

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 955**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2008** **E 08736676 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2127669**

54 Título: **Uso de la metaloproteinasa de matriz-10 (mmp-10) para tratamientos trombolíticos**

30 Prioridad:

26.02.2007 ES 200700501

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.12.2013

73 Titular/es:

PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
(100.0%)
Avenida Pio XII, 22. Oficina 1
31008 Pamplona (Navarra), ES

72 Inventor/es:

ORBE LOPATEGUI, JOSUNE;
RODRÍGUEZ GARCÍA, JOSÉ ANTONIO;
PÁRAMO FERNÁNDEZ, JOSÉ ANTONIO y
SERRANO VARGAS, ROSARIO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 434 955 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

Uso de la metaloproteinasa de matriz-10 (mmp-10) para tratamientos trombolíticos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen la metaloproteinasa de matriz-10 (MMP-10) y más particularmente, una combinación de MMP-10 y un activador del plasminógeno y a su uso para tratamiento y terapia trombolíticos.

Estado de la técnica anterior a la invención

10 El sistema hemostático es el encargado de mantener la fluidez circulatoria y prevenir la hemorragia en respuesta a un ataque vascular. La hemostasia fisiológica está controlada tanto por los mecanismos que promueven la coagulación y la formación de fibrina, como por los que favorecen su degradación o fibrinólisis. Una activación excesiva de la coagulación o un defecto de la fibrinólisis desembocan en la formación de coágulos que obstruyen los vasos sanguíneos (trombosis intravascular), causando isquemia y necrosis. Sin embargo, una situación general de hiperfibrinólisis favorecerá la aparición de hemorragias.

15 Las enfermedades cardiovasculares de naturaleza aterotrombótica constituyen hoy la principal causa de morbilidad-mortalidad. Dentro de este grupo de enfermedades, los procesos trombóticos constituyen el principal mecanismo desencadenante de los eventos cardiovasculares agudos de mayor relevancia clínica, como el infarto agudo de miocardio (IM) o el accidente cerebrovascular (ictus).

20 En consecuencia, todas las estrategias para el tratamiento de accidentes cardiovasculares y en general de los eventos trombóticos, deben promover necesariamente la recanalización rápida de la luz arterial obstruida por el trombo, para restaurar el flujo sanguíneo hacia los tejidos y evitar así un daño mayor. Es lo que se denomina comúnmente como terapia trombolítica.

Puesto que la fibrinólisis es el proceso bioquímico subyacente a la trombolisis, la terapia trombolítica busca en primer lugar favorecer la degradación de la red de fibrina que mantiene unido el coágulo.

25 Puesto que la plasmina es la enzima que cataliza la lisis y la degradación de la fibrina, el primer objetivo para lograr una rápida disolución del coágulo es maximizar la generación de plasmina.

Con este propósito, a partir de 1980 se introdujo el uso de los activadores del plasminógeno, capaces de activar la conversión del plasminógeno (proenzima inactiva) en plasmina activa: activador tisular del plasminógeno (tPA), activador del plasminógeno urocinasa (uPA) u otros agentes similares.

30 Baker [Clin. Appl. Trombosis/Hemostasis, 2002; 8:291-314] realiza una revisión del estado de la técnica en terapia trombolítica y de los agentes trombolíticos en uso o desarrollo, su aplicación clínica, así como ventajas e inconvenientes. En este documento Baker formula también las características que un agente trombolítico ideal debería cumplir: 1) trombolisis rápida, para la pronta restauración del flujo arterial o venoso; 2) especificidad por la fibrina, para que la fibrinólisis se limite a las áreas de trombosis aguda con una fibrinólisis sistémica reducida; 3) duración sostenida de su acción; 4) especificidad por el trombo, para evitar efectos sobre el fibrinógeno, otras proteínas de la coagulación y para no alterar la hemostasis primaria; 5) ausencia de efectos secundarios; y 6) bajo coste.

40 En el caso del infarto agudo de miocardio y de la isquemia cerebrovascular aguda (ictus) el éxito del tratamiento trombolítico conduce a un incremento en la supervivencia de los pacientes y a una mejor recuperación de la función del tejido isquémico [White HD et al.; N. Engl. J. Med., 1987; 317:850-855]; [Suwanwela N y Koroshetz WJ; Annu. Rev. Med., 2007; 58:89-106]. Desafortunadamente, el tratamiento fibrinolítico tiene fracasos y efectos secundarios.

Casi el 40 % de los pacientes con infarto agudo de miocardio no responden al tratamiento fibrinolítico y no consiguen una óptima recanalización de la arteria obstruida por el trombo [Armstrong PW and Collen D; Circulation, 2001; 103:2862-2866].

45 Para solucionar este problema actualmente, en lugar de la trombolisis farmacológica, se utiliza la angioplastia percutánea primaria como tratamiento de reperfusión, más eficaz que el tratamiento trombolítico en términos de reducción de mortalidad, reinfarto y hemorragia. Sin embargo en muchos casos no se puede utilizar la angioplastia (no disponibilidad de laboratorios de hemodinámica o distancia geográfica no asumible) y es entonces cuando se realiza tratamiento trombolítico. Por consiguiente, es deseable el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar la eficacia del tratamiento trombolítico, por ejemplo programas de tratamiento fibrinolítico prehospitalario, nuevos agentes trombolíticos (tenecteplase), o nuevas combinaciones farmacológicas (es decir, reducir el agente fibrinolítico a la mitad de la dosis y añadir un agente bloqueante del receptor plaquetario GP IIb/IIIa) [Brouwer MA et al.; Heart, 2004; 90:581-588]. Además existe una considerable mortalidad asociada con el tratamiento fibrinolítico debido a complicaciones hemorrágicas, sobre todo hemorragia del sistema nervioso central y hemorragias mayores, con una incidencia que oscila entre el 2 y 14 %.

En el caso de la isquemia cerebrovascular aguda el tratamiento trombolítico con tPA recombinante en las tres primeras horas siguientes al comienzo de los síntomas es el único esquema que ha demostrado alguna eficacia por sí mismo. Desafortunadamente, en el 25-30 % de los casos, el tratamiento fracasa, el trombo no se lisa y la arteria bloqueada no se permeabiliza. Además, el tratamiento con tPA presenta un porcentaje importante de complicaciones hemorrágicas (hasta el 5 % cursan con hemorragia sintomática) y muchos médicos temen esta complicación. Por esta razón, una gran mayoría de pacientes que podrían beneficiarse de este tratamiento no lo reciben. Otro problema asociado a la administración de tPA, potencialmente más grave que el riesgo hemorrágico, es la toxicidad sobre el sistema nervioso central que muchas veces es la responsable del fracaso terapéutico [Cheng T et al.; Nat. Med., 2006; 12:1278-1285]. Por lo tanto, reducir el riesgo hemorrágico de la administración de tPA podría cambiar la percepción de la seguridad de este fármaco y aumentar su uso. En consecuencia, sigue siendo necesaria la selección de agentes y combinaciones terapéuticas que permitan reducir la toxicidad del tPA, bien directamente o indirectamente, disminuyendo la dosis necesaria para tratar el ictus.

Puesto que existen otras enzimas diferentes a la plasmina que pueden degradar directamente el fibrinógeno y la fibrina, también se está investigando su potencial uso para el tratamiento trombolítico. Entre estas enzimas se incluyen proteasas endógenas de leucocitos (elastasa y cathepsina G), proteasas de venenos de serpientes, o de sanguijuelas, o proteasas de algunas bacterias.

En el documento EP1060747, se describe el uso de metaloproteinasas fibrinolíticas que exhiben una actividad significativa para cortar proteolíticamente y degradar la fibrina y el fibrinógeno. Entre estas metaloproteinasas fibrinolíticas se incluyen la MMP-2 (gelatinasa A), la MMP-3 (estromelisin 1), MMP-7 (matrilisina), MMP-9 y muy particularmente la metaloproteinasa de membrana MMP-MT1. Meses más tarde, Bini y colaboradores recogen y amplían estos mismos hallazgos [Biochemistry, 1999; 38: 13928-13936]. Sin embargo, ni en estos ni en otros trabajos posteriores se aportan datos sobre la eficacia de estas metaloproteinasas fibrinolíticas en la lisis y degradación de la fibrina que forma los coágulos, bien sea para obtener una más rápida disolución del coágulo, o bien sea proporcionando una mayor selectividad para la degradación de la fibrina en el coágulo respetando el fibrinógeno sistémico.

El objeto de la presente invención es proporcionar composiciones y combinaciones terapéuticas alternativas para el tratamiento trombolítico que favorezcan la lisis de los coágulos mediante una degradación selectiva de la fibrina y que ayuden a minimizar los efectos adversos asociados a otros tratamientos trombolíticos (hemorragias, toxicidad, etc.).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Ensayo de turbidimetría del plasma recalcificado expresado como los valores de absorbancia a 405 nm frente al tiempo que dura el experimento en minutos. **A:** La gráfica recoge las diferencias en la formación del coágulo (absorbancia máxima) del plasma solo (control) o en presencia de MMP-10 (200 nM) o MMP-3 (200 nM).; **B:** La gráfica representa la formación y lisis del coágulo de fibrina del plasma recalcificado en presencia de los activadores del plasminógeno tPA (30 U/ml) y uPA (135 U/ml) solos, o combinados con MMP-10 (200 nM) y también en presencia de una dosis equivalente de la MMP-3 (200 nM) combinada con tPA (30 U/ml).

Figura 2. Placa de fibrina polimerizada en la que se muestran las áreas de lisis producidas por el tPA (1 U/ml) y la MMP-10 (200 nM) solas, o añadidas en combinación unas con otras.

Figura 3. Ensayo de turbidimetría que ilustra la diferencia en el tiempo de lisis del coágulo de fibrina con distintas dosis de tPA (20, 25 y 30 U/ml). La combinación de MMP-10 (200 nM) con tPA (20 U/ml) acorta el tiempo de lisis en relación al activador solo.

Figura 4. Ensayo de actividad de la MMP-10 (100 nM) en plasma con un sustrato fluorescente de las estromelisin. La concentración de anticuerpo monoclonal (MAb) que inhibe la actividad de la MMP-10 en plasma se determinó mediante la reducción en la pendiente en la formación del sustrato. Como un control, se utilizó un anticuerpo control de isotipo IgG.

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

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

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere en primer lugar al uso o empleo de la metaloproteinasa de matriz-10 (MMP-10) en la preparación de un medicamento para tratamiento y terapia trombolítica.

La MMP-10, o estromelisin-2 se localiza en el cromosoma 11 y la expresan diversos tipos celulares como las células endoteliales, monocitos y fibroblastos [Madlener M and Werner S; Gene, 1997; 202:75-81]. Se sabe que

puede ser activada por plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G y puede degradar un amplio rango de sustratos de la matriz extracelular, como agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, tenascina-C, vitronectina y colágenos tipo II, III, IV, IX, X, XI. Además, la MMP-10 puede activar otras metaloproteinasas de matriz, como la proMMP-1, -3, -7, -8 y -9 [Nakamura H et al.; Eur. J. Biochem., 1998; 253:67-75].

- 5 Asimismo es conocido que la MMP-10 participa en diversos procesos fisiológicos, como el crecimiento óseo o la cicatrización de heridas. Además, se halla sobreexpresada en córneas de pacientes con retinopatía diabética y se ha relacionado con algunos tipos de carcinomas, así como con tumores linfoides. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que, en cultivos de queratinocitos, la expresión de MMP-10 puede inducirse tanto por factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, de queratinocitos o TGF-beta), como por citocinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-1beta) [Rechardt O et al.; J. Invest. Dermatol., 2000; 115:778-787]; [Li de Q et al.; Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003; 44:2928-2936].

Igualmente en divulgaciones anteriores a esta invención se ha descrito que la MMP-10:

- puede constituir un biomarcador inflamatorio de riesgo vascular [Montero I et al.; J. Am. Col. Cardiol., 2006; 47:1369-1378] [Orbe J et al.; J. Thromb. Haemost.; 2007; 5:91-97];
- 15 - se induce en células endoteliales que están formando capilares en matrices de colágeno 3D y participa en la regresión de la formación de capilares mediante la activación de la MMP-1 [Saunders WB et al.; J. Cell Sci., 2005; 118:2325-2340]; y que
- juega un papel fundamental en el mantenimiento de las uniones intracelulares que preservan la integridad vascular en los procesos de remodelado y angiogénesis [Chang S et al.; Cell, 2006; 126:321-334].
- 20 En la presente invención, se ha ensayado el efecto de la MMP-10 y de la MMP-3 en la formación y lisis de coágulos sobre plasma humano, así como en otros modelos *in vitro* de degradación de fibrina polimerizada.

- Los autores de la invención han podido comprobar que la MMP-10 no tiene una actividad trombolítica directa y que no es capaz de degradar por sí misma el fibrinógeno o la fibrina. Sorprendentemente, han comprobado también que, en presencia de agentes activadores de la trombolisis, particularmente activadores del plasminógeno, la MMP-10 favorece la disolución de los coágulos de fibrina y reduce el tiempo de lisis. La MMP-10 actúa por tanto como un facilitador o adyuvante de la acción trombolítica de otros activadores de la trombolisis.
- 25

Por el contrario, una metaloproteinasa de matriz fibrinolítica como la MMP-3, con actividad proteolítica directa sobre la fibrina y el fibrinógeno, no reduce los tiempos de lisis del coágulo que por sí solos proporcionan los activadores de la trombolisis.

- 30 En el contexto de la presente invención se entiende por "terapia trombolítica" aquella terapia que, en situaciones clínicas de isquemia de origen trombótico, busca la reperusión o restauración del flujo sanguíneo mediante la lisis y rápida disolución de los coágulos que obstaculizan la circulación y comprometen la función orgánica. Estas situaciones clínicas incluyen en particular la terapia trombolítica en el infarto agudo de miocardio, en las trombosis cerebrales (más particularmente el infarto cerebral agudo o ictus), así como otros tromboembolismos venosos (por ejemplo embolismo pulmonar o trombosis venosa profunda) y trombosis arterial periférica.
- 35

De un modo más particular la presente invención se refiere al uso o empleo de la MMP-10 y de un activador del plasminógeno en la preparación de un medicamento o composición farmacéutica para tratamiento y terapia trombolítica mediante administración simultánea, separada o secuencial.

- 40 En el contexto de la presente invención, un activador del plasminógeno es un compuesto que activa la conversión del plasminógeno inactivo en plasmina, mediante la ruptura del enlace peptídico entre Arg560 y Val561 del plasminógeno. En particular se incluyen entre estos activadores del plasminógeno: la urocinasa (uPA), el activador tisular del plasminógeno (tPA), la estreptocinasa y la estafilocinasa.

En una realización particular de la presente invención el activador del plasminógeno es tPA.

En otra realización particular el activador del plasminógeno es uPA.

- 45 En otra realización particular adicional, como activador del plasminógeno puede utilizarse un derivado o fragmento de los activadores del plasminógeno mencionados que conserve su capacidad de cortar y activar el plasminógeno y para el que el efecto facilitador de la MMP-10 sea efectivo. Un experto en la materia podrá comprobar fácilmente este efecto por sí mismo, por ejemplo mediante ensayos *in vitro* de formación y lisis de coágulos como los que se describen en los ejemplos 1 a 4 de la presente invención. Longstaff y Thelwell [FEBS Letters, 2005; 579: 3303-3309]
- 50 revisan algunos de los activadores del plasminógeno actualmente en uso o en desarrollo, entre los que el experto puede elegir, para su empleo en combinación con la MMP-10 según la presente invención.

Ventajosamente, la MMP-10 al no interaccionar con el fibrinógeno/fibrina circulantes y ser capaz de facilitar la acción de los activadores del plasminógeno, permitiría reducir la dosis del trombolítico manteniendo la eficacia para lisar el coágulo, pero sin inducir fibrinólisis sistémica, lo que conllevaría una menor incidencia de complicaciones

hemorrágicas. Asimismo, permitiría reducir la toxicidad derivada del tratamiento trombolítico con agentes como el tPA.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere también a una combinación farmacéutica que comprende, por separado o en una misma composición, MMP-10 y un activador del plasminógeno, mezclados con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. El activador del plasminógeno en la combinación puede ser cualquiera de los mencionados anteriormente.

Dicha combinación es útil para el tratamiento y terapia trombolítica en mamíferos, particularmente en seres humanos, en cualquiera de las situaciones clínicas ya mencionadas.

Los orígenes de la MMP-10 y del activador del plasminógeno de la combinación farmacéutica no constituyen un aspecto crítico de la invención. Los principios activos pueden obtenerse por extracción y purificación a partir de fluidos o tejidos biológicos mediante procedimientos de ingeniería genética o recombinante o por cualquier otra técnica convencional.

Dependiendo de las circunstancias, a determinar en cada caso mediante los ensayos farmacológicos y clínicos habituales, los ingredientes activos de la combinación farmacéutica pueden administrarse simultáneamente, separadamente o secuencialmente.

Según una realización de la invención, los principios activos (MMP-10 y activador del plasminógeno) pueden estar contenidos en una misma composición farmacéutica. En otros casos, los principios activos pueden estar contenidos en composiciones farmacéuticas separadas, cada uno de ellos en su propio recipiente mezclado con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas con los principios activos bien sea una o varias, pueden presentarse tanto en forma sólida (p.ej. liofilizados en viales para posterior reconstitución en una solución adecuada) como también en forma líquida.

En una realización particular, estas composiciones con los principios activos constituyen un kit para tratamiento o terapia trombolítica, que opcionalmente puede incluir otros componentes, tales como: contenedores con soluciones para la reconstitución de los principios activos, cánulas, goteros con suero fisiológico para aplicación intravenosa e instrucciones de uso, etc.

Las composiciones farmacéuticas con los ingredientes activos pueden administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral, rectal o tópica, para lo que incluirán los excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada.

En una realización particular, la administración es parenteral, por ejemplo mediante inyección intravenosa, o se administra localmente mediante cateterización para administración *in situ* en las proximidades del trombo.

Cuando la combinación farmacéutica sea para administración separada, ambos ingredientes activos podrán estar también contenidos en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración por vías diferentes.

Las cantidades de MMP-10 y de activador del plasminógeno que pueden estar presentes en las composiciones de la combinación farmacéutica proporcionada por esta invención pueden variar dentro de un amplio intervalo, pero siempre en cantidades terapéuticamente eficaces.

La dosificación para cada protocolo de tratamiento trombolítico con las composiciones de la combinación farmacéutica de la invención dependerá de numerosos factores, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la situación clínica a tratar, la ruta y frecuencia de administración y del activador del plasminógeno que en cada caso se vaya a administrar.

En una realización típica, las cantidades y dosificaciones del activador del plasminógeno serán menores a las que se utilizarían para ese mismo activador del plasminógeno cuando no se incluye MMP-10 en la combinación terapéutica. Por otra parte, las cantidades de MMP-10 se ajustarán en función del efecto que se desee conseguir: una mayor eficiencia trombolítica manteniendo las dosis del activador del plasminógeno; o una reducción de las dosis de activador del plasminógeno manteniendo la eficiencia trombolítica.

En otro aspecto, esta invención se refiere a una combinación farmacéutica o un kit de la invención, como ya han quedado descritos, para terapia trombolítica.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere también a un procedimiento para tratamiento y terapia trombolítica que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de MMP-10. En una realización particular, dicho procedimiento comprende también la administración de un activador del plasminógeno, bien sea por administración simultánea, separada o secuencial. Cualquiera de las composiciones y combinaciones farmacéuticas mencionadas anteriormente podrían utilizarse para este procedimiento.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del ámbito de la misma.

Ejemplos de la invención

Los ejemplos ilustran los efectos sobre la actividad fibrinolítica y trombolítica de las metaloproteinasas de matriz MMP-10 y MMP-3, bien sea directamente o en combinación con algunos activadores del plasminógeno: urocinasa (uPA) y activador tisular del plasminógeno (tPA).

5 Lo siguiente se ha empleado para los ejemplos:

- MMP-10 recombinante, obtenida como enzima de 58 kDa con un 20-30 % de enzima madura de 48 kDa (R&D Systems, 910-MP, Abingdon, Reino Unido), que se reconstituyó con tampón TCNB (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, CaCl₂ 10 nM, NaCl 150 mM, Brij35 al 0,05 %).
- 10 – MMP-3 recombinante, obtenida como proenzima de 52 kDa (R&D Systems, 513-MP, Abingdon, Reino Unido), suministrada en una solución con Tris 12,5 nM, CaCl₂ 5 nM, Brij35 al 0,025 % y glicerol al 50 %.
- Urocinasa (uPA) (Vedim Pharma SA; 628602, Barcelona, España).
- Activador tisular del plasminógeno (tPA) recombinante (Boehringer Ingelheim; 985937 Actilyse®, Ingelheim, Alemania).

15 Para la evaluación de la actividad trombolítica se utilizó un procedimiento turbidimétrico monitorizando la formación y lisis del coágulo de fibrina sobre muestras de plasma, de acuerdo con el protocolo descrito previamente por von dem Borne y colaboradores [Blood, 1995; 86:3035-3042].

Por otra parte, evaluando la actividad sobre la lisis de fibrina, se realizaron ensayos en placas de fibrina, siguiendo el procedimiento descrito por Edward [J. Clin. Path., 1972; 25: 335-337].

Ejemplo 1: efecto de la MMP-10 y MMP-3 en la formación y lisis de coágulos

20 Como se ha mencionado anteriormente, mediante el procedimiento descrito por von dem Borne y colaboradores, se llevó a cabo una evaluación del efecto de la MMP-10 y de la MMP-3 sobre el sistema hemostático. En este procedimiento, se valoran los cambios de turbidez/absorbancia durante la formación y lisis de coágulos como un indicador de la duración ambos procesos. La medida de la turbidez se realiza por lectura de la absorbancia a 405 nm durante las fases de formación y lisis de coágulos, utilizando un lector fotométrico, en nuestro caso un lector de ELISA (Fluostar Optima, BMG Labtech). El incremento de turbidez/absorbancia indica la formación del coágulo de fibrina, mientras que el descenso de este parámetro indica la lisis del coágulo.

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

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

35 En ensayos paralelos, se analizó también el efecto sobre la formación del coágulo con la MMP-3 (200 nM). En este caso la MMP-3 se activó previamente con acetato de p-aminofenilmercurio 1 mM (APMA, 164610, EMD Biosciences, La Jolla, EE.UU.) a 37°C durante 24 h.

40 Como se observa en la Figura 1A, la MMP-10 no indujo cambios ni en la velocidad de formación del coágulo ni en el máximo de turbidez alcanzada con ninguna de las dosis empleadas (Tabla 1). Sin embargo, la MMP-3 indujo un descenso del 50 % en el máximo de absorbancia/turbidez del coágulo formado, probablemente por su acción proteolítica directa sobre el fibrinógeno.

Estos resultados demuestran que la MMP-10, a diferencia de lo descrito para la MMP-3, no altera la tasa de formación del coágulo por no presentar actividad fibrinolítica frente al fibrinógeno.

45 Posteriormente, se estudió la tasa de lisis de coágulo de fibrina y para ello, como en el apartado anterior, se empleó plasma recalcificado en tampón HEPES al que simultáneamente con la MMP-10 (o MMP-3 en su caso) se añadió un activador del plasminógeno para elegir bien 30 U/ml de activador tisular del plasminógeno (tPA) o bien 135 U/ml de urocinasa (uPA) al comienzo de la turbidimetría.

Las concentraciones de tPA y uPA a utilizarse se determinaron en estudios anteriores de dosis-respuesta, donde la dosis de elección fue aquella que lisaba completamente el coágulo de fibrina en un plazo de dos horas (2 h).

50 Como se observa en la Figura 1B y tabla 1, la MMP-10 en ausencia de tPA y uPA no produjo la lisis del coágulo de fibrina, mientras que en presencia de los activadores tPA o uPA indujo un aumento significativo en la tasa de lisis del coágulo de fibrina. Con la máxima dosis de MMP-10 ensayada (200 nM) el acortamiento del tiempo de lisis (tiempo

al que se lisa la mitad del coágulo) fue de 15 min (52,9 min frente a 68,3 min, $p < 0,01$) en presencia de tPA y de 5 min en presencia de uPA (42 min frente a 47,5 min, $p < 0,05$). Esta reducción del tiempo de lisis supone un porcentaje de acortamiento de un 20 % en presencia del tPA y de un 10 % con el uPA.

Por el contrario, la MMP-3 no modificó la tasa de lisis del coágulo en presencia de tPA.

- 5 Estos resultados indican que la MMP-10, a diferencia de la MMP-3, no es capaz de digerir la fibrina pero sí aumenta el efecto fibrinolítico de los activadores del plasminógeno y de la fibrinólisis (tPA o uPA). La MMP-10, al no poseer capacidad para actuar sobre la fibrinólisis endógena, evitaría o atenuaría la aparición de hemorragias, lo que la convierte en un buen candidato para su utilización como coadyuvante de la terapia trombolítica.

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

	tPA 30 U/ml	tPA 20 U/ml	tPA 15 U/ml	uPA 135 U/ml
Control	68,3	102,0	125,3	47,5
MMP-10 50 nM	65,5	-	-	-
MMP-10 100 nM	61,2	-	-	-
MMP-10 200 nM	52,9	84,7	108,7	42,0
MMP-3 200 nM	76,3	-	-	-
Anti-MMP-10 (MAb)	No lisis	-	-	No lisis
Control isotipo (IgG)	74,3	-	-	48,3

Ejemplo 2: efecto de la MMP-10 en la degradación de fibrina

De acuerdo con el procedimiento de Edward mencionado anteriormente, se hizo un estudio del efecto sobre la lisis de fibrina midiendo el halo o área de lisis que se produce en una placa de fibrina polimerizada.

- 15 Las placas de fibrina se preparan a partir de una solución de 6 mg/ml de fibrinógeno humano (Sigma, F3879, Sant Louis, MO, EE.UU.) en tampón veronal (BioWhittaker, 12-624E, Cambrex, MD, EE.UU.) a 37°C, que se filtra y a la que se añade un volumen igual de CaCl_2 (50 mM). Esta solución (6 ml) se mezcla con 1 unidad internacional (unidades NIH) de trombina (Enzyme Research Lab; HT1200a, Swansea, Reino Unido) y se deja polimerizar durante 6 h.

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

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

Ejemplo 3: efecto de la coadministración de MMP-10 y un agente trombolítico (tPA o uPA) en la lisis de coágulos

Dado el efecto de la MMP-10 en la lisis inducida por tPA, se plantea la cuestión de confirmar si es posible reducir la dosis de tPA (que presenta problemas hemorrágicos y de toxicidad neurológica) y emplear la MMP-10 como un coadyuvante obteniendo el mismo efecto trombolítico.

En el ensayo de turbidimetría realizado según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 anteriormente, los autores de la presente invención encontraron que la presencia de MMP-10 (200 nM) en combinación con el tPA permite reducir la dosis de tPA un 33 % (de 30 a 20 U/ml) obteniendo el mismo tiempo de lisis de coágulo (Figura 3, tabla 1).

Este resultado indica que en un sujeto que necesite terapia trombolítica, la MMP-10 proporciona la ruta para aumentar la fibrinólisis y lisis del coágulo reduciendo simultáneamente la dosis de tPA y por tanto, minimizando los problemas de hemorragias y toxicidad producidos por este fármaco.

Ejemplo 4: inhibición de la fibrinólisis y lisis de coágulos inducida por tPA con anticuerpos anti-MMP-10

De acuerdo con los resultados de los Ejemplos 1 y 2, se hizo un análisis de la especificidad del efecto de la MMP-10 sobre la lisis de fibrina en el coágulo inducida por tPA añadiendo simultáneamente diferentes dosis de MMP-10

activa, en presencia (relación 1:2) y ausencia de un anticuerpo monoclonal que bloquea su actividad (R&D Systems, MAB9101, Abingdon, Reino Unido), o de anticuerpo control de isotipo murino IgG2B (eBioscience, 16-4732, San Diego, CA, EE.UU.) a la misma concentración que el anticuerpo.

5 La relación de enzima:anticuerpo que bloquea la actividad del enzima se analizó previamente en un ensayo de actividad para la MMP-10 en una microplaca tapizada con un anticuerpo anti-MMP-10 (R&D systems, Clon110343) y utilizando el sustrato fluorogénico de estromelisin (MCA-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nval-Trp-Arg-Lys-[DNP]-NH₂) (R&D systems; ES002, Abingdon, Reino Unido) [Lombard et al.; Biochimie, 2005; 87:265-272]. La fluorescencia (excitación a 320 nm y emisión a 405 nm) se midió en un espectrofluorímetro (SpectraMAX GeminiXS, Molecular Devices, CA, EE.UU.) durante 1 h habiéndose encontrado que la relación 1:2 inhibe completamente la concentración
10 de enzima activa (Figura 4).

Los resultados muestran que el efecto coadyuvante sobre la fibrinólisis es específico de la MMP-10, ya que se revierte en presencia del anticuerpo anti-MMP-10. Este efecto es bastante destacable cuando dicho anticuerpo se añade bloqueando la actividad endógena de la MMP-10 plasmática (Figura 5). Los resultados establecen que la ausencia de MMP-10 en el plasma impide la lisis del coágulo de fibrina incluso en presencia de tPA o uPA (Tabla 1).

15 Estos resultados se corroboraron en los ensayos sobre placa de fibrina polimerizada. Como se muestra en la Figura 6, en presencia del anticuerpo anti-MMP-10 se reduce el área de lisis producido por la combinación tPA:MMP-10 (91,2 % frente a 188,6 %), mientras que el anticuerpo control no tiene ningún efecto (184,6 %). Estos datos confirman que el empleo de un anticuerpo inhibidor de la MMP-10 bloquea la disolución farmacológica de coágulos de fibrina.

20

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de la metaloproteinasa de matriz-10 MMP-10 en la preparación de un medicamento para terapia trombolítica.
- 2.- Uso según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho medicamento además comprende un activador del plasminógeno seleccionado entre: activador del plasminógeno tisular tPA, el activador de urocinasa uPA, la estreptocinasa, la estafilocinasa y un derivado o fragmento de dichos activadores del plasminógeno que conserve su capacidad de activar el plasminógeno.
- 3.- Uso según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el medicamento es adecuado para la administración simultánea, separada o secuencial de dichos componentes.
- 4.- Uso según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el activador del plasminógeno está seleccionado entre: tPA y un derivado o fragmento de tPA que conserve su capacidad de activar el plasminógeno.
- 5.- Uso según la reivindicación 4, **caracterizado porque** el activador del plasminógeno es tPA.
- 6.- Uso según la reivindicación 2, **caracterizado porque** el activador del plasminógeno está seleccionado entre: uPA y un derivado o fragmento de uPA que conserve su capacidad de activar el plasminógeno.
- 7.- Uso según la reivindicación 6, **caracterizado porque** el activador del plasminógeno es uPA.
- 8.- Una combinación farmacéutica para administración simultánea, separada o secuencial, **caracterizada porque** comprende una metaloproteinasa de matriz-10 MMP-10 y un activador del plasminógeno mezclados con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, en los que el activador del plasminógeno está seleccionado entre: el activador del plasminógeno tisular tPA, el activador de urocinasa uPA, la estreptocinasa, la estafilocinasa y un derivado o fragmento de dichos activadores del plasminógeno que conserve su capacidad de activar el plasminógeno.
- 9.- Una combinación farmacéutica según la reivindicación 8, **caracterizada porque** el activador del plasminógeno es tPA.
- 10.- Una combinación farmacéutica según la reivindicación 8, **caracterizada porque** el activador del plasminógeno es uPA.
- 11.- Un kit **caracterizado porque** comprende la metaloproteinasa de matriz-10 MMP-10 y un activador del plasminógeno, como combinación farmacéutica para su administración simultánea, separada o secuencial para tratamiento trombolítico, en el que el activador del plasminógeno está seleccionado entre: el activador del plasminógeno tisular tPA, el activador de urocinasa uPA, la estreptocinasa, la estafilocinasa y un derivado o fragmento de dichos activadores del plasminógeno que conserve su capacidad de activar el plasminógeno.
- 12.- Un kit según la reivindicación 11, **caracterizado porque** el activador del plasminógeno es tPA.
- 13.- Un kit según la reivindicación 11, **caracterizado porque** el activador del plasminógeno es uPA.
- 14.- Metaloproteinasa de matriz-10 MMP-10 para su uso en terapia trombolítica.
- 15.- Una combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, para terapia trombolítica.

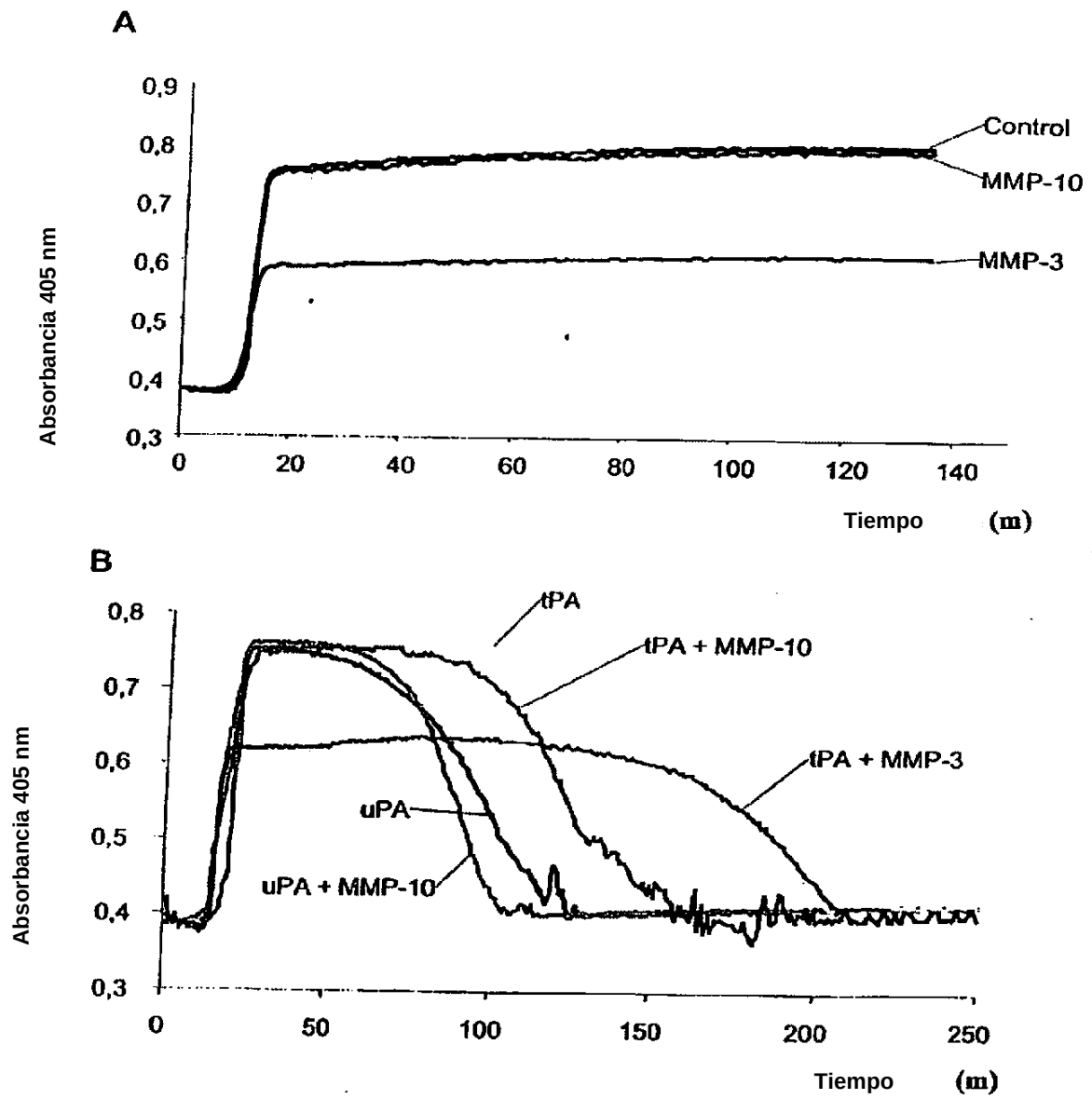


Figura 1

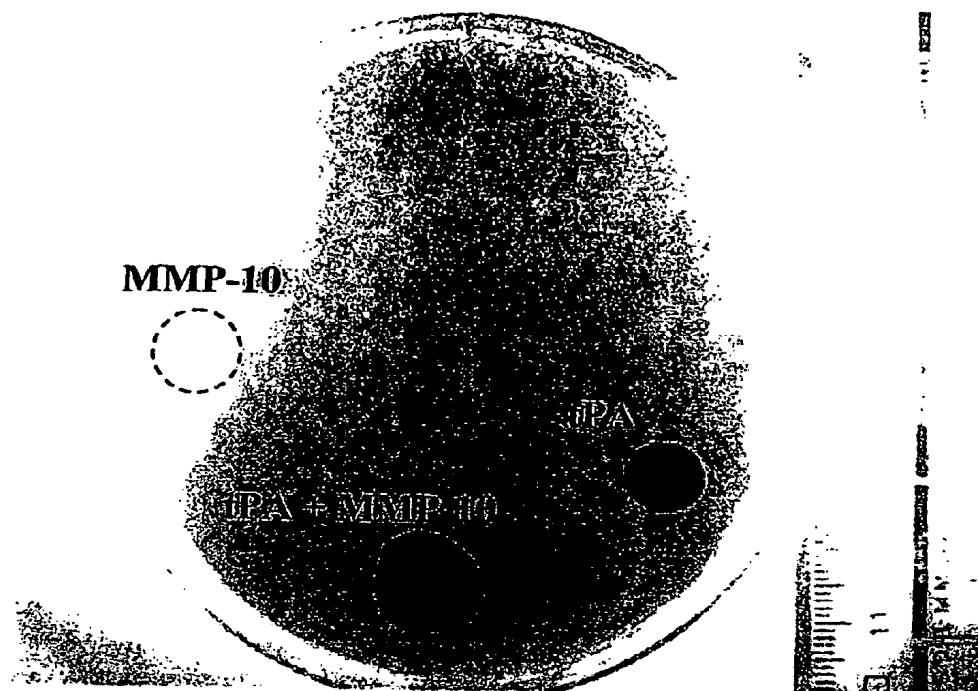


Figura 2

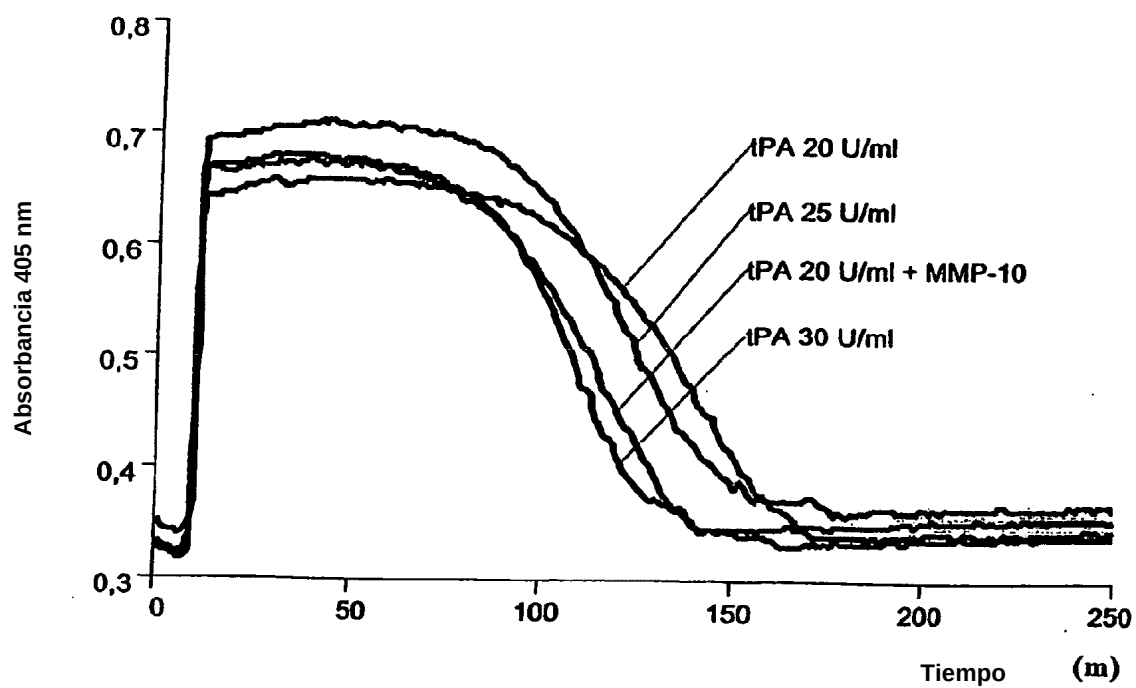


Figura 3

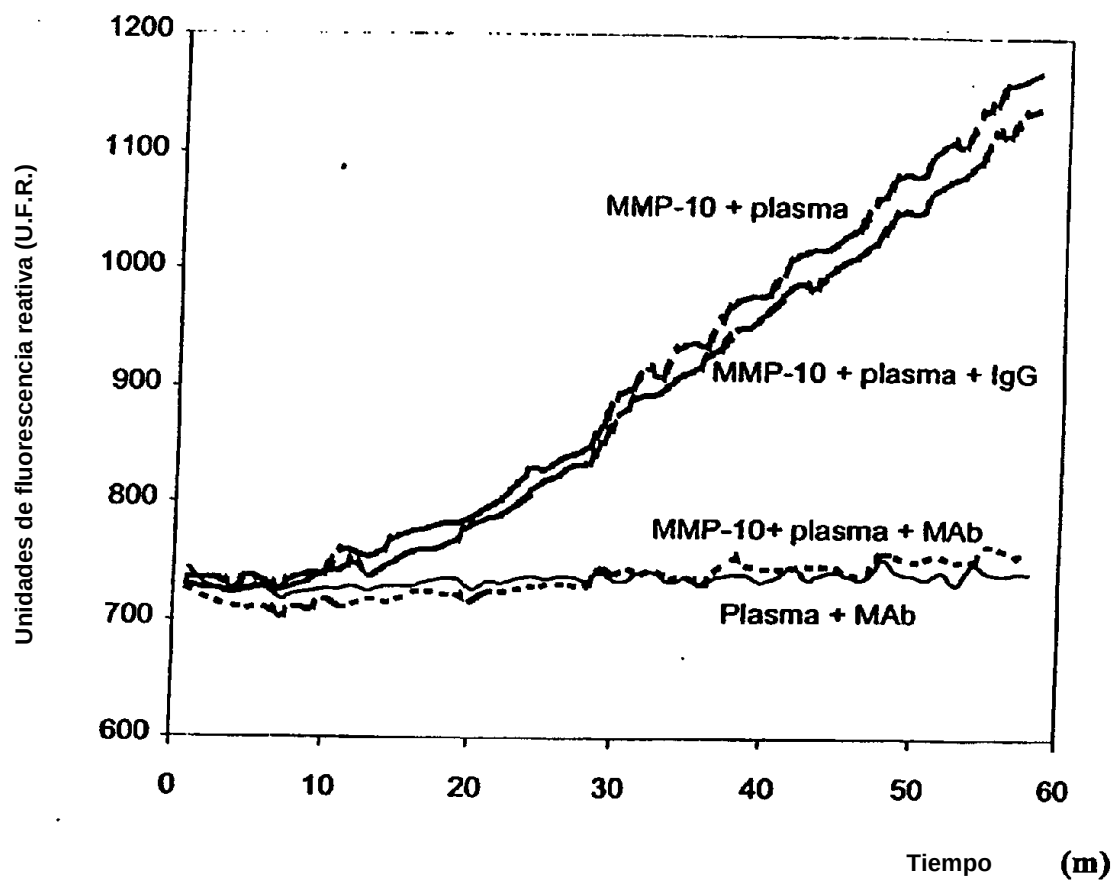


Figura 4

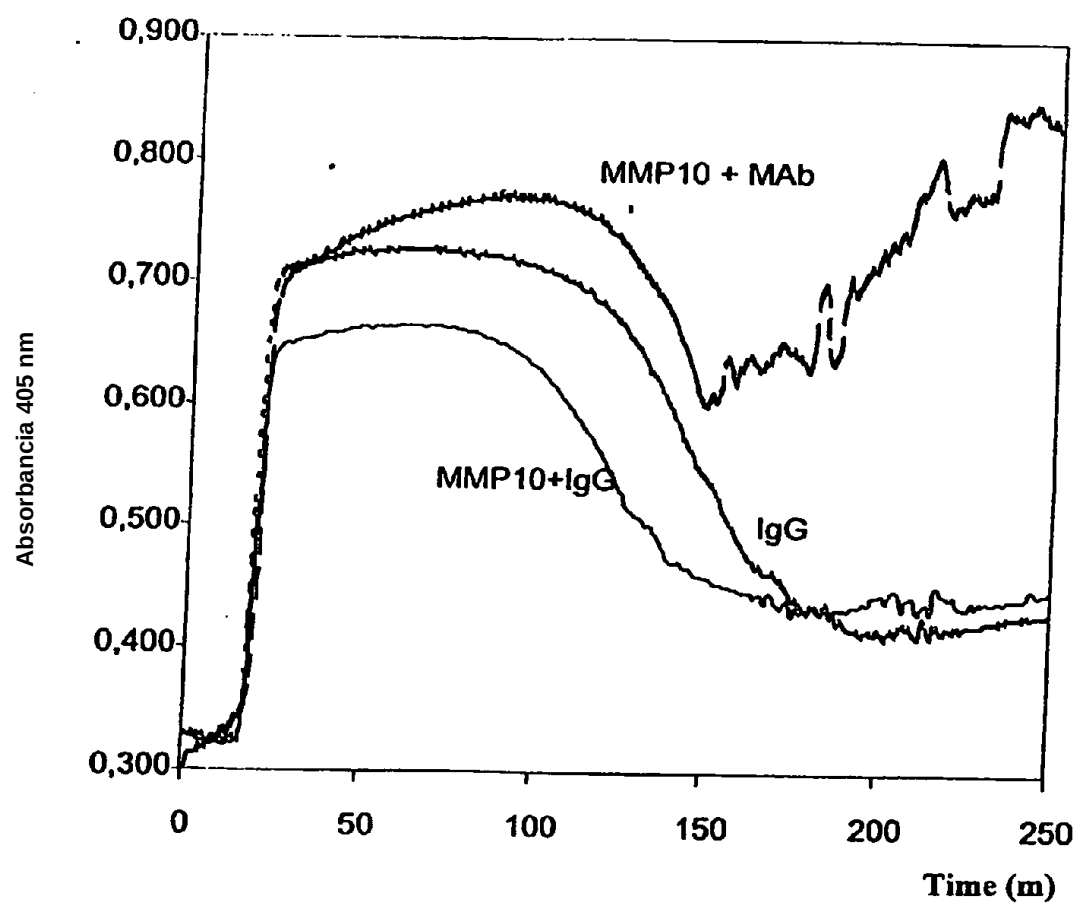


Figura 5

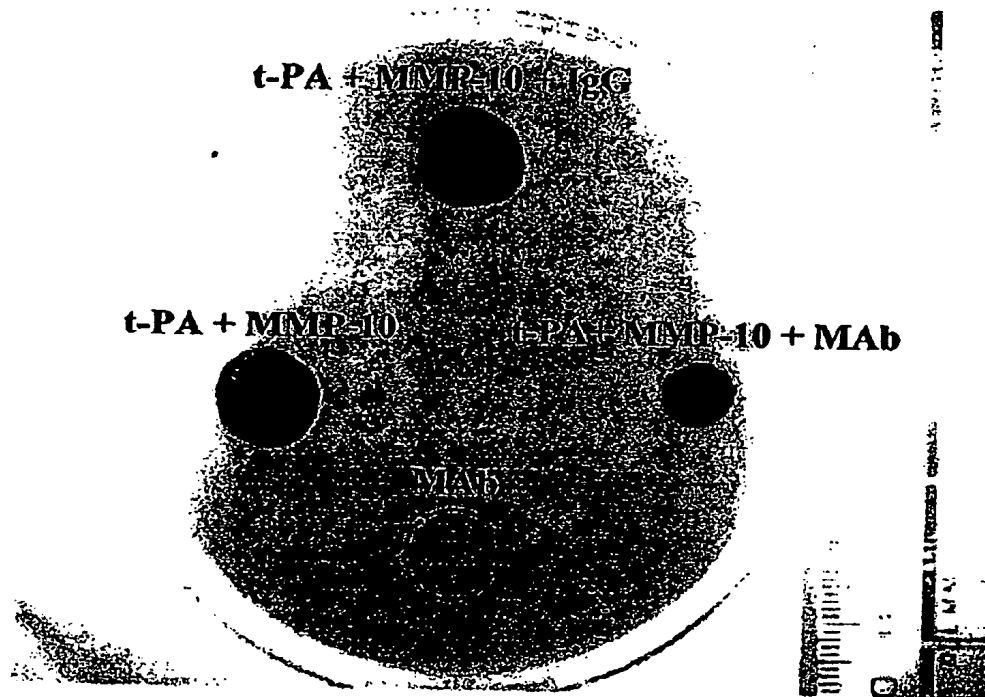


Figura 6