

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 964**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 38/58 (2006.01)

A61K 35/30 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/EP2012/056292**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12139970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12713961 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2697366**

54 Título: **Bivalirudina para la conservación de la funcionalidad celular en la terapia celular clínica**

30 Prioridad:

15.04.2011 DE 102011017208

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

13.02.2019

73 Titular/es:

**JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT,
FRANKFURT AM MAIN (100.0%)
Grüneburgplatz 1
60323 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**SEEGER, FLORIAN;
ASSMUS, BIRGIT;
DIMMELER, STEFANIE y
ZEIHER, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 699 964 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

Bivalirudina para la conservación de la funcionalidad celular en la terapia celular clínica

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para la terapia celular, las cuales comprenden células madres no embrionarias que son adecuadas para la terapia celular, y bivalirudina como único componente inhibidor de coagulación, en cuyo caso las células madres no embrionarias son células derivadas de la médula ósea (BMC). La presente invención se refiere además al uso correspondiente de este inhibidor de trombina, principalmente en el marco de la terapia celular para enfermedades cardiovasculares.

Antecedentes de la invención

10 En caso de intervenciones cardio-quirúrgicas no existe autorización para otro anticoagulante aparte de heparina. Por esto resulta problemática la necesidad de una operación en el corazón en pacientes con una trombopenia inducida por heparina (HIT), una enfermedad en la cual se forman anticuerpos frente a un complejo de heparina y factor de plaquetas 4 y que se asocia con complicaciones tromboembólicas masivas. A pesar de que el experimento se haya realizado con numerosas sustancias y, en el caso de pacientes con HIT, se haya propuesto una anticoagulación segura en intervenciones cardioquirúrgicas, estos experimentos generalmente se asocian con complicaciones hemorrágicas masivas ya que no se encuentra disponible un antídoto para ninguna de las sustancias alternativas.

15 Los inhibidores peptídicos de trombina han sido desarrollados a partir de hirudina, un polipéptido inhibidor de coagulación con 65 aminoácidos de la sanguijuela, *Hirudo medicinalis*. Estos tienen que administrarse por vía parenteral. La bivalirudina, un péptido con secuencia de 20 aminoácidos, es un inhibidor de trombina directo, bivalente reversible, con un tiempo breve de vida media de eliminación de aproximadamente 25 minutos. Bivalirudina inhibe la trombina enlazándose al centro activo y a la región del exosito 1. Esta inhibición es reversible puesto que la trombina disocia la bivalirudina y ambos fragmentos tienen una baja afinidad hacia la trombina.

20 En dos estudios grandes, multicéntricos, aleatorios, de doble ciego y controlados con placebo, la bivalirudina condujo a una reducción altamente significativa de complicaciones hemorrágicas severas. La actividad antitrombótica con respecto a puntos isquémicos típicos fue comparable en este caso a la terapia estándar con heparina. El manejo sencillo y el riesgo hemorrágico ostensiblemente más bajo, a la vez que una buena efectividad con respecto a puntos isquémicos finales hablan a favor del empleo de bivalirudina en el contexto de las intervenciones coronarias.

25 Los estudios y los metaanálisis correspondientes hasta la fecha permiten suponer que las BMC obtenidas de la médula ósea tienen una influencia positiva en la neovascularización y en las funciones cardíacas después de un infarto del miocardio agudo (Martin-Rendon et al., Lipinski et al., Schächinger et al.), en el caso de insuficiencia cardíaca crónica (Assmus et al.), en caso de angina refractaria (Losordo et al.), así como en el caso de enfermedad vascular arterial periférica oclusiva (Walter et al.). Tanto la elección de los pacientes, la cantidad y principalmente la actividad funcional (Britten et al., Walter et al.) de las células perfundidas parecen ser esenciales para el éxito de la terapia celular.

30 La actividad funcional de BMC se determina convencionalmente a base de su capacidad migratoria con la cual puede determinarse el "reclutamiento" y la capacidad para inmigrar ("homing") en el tejido diana, lo cual representa el fundamento para los efectos ventajosos en la neovascularización y regeneración funcional.

Hace poco fue mostrado que los diferentes protocolos para el aislamiento de células para la terapia celular tienen una influencia esencial en la actividad funcional de BMC (Seeger et al. 2007).

35 Se emplea heparina en la perfusión de células madre para el tratamiento de infartos de miocardio (Hirsch et al: "Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial" [Perfusión intracoronaria de células mononucleares de la médula ósea o sangre periférica comparada con terapia estándar en pacientes después de infarto de miocardio agudo tratado mediante intervención coronaria percutánea primaria: resultados del ensayo con HEBE, controlado, aleatorizado], European Heart Journal, GB, (2010)1210), volumen 32, No. 14, páginas 1736 - 1747.

40 Durante la preparación, almacenamiento y administración a pacientes es imprescindible una anticoagulación del producto celular para impedir la coagulación o la formación de trombos del producto celular y para eliminar el riesgo de una embolia microvascular durante la administración intraarterial de células.

45 Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones mejoradas para usar durante el aislamiento, la conservación y la aplicación de células para la terapia celular clínica y, principalmente, BMC.

Según un primer aspecto de la presente invención, este objetivo se logra mediante una composición farmacéutica para la terapia celular que comprende células madre no embrionarias que son adecuadas para la terapia con células

madre y bivalirudina como único componente inhibidor de coagulación, en cuyo caso las células madre no embrionarias son células derivadas de la médula ósea (BMC).

5 La invención se basa en el reemplazo de heparina como componente convencional de las composiciones farmacéuticas para la terapia celular ya que la heparina ha sido identificada de manera sorprendente como aquel componente que perjudica la capacidad migratoria de las células madre como, por ejemplo, las células mononucleares obtenidas de la médula ósea (BMC) debido al deterioro de la vía de señalización SDF-1 / CXCR4.

10 La quimiocina SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1 o factor 1 derivados de células estromales) y su receptor específico, el receptor de quimiocina 4 (CXCR4), desempeñan un papel decisivo en la neovascularización posnatal. SDF-1 se libera en respuesta a la hipoxia y recluta células vasculogénicas que expresan CXCR4 a los sitios de la isquemia (Ceradini et al.; Grunewald et al.; Salcedo et al.; Walter et al.; Zhang et al.). Hace poco se ha mostrado que la heparina no fraccionada, así como la heparina de bajo peso molecular, en concentraciones clínicamente relevantes inhibe el enlazamiento de receptor de CXCR4 y la respuesta al quimioatrayente SDF-1 en células cancerosas (Harvey et al., Ma et al.). Por lo tanto, el deterioro de la vía de señalización de SDF-1/CXCR4 pudo influir en la actividad funcional de BMC gracias a un tratamiento con heparina. En efecto, los experimentos mostraron una reducción ostensible, dependiente de la dosis, de la capacidad de invasión de BMC tratadas con heparina (respectivamente 20 U/l de heparina 16 ± 4 % de control, 2 U/l de heparina 27 ± 7 % de control $p < 0,05$) (véase la figura 1). De manera similar, otros anticoagulantes podrían deteriorar la interacción de SDF-1/CXCR-4.

20 Los inventores demuestran que usando bivalirudina como inhibidor de trombina clínicamente aprobado para la inhibición de coagulación no se deteriora la interacción mediada por SDF-1 con el receptor de CXCR-4, tal como ha sido medido mediante ensayos de migración (figura 1) y el análisis de la fosforilación de Akt, como de la señal efectora descendente de la activación de CXCR-4 mediante SDF-1 (figura 3). Con toda probabilidad, otros anticoagulantes a base de hirudina tampoco perjudican la funcionalidad de las células administradas para la terapia celular en caso de enfermedad cardiovascular.

25 Preferiblemente se administran células que, en el marco de la terapia celular en caso de enfermedades cardiovasculares, tienen una influencia positiva en la neovascularización, la función cardíaca después de infarto agudo de miocardio (Martin-Rendon et al., Lipinski et al., Schächinger et al.), en caso de insuficiencia cardíaca crónica (Assmus et al.), en caso de angina refractaria (Losordo et al.), así como en caso de enfermedad vascular arterial periférica oclusiva (Walter et al.).

30 Se prefiere una composición farmacéutica según la invención en la cual las células madre no embrionarias son células derivadas de médula ósea (BMC).

Otro aspecto de la presente invención se refiere luego a una composición farmacéutica de la presente invención para usar en el tratamiento de enfermedades. Además, se prefiere entonces una composición farmacéutica según la invención para usar en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, infarto de miocardio, y ciencia cardíaca crónica, angina refractaria y enfermedad vascular periférica arterial oclusiva.

35 El tipo correspondiente de administración, principalmente en el caso de terapia celular por medio de células mononucleares obtenidas de médula ósea (BMC), es conocido perfectamente en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Kang S, Yang YJ, Li CJ, Gao RL. Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. Coron Artery Dis. 2008 agosto; 19(5):327-35 y las publicaciones allí citadas).

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere entonces a un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica adecuada para la terapia con células madre, el cual comprende mezclar células aisladas, derivadas de médula ósea (BMC) con al menos bivalirudina como único componente inhibidor de trombina. El procedimiento comprende, además, la adición de otros aditivos y excipientes adecuados en el marco de la terapia con células madre tales como, por ejemplo, Ficoll, medio X-vivo, plasma solución de cloruro de sodio. En tal caso, todos los componentes se encuentran desprovistos de componentes inhibidores de coagulación que interfieran con la vía de señalización de SDF-1 / CXCR4, como heparina, por ejemplo.

50 Como ya se ha indicado, la actividad funcional de las células madre preparadas de manera correspondiente pueden medirse y, por lo tanto, verificarse mediante ensayos de migración (figura 1) y el análisis de la fosforilación de Akt como la señal efectora en dirección descendente de la activación de CXCR-4 mediante SDF-1 (figura 3). También son adecuados otros ensayos como, por ejemplo, coloraciones de vitalidad y la capacidad de las células para formar colonias (cfu). Todos estos ensayos son conocidos en el estado de la técnica.

Además, se prefiere un procedimiento según la invención que comprende además un almacenamiento adecuado de la composición farmacéutica. Esto puede realizarse en el medio durante una noche o enfriarse o congelarse de manera adecuada.

55 Otro aspecto de la presente invención se refiere entonces al uso in vitro de bivalirudina como único componente inhibidor de trombina durante la preparación y/o almacenamiento de BMC adecuadas para la terapia celular.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere entonces al uso in vitro de bivalirudina como reemplazo de la heparina en la preparación y almacenamiento de BMC adecuadas para la terapia con células madre.

5 Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere entonces a un procedimiento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, angina refractaria enfermedad vascular periférica, arterial, oclusiva, el cual comprende la administración de una composición farmacéutica según la presente invención al paciente. En tal caso se administran células que tienen una influencia positiva en el marco de la terapia celular en caso de enfermedades cardiovasculares. Los protocolos correspondientes de administración son conocidos en el estado de la técnica y en la bibliografía aquí descrita. El paciente es un mamífero, preferentemente un ratón, rata, simio o ser humano; más preferiblemente un ser humano.

10 La invención debe describirse ahora a continuación por medio de los ejemplos adjuntos, aunque sin limitarse a estos.

La figura 1 muestra la capacidad de invasión de BMC humanas inducida por SDF-1, dependiendo de la incubación con diferentes concentraciones de heparina o bivalirudina. * $p < 0,05$ vs. control, $n = 1-9$.

15 **La figura 2** muestra la capacidad de invasión de BMC humanas, inducida por SDF-1, dependiendo de la pre-incubación con heparina o bivalirudina, la cual fue retirada nuevamente después de 30 minutos. * $p < 0,05$ vs. control, # $p < 0,05$ vs. bivalirudina, $n = 3$.

La figura 3A muestra la proporción entre Akt fosforilada y Akt total de BMC después de estimulación con SDF-1 dependiendo de la pre-incubación con heparina (20U/ml) o bivalirudina (15mg/ml). * $p < 0,05$ vs. control, # $p < 0,05$ vs. SDF-1, § $p < 0,05$ vs. heparina, $n = 5$.

20 **La figura 3B** muestra la proporción entre Akt fosforilada y Akt total de BMC después de estimulación con SDF-1 dependiendo de la incubación previa con heparina (20 U/ml) o bivalirudina (15 µg/ml) relativo al control no estimulado referido. * $p < 0,05$ vs. control, # $p < 0,05$ vs. SDF-1, § $p < 0,05$ vs. heparina, $n = 5$.

No pudo encontrarse una inducción de apoptosis o de necrosis en las células.

Ejemplos

25 **Aislamiento y tratamiento de las células mononucleares de médula ósea (BMC)**

Las células mononucleares fueron obtenidas de material aspirado de médula ósea, filtrado y diluido con PBS, 1:5, de donantes sanos, voluntarios, mediante centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll (Biochrom AG; 800xg sin freno). Las células mononucleares (BMC) fueron lavadas tres veces con PBS, contadas y usadas para los experimentos.

30 Para la determinación de la capacidad de invasión, las células de médula ósea aisladas fueron incubadas durante 30 minutos dependiendo de la concentración con heparina (100U/ml - 0,05 U/ml) o bivalirudina (Angiox®; 7,5-30 µg/ml). Para una parte de los experimentos se retiraron heparina/bivalirudina dos veces con PBS después de la fase de incubación de 30 minutos en la incubadora.

Ensayo de invasión

35 Para determinar la actividad funcional de las células se usó una cámara de invasión de Boyden, modificada, llena de Matrigel (BioCoat Matrigel Invasion Assay, 8µm Pore Size, Becton Dickinson). 1×10^6 BMC se envasaron en 250 µl de medio x-vivo 15 (Lonza) en la cámara superior y la cámara se trasladó a una placa de 24 pozos que contenía 500 µl de medio x-vivo 15 con 100 ng/ml de SDF-1 (R&D). Después de 24 horas de incubación a 37°C se contaron las células transmigradas por medio de una cámara contadora de Neubauer. Todos los experimentos fueron realizados en valores duplicados.

40

ELISA de Akt

8x10⁶ BMC por lote fueron incubadas durante una noche a 37°C con heparina (20 U/ml), bivalirudina (15 mg/ml) o PBS en 500 µl de medio x-vivo 10. Después de pre-estimulación de 30 minutos con Ly294002 (25 µM, Sigma) se efectuó una estimulación con SDF-1 (2,5 minutos, 100 ng/ml). Las células fueron lavadas inmediatamente con PBS helado y la proteína fue aislada según indicaciones del fabricante del kit Akt-ELISA (Cell Signaling). Después de la dilución correspondiente de las muestras se efectuó la incubación en las placas de ELISA según las indicaciones del fabricante durante una noche a 4°C. al día siguiente, después de las etapas de lavado y detección, se detectaron los valores para Akt total y Akt fosforilada por medio de ELISA-Reader. Las figuras muestran la proporción entre Akt fosforilada y total.

45

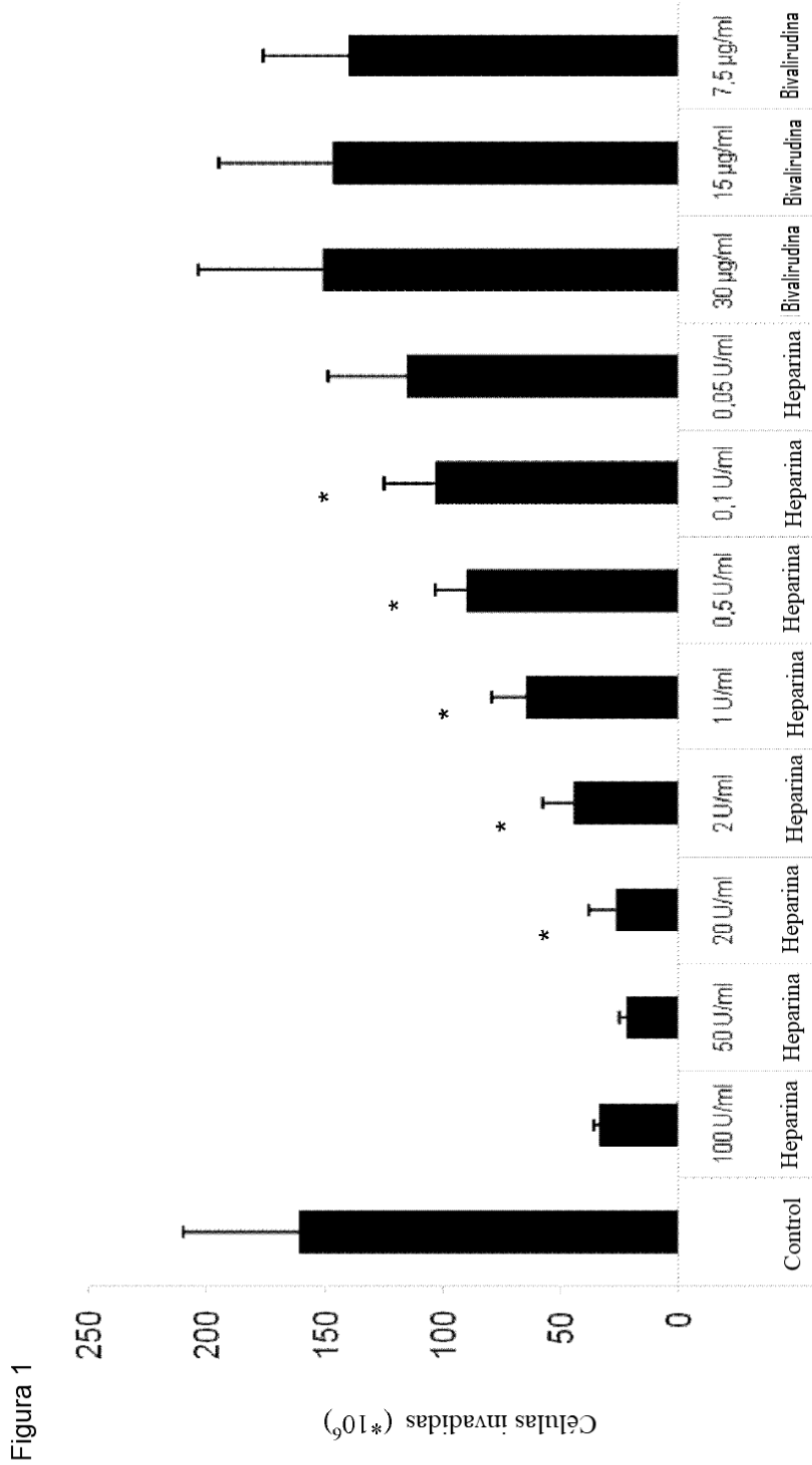
50 **Bibliografía citada**

Seeger, F. H., et al. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. Eur Heart J 28: 766-72, 2007

- Seeger, F. H., et al. CXCR4-expression determines functional activity of bone marrow-derived mononuclear cells for therapeutic neovascularization in acute ischemia. *ATVB* 29: 1820-09, 2009
- Walter, D. H., et al. Impaired CXCR4 Signaling Contributes to the Reduced Neovascularization Capacity of Endothelial Progenitor Cells From Patients With Coronary Artery Disease. *Circ Res* 97: 1142-51, 2005
- 5 Martin-Rendon E., et al. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J.* 29:1807-18, 2008
- Lipinski M.J., et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 18:1761-7, 2007
- 10 Schächinger V., et al. REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 355:1210-21, 2006
- Britten M.B., et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003 108:2212-8, 2003.
- 15 Ceradini, D. J., et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10: 858-64, 2004
- Grunewald, M., et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124: 175-89, 2006
- 20 Salcedo, R., et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor1alpha. *Am J Pathol* 154: 1125-35., 1999
- Zhang, M., et al. SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction. *FASEB J* 21: 3197-207, 2007
- 25 Harvey J.R., et al. Inhibition of CXCR4-mediated breast cancer metastasis: a potential role for heparinoids? *Clin Cancer Res.* 13:1562-70, 2007
- Ma L., et al. Modulating the interaction of CXCR4 and CXCL12 by low-molecular-weight heparin inhibits hepatic metastasis of colon cancer. *Invest New Drugs.* Nov 16. Epub ahead of print, 2010
- Walter DH, et al.; for the PROVASA Investigators. Intraarterial Administration of Bone Marrow Mononuclear Cells in Patients With Critical Limb Ischemia: A Randomized-Start, Placebo-Controlled Pilot Trial (PROVASA). *Circ Cardiovasc Interv.*4(1):26-37; 2011
- 30 Assmus B, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 355(12):1222-32; 2006
- Losordo DW, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation.* 115(25):3165-72; 2007
- 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica para la terapia celular, la cual comprende células madre no embrionarias, adecuadas para la terapia con células madre, y bivalirudina como único componente inhibidor de coagulación, siendo las células madre no embrionarias células derivadas de médula ósea (BMC).
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento de enfermedades.
3. Composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2 para el uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.
- 10 4. Composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 3, seleccionándose la enfermedad cardiovascular de infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca crónica, angina refractaria y enfermedad vascular periférica arterial oclusiva.
- 5 15 5. Composición farmacéutica para el uso según una de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el uso comprende la administración de la composición farmacéutica al paciente.
6. Procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica adecuada para la terapia con células madre, el cual comprende mezclar células madre no embrionarias aisladas, siendo las células madre no embrionarias células derivadas de médula ósea (BMC), con al menos bivalirudina como único componente inhibidor de trombina.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, que además comprende un almacenamiento adecuado de la composición farmacéutica.
- 20 8. Uso *in vitro* de bivalirudina como único componente inhibidor de trombina en la preparación y/o el almacenamiento de BMC adecuadas para la terapia celular.
9. Uso *in vitro* de bivalirudina como reemplazo de heparina en la preparación y el almacenamiento de BMC adecuadas para la terapia con células madre.



* p < 0,05 vs Control n=1-9

Figura 2

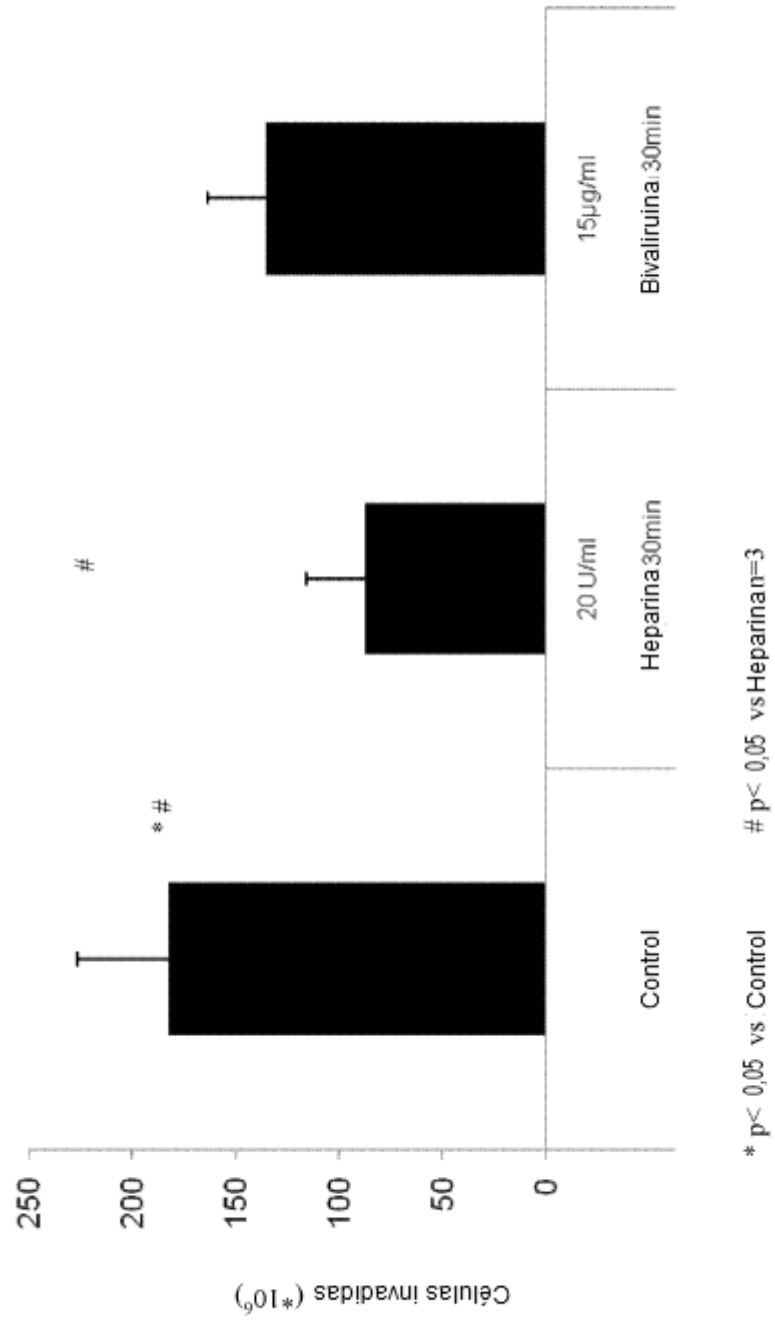


Figura 3A

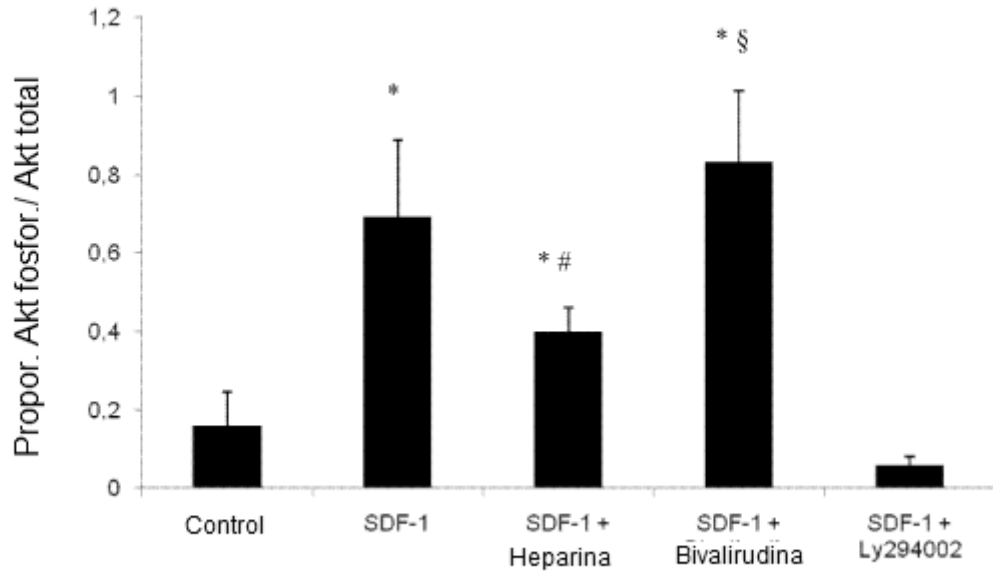
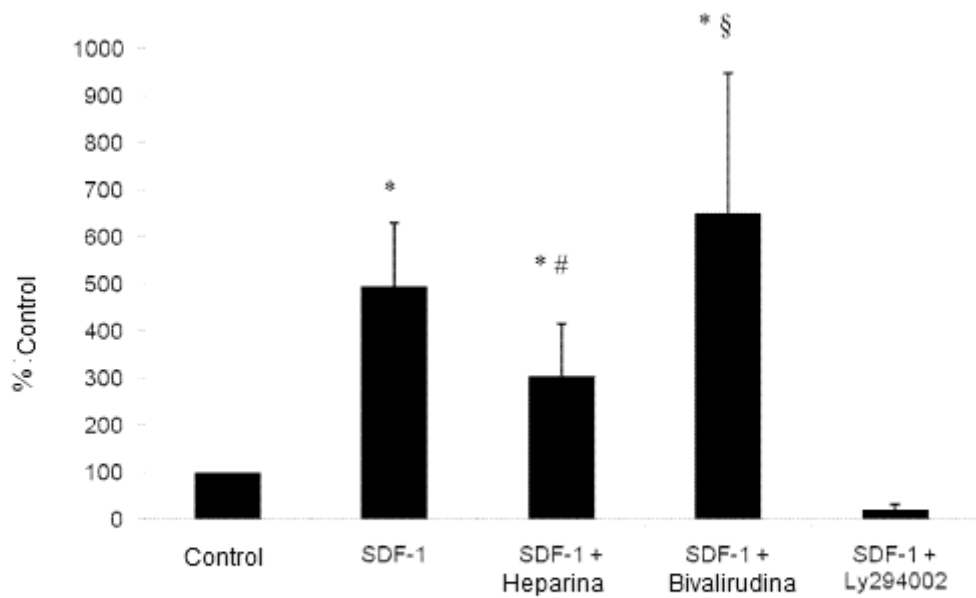


Figura 3B



* p< 0,05 vs Control

p< 0,05 vs SDF-1

§ p< 0,05 vs Heparinan=5