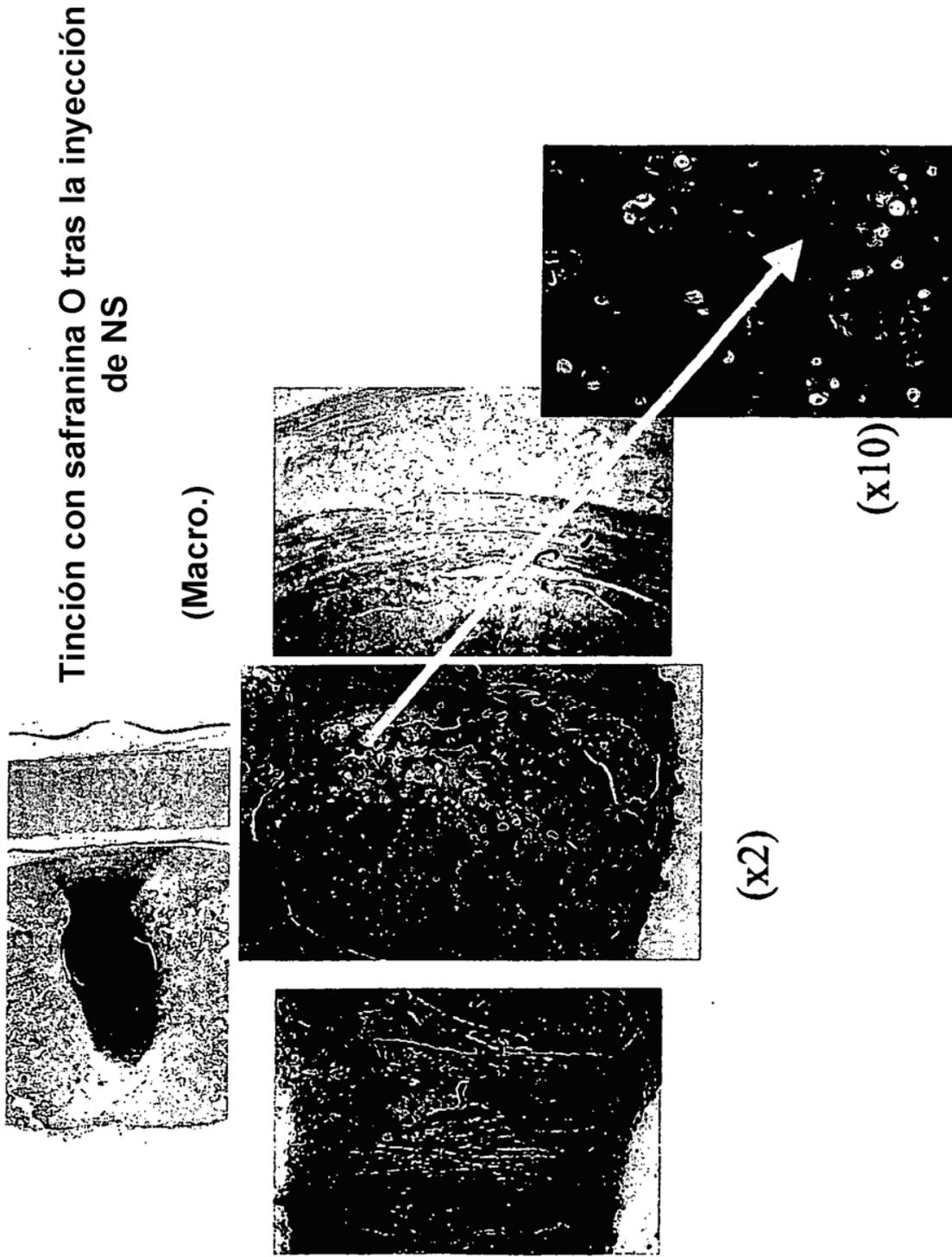
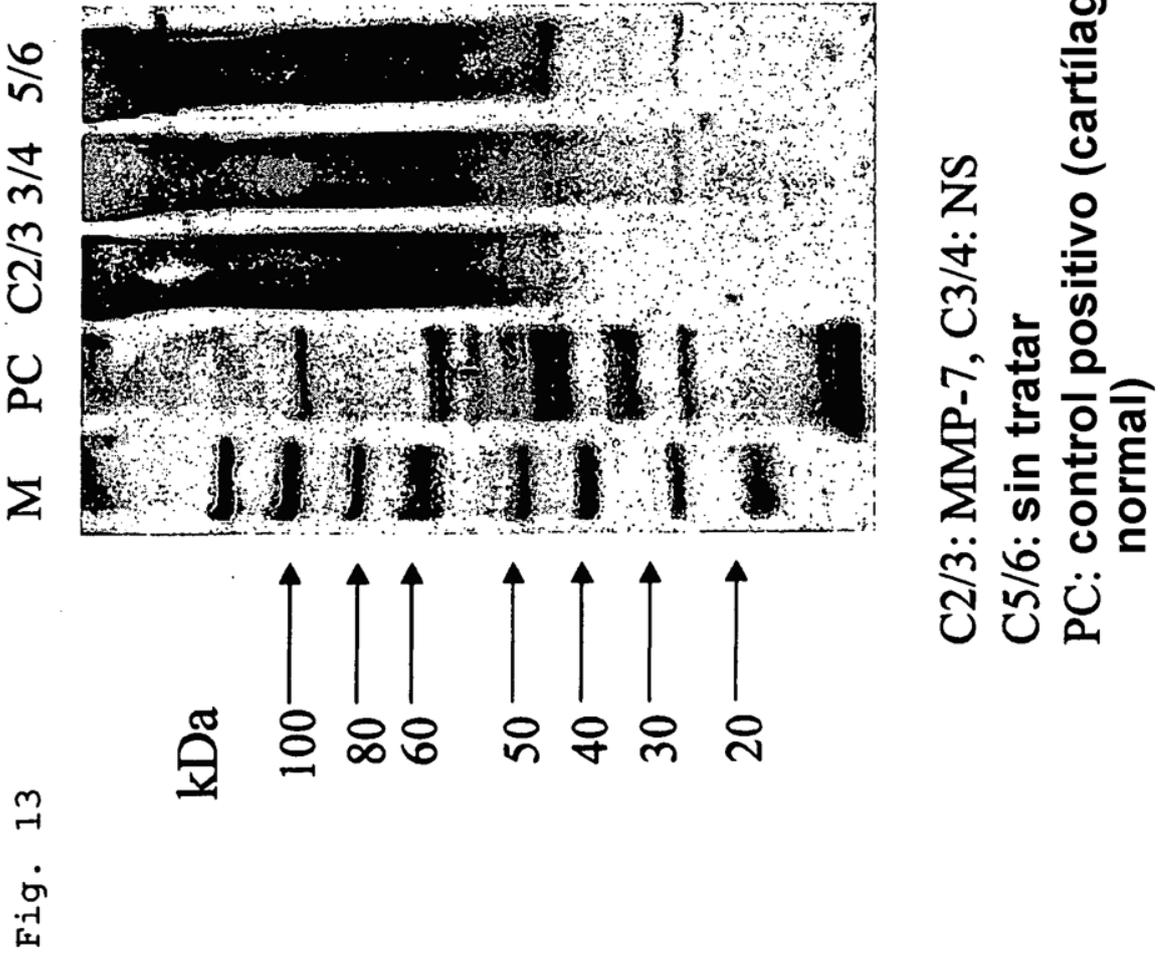


Fig. 12





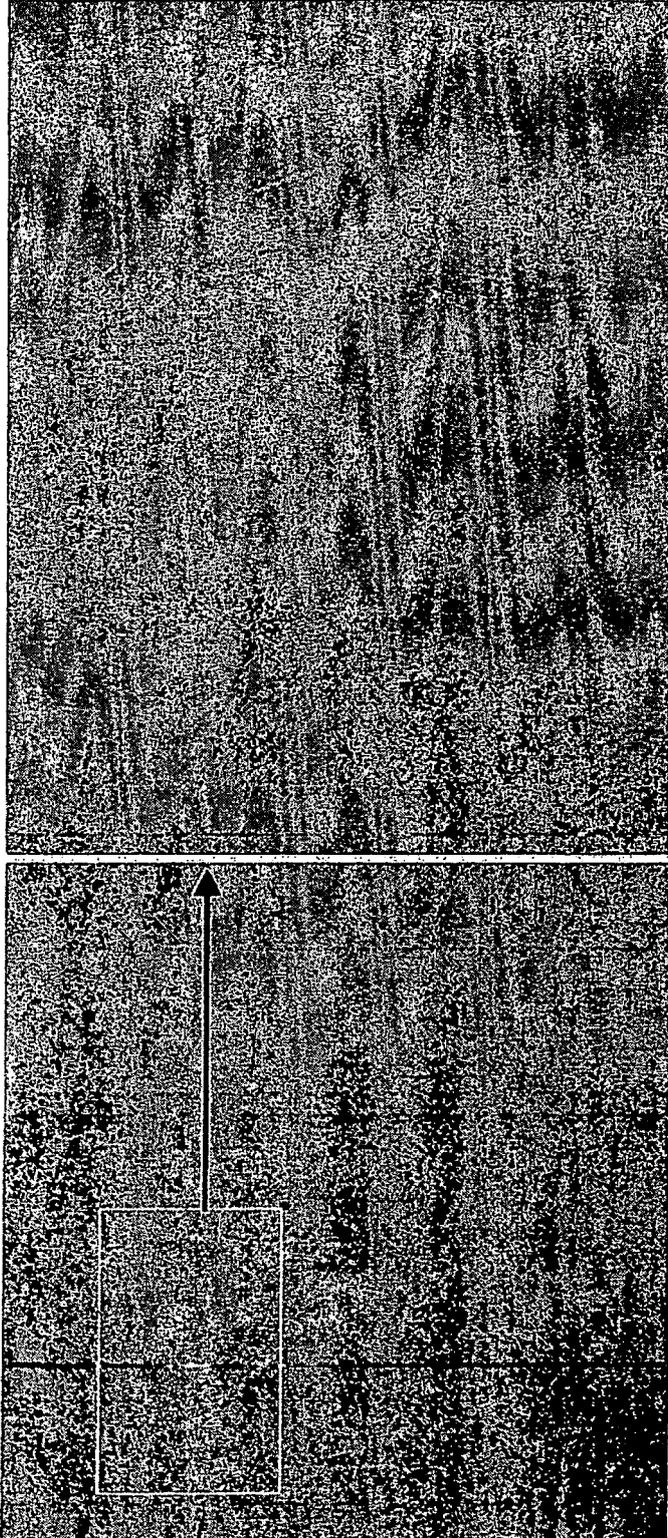


Fig. 14