(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 290 058**

(51) Int. Cl.:
C12N 9/48 (2006.01)
C12N 9/72 (2006.01)
C12N 9/68 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **00978572 .6**
(86) Fecha de presentación : **13.11.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1232251**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.2002**

(54) Título: **Método de trombólisis por medio del suministro local de plasmina acidulada inactivada en forma reversible.**

(30) Prioridad: **13.11.1999 US 438331**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

(73) Titular/es: **Talecris Biotherapeutics, Inc.**
4101 Research Commons, Suite 300
79 T.W. Alexander Drive
Research Triangle Parck, North Carolina 27709, US

(72) Inventor/es: **Novokhatny, Valery, B.;**
Jesmok, Gary, J.;
Landskroner, Kyle, A.;
Taylor, Kathryn, K. y
Zimmerman, Thomas, P.

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Método de trombólisis por medio del suministro local de plasmina acidulada inactivada en forma reversible.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona generalmente con un método de trombólisis utilizando plasmina acidulada inactivada en forma reversible que está sustancialmente libre de activadores de plasminógenos y su suministro local de la plasmina acidulada proximal a, o directamente dentro de, un trombo. El método terapéutico es particularmente aplicable a la disolución de trombos donde quiera que sea factible la colocación de un catéter dirigido.

Antecedentes

La enfermedad trombótica es una causa principal de morbidez y de mortalidad en el mundo moderno. El infarto agudo al miocardio y el ataque isquémico fulminante son la primera y la tercera causas de muerte e invalidez en las sociedades occidentales. La trombosis oclusiva resulta en pérdida de flujo sanguíneo a los órganos vitales produciendo una privación local de oxígeno, necrosis celular y perdida de la función del órgano. Existen beneficios principales para la rápida destrucción de un trombo, resultando en una recanalización temprana: previene la muerte celular, reduce el tamaño del infarto, preserva la función del órgano y reduce la mortalidad temprana y tardía. La terapia trombolítica se administra ahora a más de 750.000 pacientes por año en todo el mundo, aunque muchas veces ese número podría potencialmente beneficiarse de tal tratamiento.

Los agentes trombolíticos utilizados hoy en día en la lisis de coágulos de sangre oclusivos son activadores del plasminógeno. Varios activadores diferentes de plasminógeno se encuentran actualmente disponibles para uso clínico inmediato y varios activadores nuevos del plasminógeno de nueva generación son objeto de estudios clínicos: el activador del plasminógeno tisular, tPA, y su sucesor de segunda generación TNK-tPA, RETEPLASE™ (un mutante de supresión de tPA), un activador del plasminógeno del tipo uroquinasa de cadena sencilla (scuPA, o prouroquinasa), uroquinasa (UK), estreptoquinasa (SK), y el complejo activador de la estreptoquinasa del plasminógeno anisoilado (APSAC). tPA, scuPA, y UK se encuentran normalmente en bajos niveles en los humanos. La estreptoquinasa es una enzima bacteriana con una potente actividad trombolítica. APSAC es un complejo estreptoquinasa-plasminógeno anisoilado. En todos los casos los activadores del plasminógeno son capaces de convertir el plasminógeno zimógeno a la plasmina proteasa activa. La ventaja ofrecida por tPA y scuPA (y, en menor grado, APSAC) es que su activación de plasminógeno es específica para la fibrina; el enlazamiento a la fibrina es un prerrequisito para que su actividad proteolítica se realice en forma completa (Haber y colaboradores, 1989). La uroquinasa y la estreptoquinasa pueden activar al plasminógeno en ausencia de fibrina. Tal variación en la afinidad por la fibrina tiene consecuencias importantes por lo que respecta al grado al cual ocurre el sangrado sistémico en modelos animales; estas diferencias, sin embargo, no han sido evaluadas clínicamente.

Los activadores del plasminógeno ejercen universalmente su potencial trombolítico por medio de la activación de la circulación del plasminógeno zimógeno en la plasmina. La plasmina, el principio de la enzima fibrinolítica en mamíferos es una proteasa serina con especificidad como la de la tripsina que se deriva del plasminógeno zimógeno precursor inactivo que circula en plasma. El plasminógeno por si mismo es un polipéptido de 791 aminoácidos que tiene un residuo de glutamato N-terminal. Los activadores del plasminógeno tal como el activador del plasminógeno tisular (tPA) o la uroquinasa escindirán la molécula de plasminógeno de cadena sencilla, para producir plasmina activa, en el enlace del péptido Arg^{561}-Val^{562}. Las dos cadenas de polipéptido resultantes de la plasmina se mantienen juntas por medio de dos puentes disulfuro entre cadenas. La cadena liviana de 25 kDa transporta al centro catalítico y es homóloga a la tripsina y a otras serina proteasas. La cadena pesada (60 kDa) consiste de cinco estructuras kringle de triple bucle con secuencias de aminoácidos muy similares. Algunos de estos kringles contienen a los así llamados sitios de enlazamiento de lisina que son responsables por la interacción del plasminógeno y de la plasmina con la fibrina, α_2-antiplasmina u otras proteínas.

El problema inherente con el uso terapéutico de los activadores existentes del plasminógeno tales como tPA, UK y SK son las complicaciones de sangrado asociadas con su uso, incluida, por ejemplo, la hemorragia intestinal hasta en un 20% de los pacientes. La hemorragia intracraneal, que es clínicamente la más seria, es un efecto secundario frecuente y letal de la terapia trombolítica actual, y se presenta aproximadamente en el 1% de los pacientes. El mecanismo para el sangrado es multifactorial y se cree que es debido al desenmascaramiento de una lesión vascular por lisis de un obturador hemostático protector y la consecuente perdida de la integridad vascular. Esto se combina con la activación sistémica del sistema fibrinolítico y su depauperación concomitante de los factores de coagulación. El enfoque de las investigaciones más recientes ha estado en la generación de los activadores modificados del plasminógeno que exhiben una especificidad mejorada por la fibrina; se esperaba reducir la cantidad de complicaciones por el sangrado. En algunos casos, estos nuevos activadores tienden a preservar los niveles en circulación de tales factores de coagulación tales como el fibrinógeno, los Factores VIII y V, el plasminógeno, y la α_2-antiplasmina. Ellos dirigen y se enlazan específicamente a las moléculas de fibrina que residen en un trombo, y actuarán únicamente sobre el plasminógeno cuando está enlazado así. Esto trae como resultado que el plasminógeno sea escindido por la plasmina de la proteasa activa únicamente en la vecindad de la trombosis y se reduce el nivel de escisión sistémica no específica de la fibrina. Sin embargo, el número de complicaciones por el sangrado con estos nuevos activadores del plasminógeno sigue siendo significativo.

El éxito clínico para drogas trombolíticas tales como el activador del plasminógeno tisular (tPA), la estreptoquinasa y la uroquinasa se establece por medio de la reducción del grado de una oclusión trombótica de un vaso vascular. Los activadores del plasminógeno han llegado a ser por lo tanto un tratamiento de escogencia en el manejo del infarto agudo del miocardio y de algunas otras condiciones trombóticas. Sin embargo, varios desordenes, incluido el infarto del miocardio, el ataque oclusivo fulminante, la trombosis venosa profunda y la enfermedad arterial periférica, permanecen como un serio problema clínico y los activadores conocidos del plasminógeno actualmente utilizados sufren de severas limitaciones que impactan su utilidad total en la eliminación de un trombo. En el infarto del miocardio, el flujo vascular se restablece dentro de 90 minutos en aproximadamente 50% de los pacientes, mientras que en una reoclusión coronaria aguda ocurre aproximadamente en 10% de los pacientes. La recanalización coronaria requiere en promedio de 45 minutos o más. La mortalidad residual, principalmente debida a hemorragia intracerebral, es aún al menos 50% del nivel de mortalidad en ausencia de tratamiento para la trombólisis.

La mayoría de las investigaciones en el área de los trombolíticos se ha enfocado en mejorar la eficacia y la especificidad de la fibrina de los activadores existentes del plasminógeno así como en el hallazgo de nuevos. Mucho de este esfuerzo se ha concentrado en dirigir a los activadores del plasminógeno hacia la fibrina que forma el armazón de un trombo y en mejorar las farmacocinéticas de los activadores cuando se los administra dentro del torrente sanguíneo. Esto permitiría su administración como dosis en bolos en vez de cómo un suministro continuo que prolonga la exposición del paciente al agente activo, y al riesgo acompañante de una hemorragia sistémica indeseable.

Con base en los resultados de la Fase II de los ensayos clínicos con los activadores del plasminógeno fijados como objetivo tales como TNK-tPA, el activador del plasminógeno de la saliva del murciélago vampiro, sin embargo, la mejora anticipada en los perfiles de seguridad de los nuevos activadores del plasminógeno no ha sido verificada clínicamente después de la terapia trombolítica. El porcentaje de episodios de sangrado moderado y más grande, incluidos la hemorragia intracraneal y el ataque fulminante, fueron comparables con el tPA original no modificado. Las arterias ocluidas no fueron abiertas más temprano, y la velocidad de las nuevas oclusiones se mantuvo inalterada. Parece que el único beneficio que estos activadores tienen es la prolongada vida media en el plasma y la posibilidad de administración en bolo.

Otro problema con los activadores del plasminógeno es que ellos tienen una limitada eficacia en el tratamiento de los coágulos grandes encontrados en las oclusiones arteriales periféricas (PAO). Estos trombos son típicamente viejos y pueden crecer hasta un tamaño significativo. El tamaño promedio de los trombos periféricos encontrados tanto en las arterias nativas como en los injertos es de 31 ± 11 cm. Los trombos envejecidos y encogidos son deficientes en plasminógeno, lo cual limita por lo tanto la susceptibilidad de los trombos viejos a la trombólisis inducida por el activador del plasminógeno. Es muy común para un paciente con PAO ser tratado durante 24 horas o más con uroquinasa y aún después de este período prolongado no tener la completa permeabilidad del vaso. El problema es mayor con el suministro de los agentes trombolíticos existentes a través de un catéter directamente en el interior del trombo donde existen niveles reducidos del sustrato del plasminógeno.

Una aproximación fundamentalmente diferente para evitar los problemas asociados con la administración sistémica de un activador plasminógeno para generar plasmina suficiente en el sitio del trombo, es administrar la plasmina misma directamente al paciente. Esto es debido a que la plasmina es finalmente la enzima que media la trombólisis iniciada por los activadores del plasminógeno. El suministro directo de plasmina activa directamente dentro de los trombos encogidos estrecharía la deficiencia inherente del plasminógeno de estos trombos y provee una trombólisis predecible, rápida y efectiva con independencia del contenido de plasminógeno.

Reich y colaboradores en la patente estadounidense No. 5.288.489, divulga un tratamiento fibrinolítico que incluye la administración parenteral de plasmina dentro del organismo de un paciente. La concentración y el tiempo del tratamiento fueron suficientes para permitir que la plasmina activa alcanzara una concentración en el sitio de un trombo intravascular que es suficiente para lisar al trombo o para reducir los niveles circulantes de fibrinógeno. Reich y colaboradores, sin embargo, requieren de la generación de la plasmina a partir del plasminógeno inmediatamente antes de su introducción dentro del organismo.

En contraste, Jenson en la patente estadounidense No. 3.950.513 divulga una preparación de un plasmina de porcino que se mantiene estable a un pH bajo. La solución de plasmina se neutraliza antes de la administración sistémica a humanos para terapia trombolítica.

Yago y colaboradores en la patente estadounidense No. 5.879.923 divulga composiciones de plasmina útiles como reactivos de diagnóstico. Las composiciones de Yago y colaboradores consisten de bajas concentraciones de plasmina a un pH neutro y un componente adicional que puede ser 1) un oligopéptido que contiene al menos dos aminoácidos, o 2) al menos dos aminoácidos, o 3) un aminoácido sencillo y un alcohol polihídrico.

La plasmina representa una segunda clase de mecanismo de agentes trombolíticos, distinta de la clase de los activadores del plasminógeno. Aunque la plasmina ha sido investigada como un agente trombolítico potencial, numerosas dificultades técnicas han evitado el uso clínico efectivo de esta enzima fibrinolítica. Estas dificultades incluyen el reto de preparar plasmina pura que esté libre de todas las trazas funcionales del activador del plasminógeno utilizado para generar plasmina a partir del precursor inactivo, plasminógeno. La actividad trombolítica de estas preparaciones tempranas de plasmina fue atribuida eventualmente a la presencia de activadores contaminantes del plasminógeno en vez de a la plasmina por si misma. Los activadores contaminantes del plasminógeno, sin embargo, también dispararon el

sangrado sistémico en sitios diferentes al del trombo fijado como objetivo. Una desventaja adicional de la estreptoquinasa utilizada para las preparaciones de plasmina es que su presencia en una preparación de plasmina a menudo causa respuestas inmunológicas adversas incluidas fiebre y choque anafiláctico.

La limitación más importante para el uso clínico de plasmina es que, como una proteasa serina con amplia especificidad, es muy propensa a la autodegradación y a la pérdida de actividad a pH fisiológico. Esto causa severos retos a la producción de una formulación estable de plasmina de gran calidad adecuada para períodos prolongados de almacenamiento antes de ser usada, y para una administración efectiva y segura de plasmina a pacientes humanos que sufren de trombos oclusivos.

Lo que se necesita, por lo tanto, es un método para administrar una forma estable de plasmina activa que éste sustancialmente libre de activadores del plasminógeno y que sea activa cuando encuentre una oclusión trombótica vascular objetivo.

Lo que también se necesita es un método de lisis de trombos que suministre directamente una forma activable de plasmina activa a través de un catéter en el interior del trombo.

Lo que se necesita además es un método de trombólisis en el cual un agente trombolítico administrado se restrinja al sitio trombótico y que exhiba una hemorragia sistémica y específicamente intracraneal.

Estos y otros objetivos y ventajas de la invención se harán completamente claros a partir de la descripción y de las reivindicaciones que vienen a continuación o se pueden aprender por medio de la práctica de la invención.

Resumen de la invención

Esta invención se relaciona con el descubrimiento de que se puede mejorar la terapia trombolítica por medio de la administración de plasmina acidulada inactivada en forma reversible directamente dentro, o próximo a, un trombo. La plasmina purificada es inestable a un pH fisiológico debido a la autodegradación y, por lo tanto, la plasmina no ha estado fácilmente disponible para administración terapéutica. La presente invención provee un método para administrar una dosis terapéutica de una composición fibrinolítica a un humano o animal que tenga una oclusión vascular trombótica, que comprende la administración de una dosis terapéutica de una composición fibrinolítica acidulada e inactivada en forma reversible, farmacéutica aceptable y sustancialmente libre del activador del plasminógeno. La presente invención provee además un método de administrar una dosis terapéutica de una composición fibrinolítica acidulada e inactivada en forma reversible que comprende plasmina y un excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable, en donde el excipiente farmacéuticamente aceptable tiene una baja capacidad de amortiguación.

La presente invención también provee un método para administrar una dosis terapéutica de una composición fibrinolítica acidulada e inactivada en forma reversible, en donde la composición fibrinolítica contiene plasmina y un excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable, en donde el excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable contiene agua y un ácido farmacéuticamente aceptable seleccionado de las formas ácidas de ácidos carboxílicos, aminoácidos u otros compuestos que tienen una baja capacidad amortiguadora y el excipiente acidulado tiene un pH aproximadamente menor a 4,0.

La presente invención provee un método para administrar una dosis terapéutica de una plasmina acidulada inactivada en forma reversible y un excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable, que comprende además un estabilizador farmacéuticamente aceptable tal como, pero sin limitarse a, un azúcar o un alcohol polihídrico.

En un aspecto de la presente invención, la composición fibrinolítica comprende una serina proteasa acidulada inactivada en forma reversible sustancialmente libre de su activador respectivo, un amortiguador con baja capacidad de amortiguación, y opcionalmente, un agente estabilizante. Tales serina proteasas incluyen tripsina, quimotripsina, elastasa pancreática II, catepsina G, antígeno específico para la próstata, leucocito elastasa, quimasa, triptasa, acrosina, kalikreina tisular, y plasmina. La plasmina incluye Glu-plasmina, Lys-plasmina, derivados y variantes modificadas o truncadas de los mismos, incluyendo, pero sin limitarse a, midiplasmina, miniplasmina, o microplasmina.

Los métodos de la presente invención comprenden condiciones ácidas y estabilizantes que vuelven a la plasmina estable para almacenamiento. La plasmina utilizada en la presente invención se obtiene por medio de la activación del plasminógeno, y que la aísla y almacena en una solución acidulada que tienen un pH aproximadamente menor a 4 para proveer una formulación estable de plasmina. La composición fibrinolítica de la presente invención se puede liofilizar y está sustancialmente libre del activador del plasminógeno. La baja capacidad de amortiguación de la composición de plasmina permite una titulación rápida a un pH fisiológico cuando se la administra aún trombo o al suero. La plasmina acidulada es rápidamente neutralizada y activada cuando se la administra en una solución con baja capacidad de amortiguación directamente al sitio del coágulo a la terapia trombolítica.

Los objetivos adicionales, características, y ventajas de invención serán más claros por revisión de la descripción detallada expuesta más abajo cuando se la toma en conjunto con las figuras de los dibujos acompañantes, que se describen brevemente a continuación.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la dependencia con el pH de la actividad de la plasmina según lo medido con el sustrato cromogénico S2251.

La Figura 2 ilustra la estabilidad de la plasmina en agua acidulada (pH 3,7) según lo medido por medio de un ensayo caseinolítico.

La Figura 3 ilustra un gráfico de pH versus el porcentaje de cadena pesada con relación a la proteína total en cada senda de los geles SDS.

La Figura 4 ilustra la esté llegado de plasmina o del tPA más el plasminógeno en la trombólisis.

La Figura 5 ilustra la potencia trombolítica de la plasmina activa.

La Figura 6 ilustra el efecto de los inhibidores de la plasmina sobre la trombólisis inducida por plasmina.

La Figura 7 compara la administración local del tPA o de la Lys-plasmina sobre la restauración del flujo sanguíneo, y el consumo de FVIII y de fibrinógeno, a los 60 minutos.

La Figura 8 compara la administración local del tPA o de la Lys-plasmina sobre la restauración del flujo sanguíneo a los 90 minutos, y el consumo de FVIII y de fibrinógeno a los 60 minutos.

La Figura 9 ilustra el efecto de la administración local de tPA versus plasmina sobre los tiempos de sangrado de la cutícula.

La Figura 10 ilustra la lisis de los coágulos sanguíneos encogidos con una cantidad equimolar de plasmina o de miniplasmina acidulada inactivada en forma reversible.

La Figura 11 compara la administración local de tPA y de plasmina sobre la lisis del trombo, y el consumo de FVIII y de fibrinógeno a los 60 minutos.

La Figura 12 compara la administración local de tPA y de plasmina sobre la lisis del trombo a los 90 minutos, y el consumo de FVIII y de fibrinógeno a los 60 minutos.

La Figura 13 ilustra la evaluación del riesgo/beneficio de la plasmina versus tPA.

La Figura 14 ilustra la degradación progresiva de una composición de plasmina a un pH de 2,2, 3,5 ó 3,7.

La Figura 15 ilustra los sitios de escisión generados en la plasmina a un pH 2,2 y de 3,8.

La Figura 16 ilustra la estabilidad a 37ºC de una plasmina acidulada inactivada en forma reversible a un pH de 3,7, con estabilizadores de carbohidrato.

La Figura 17 ilustra la estabilidad a 37ºC de una plasmina acidulada inactivada en forma reversible a un pH de 3,7, con glucosamina, niacinamida, tiamina o citrulina como agente estabilizante.

La Figura 18 ilustra la titulación, con suero humano, de soluciones de plasmina que tienen diferentes amortiguadores con baja capacidad amortiguadora.

Descripción detallada de la invención

Una divulgación completa y habilitante de la presente invención, incluida la mejor forma conocida por los inventores para llevar a cabo la intención, es expuesta en más particularmente en el resto de la especificación, incluida la referencia a los Ejemplos. Esta descripción se hace para los propósitos de ilustrar los principios generales de la invención y no debe ser tomada en un sentido limitante.

La presente invención se dirige a la necesidad por un método de trombólisis que permita el uso de una composición fibrinolítica que comprende plasmina acidulada inactivada en forma reversible y el suministro localizado de la plasmina a una oclusión trombótica. La invención provee un método para administrar una dosis terapéutica de una composición fibrinolítica a un humano o animal que tengan una oclusión trombótica, que comprende administrar en forma parenteral al humano o al animal una dosis terapéutica de una composición fibrinolítica acidulada inactivada en forma reversible y farmacéuticamente aceptable, sustancialmente libre de activador del plasminógeno, permitiéndole a la composición fibrinolítica administrada interactuar con la oclusión trombótica, monitoreando el nivel de flujo vascular del humano o del animal, y repitiendo estas etapas hasta lograr un nivel preseleccionado de flujo vascular. El método de la invención provee además el uso de una composición fibrinolítica que contiene una plasmina acidulada inactivada en forma reversible, sustancialmente libre del activador del plasminógeno en un amortiguador de baja capacidad de amortiguación. El método también provee el suministro directo a través de un catéter intravascular de la

composición fibrinolítica dentro o en la vecindad inmediata del trombo, minimizando así la degradación sistémica de la fibrina mientras se retiene la actividad máxima de la plasmina contra el trombo.

Con el uso más intensivo de catéteres arteriales y venosos en las clínicas, el suministro local de plasmina acidulada inactivada en forma reversible en la proximidad, o en forma efectiva dentro de un trombo, ofrece una oportunidad terapéutica atractiva para la trombólisis. Siendo una serina proteasa activa, la plasmina es un agente directo para la disolución de un trombo, en contraste con los activadores del plasminógeno que requieren de la presencia del plasminógeno zimógeno en la vecindad del trombo. Se puede regular la terapia local trombolítica dirigida a través de un catéter con plasmina activa, para lograr una trombólisis total localizada, y la plasmina tienen el potencial para ser un agente trombolítico seguro debido a que la dosis menor requerida para la suministro local puede reducir significativamente las complicaciones del sangrado frecuentemente asociadas con una terapia trombolítica con una dosis alta inducida por los activadores del plasminógeno. Cualquier vertimiento de plasmina en la vecindad inmediata del sitio del trombo será rápidamente neutralizado por la α_2-antiplasmina circulante.

Existen varios desafíos técnicos asociados con la purificación de la plasmina, y el almacenamiento, así como con su uso y suministro terapéutico. La plasmina es una serina proteasa activa y está sometida a autodigestión y a inactivación a pH fisiológico. De la degradación de la plasmina, infortunadamente, es también lo más evidente en el rango de pH requerido para la trombólisis *in vivo*.

La composición fibrinolítica, como la incorporada en la presente invención, incluye el mantenimiento de la plasmina en un amortiguador ácido durante la purificación, así como su formulación en un excipiente acidulado que tiene un amortiguador farmacéuticamente aceptable con baja capacidad de amortiguación, proveyendo así una composición fibrinolítica que contiene plasmina acidulada inactivada en forma reversible sustancialmente libre del activador del plasminógeno. Está contemplada dentro del alcance de la presente invención por ser la composición fibrinolítica una composición liofilizada que puede ser reconstituida por medio de la adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como, pero sin limitarse a, agua, solución fisiológica salina o cualquier otro solvente que permita la administración de la composición a un humano o a un animal. Su eficaciaen restablecer la permeabilidad vascular se demostró en los ensayos *in vitro* y en un modelo *in vivo* de trombólisis en la vena yugular de un conejo.

El término "inactivado en forma reversible" como se lo utiliza aquí, se refiere a una actividad enzimática que está sustancialmente libre de actividad bajo un conjunto específico de condiciones pero que se revertirán a una forma activa cuando se cambia a otro conjunto de condiciones.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" como se lo utiliza aquí, se refiere a cualquier excipiente que sea fisiológicamente tolerado por un receptor humano o animal, que incluye, pero sin limitarse a, agua, soluciones salinas, soluciones fisiológicas salinas, o cualquier otro líquido o gel en el cual se pueda disolver o suspender un agente fibrinolítico tal como plasmina. El "excipiente farmacéuticamente aceptable" puede incluir a cualquier compuesto farmacéuticamente aceptable que producirá una solución de plasmina que tenga un pH aproximadamente por debajo de 4,0 y que tenga una capacidad de amortiguación baja o de cero.

El término "amortiguador con baja capacidad de amortiguación" como se lo utiliza aquí, se refiere a la cantidad de ácido o de base que un amortiguador puede neutralizar antes de que el pH comience a cambiar en un grado apreciable. Como se lo utiliza aquí, un amortiguador con baja capacidad de amortiguación ajustará significativamente el pH por la adición de un pequeño volumen de un ácido o de una base, con relación al volumen de la solución amortiguadora con baja capacidad de amortiguación. Este término también incluye soluciones aciduladas por ácidos fuertes que incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, y que no tienen capacidad de amortiguación.

El término "pH fisiológico" como se lo utiliza aquí, se refiere a un pH aproximadamente entre 6,5 y 7,5, más típicamente entre el pH de 7,1 a 7,5.

El término "trombo" como se lo utiliza aquí, se refiere a un trombo en un vaso sanguíneo o a un dispositivo en contacto con la sangre (por ejemplo dispositivos tipo catéter o de desvío). Un trombo puede contener fibrina y puede contener además, pero sin limitarse a, plaquetas, eritrocitos, linfocitos, lípidos, constituyentes del suero o cualquier combinación de los mismos. Un "trombo" puede ser, pero no se limita a, un trombo anular, un trombo en forma de bola, un trombo hialino, un trombo adosado a una pared, un trombo estratificado o trombos blancos.

El término "oclusión trombótica" como se lo utiliza aquí, se refiere a un bloqueo total o parcial de un vaso debido a la formación de un coágulo trombótico, en donde el trombo contiene al menos fibrina. El vaso vascular ocluido puede ser, pero no se limita a, una vena, arteria, vénula, arteriola, capilar, lecho vascular o el corazón y puede estar dentro de cualquier órgano vascularizado o tejido del cuerpo de un humano o de un animal. La oclusión trombótica puede ser también de un catéter o de otro implante, incluyendo, pero sin limitarse a, vasos prostéticos e injertos de origen humano, animal o sintético, efectivamente bloqueados por una oclusión que contiene fibrina.

El término "dispositivo tipo catéter" como se lo utiliza aquí, se refiere a cualquier catéter o dispositivo de tipo tubular que puede entrar al organismo, e incluye, pero no se limita a, un catéter arterial, un catéter cardíaco, un catéter central, un catéter venoso central, un catéter intravenoso, dispositivos tipo catéter en forma de balón insertados en forma periférica en un catéter central, en un catéter arterial pulmonar o en un catéter venoso central en forma de túnel y derivaciones arterio-venosas.

El término “excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable” como se lo utiliza aquí, se refiere a cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable que haya sido acidulado hasta un pH aproximadamente por debajo de 4,0. El “excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable” puede contener un amortiguador con capacidad de amortiguación baja o de cero tal como un ácido carboxílico como por ejemplo, pero sin limitarse a, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido láctico o ácido málico acidulados hasta un pH aproximadamente por debajo de 4,0 por medio de la adición de un ácido inorgánico; o al menos un aminoácido tal como pero sin limitarse a, glicina, alanina, valina, isoleucina, treonina o glutamina, o al menos una ácido inorgánico tal como, pero sin limitarse a, ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico o ácido fosfórico o cualquier combinación de los mismos. Se contempla que estén dentro del alcance de la presente invención para que la fracción ácida del excipiente farmacéutico sea al menos un amortiguador fisiológicamente tolerado, oligopéptido, ión orgánico o inorgánico o cualquier combinación de los mismos que mantendrán un pH en el excipiente farmacéuticamente aceptable por debajo de un valor aproximadamente de 4,0.

El termino “carbohidrato” como se lo utiliza aquí, se refiere a cualquier sacárido o disacárido farmacéuticamente aceptable tal como, pero sin limitarse a, glucosa, fructuosa, maltosa o manosa, alcoholes dulces incluyen, pero no se limitan a, sorbitol y manitol, y polisacáridos tales como, pero sin limitarse a, dextrinas, dextranos, glicógeno, almidones y celulosas, o cualquier combinación o derivado de los mismos que sean farmacéuticamente aceptables para un humano o un animal.

El término “agente de estabilización” como se lo utiliza aquí, se refiere al menos a un compuesto tal como, pero sin limitarse a, glicerol, ascorbato, niacinamida, glucosamina, tiamina o sal inorgánica tal como, pero sin limitarse a, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio o cloruro de manganeso o cualquier combinación de los mismos que incrementará la estabilidad de una preparación de plasmina.

El término “plasmina acidulada inactivada en forma reversible” como se lo utiliza aquí, se refiere a cualquier forma catalíticamente activa de plasmina capaz de escindir proteolíticamente a la fibrina cuando se encuentra bajo condiciones fisiológicas, pero inactivadas en forma reversible cuando se encuentran en un pH aproximadamente entre un pH de 2,5 hasta aproximadamente 4,0. El término “inactivado” como se lo utiliza aquí, se refiere a una reducción total o sustancial en actividad enzimática comparada con la actividad a un pH fisiológico. El término “plasmina activa” como se lo utiliza aquí, se refiere a una plasmina bajo condiciones donde la plasmina es capaz de escindir proteolíticamente a la fibrina. El término “plasmina” incluye, pero no se limita a, Glu-plasmina, Lys-plasmina, derivados, variantes modificadas o truncadas de las mismas. El término “variantes truncadas” incluye, pero no se limita a, la midiplasmina, miniplasmina o microplasmina como se divulga en la patente estadounidense No. 4.774.087.

El término “anticoagulante” como se lo utiliza aquí, se refiere a cualquier compuesto capaz de inhibir la formación de un trombo incluyendo, pero sin limitarse a, hiruidina, heparina, inhibidores de trombina, inhibidores plaquetarios, inhibidores de agregación plaquetaria y cualquiera de los derivados o combinaciones de los mismos.

El término “serina proteasa” como se lo utiliza aquí, se refiere a cualquier serina proteasa capaz de escindir proteolíticamente a la fibrina incluyendo, pero sin limitarse a, plasmina, tripsina, quimotripsina, elastasa pancreática II, catepsina G, antígeno específico para la próstata, elastasa leucocito elastasa, quimasa, triptasa, acrosina y kalikreina tisular humana.

Una limitación de la terapia trombolítica actual con activadores del plasminógeno es la disponibilidad de plasminógeno que rodea o está dentro de un trombo. El suministro local de un agente fibrinolítico a un trombo permite ahora que la plasmina por sí misma sea un potente agente terapéutico directamente administrado a un trombo. En contraste con diferentes activadores del plasminógeno que son actualmente utilizados como trombolíticos, la terapia trombolítica directa localizada con plasmina se puede intensificar hasta cualquier nivel que se requiera para lograr la lisis del coágulo. Esto es debido a que la plasmina actúa directamente sobre el polímero de fibrina. También, la plasmina, cuando se la suministra directamente en, o en forma adyacente a un trombo, permite que se administre una dosis efectiva menor con la reducción concomitante en la hemorragia sistémica típicamente asociada con la terapia convencional trombolítica. El exceso de plasmina también puede ser rápidamente inactivado por medio de la α_2-antiplasmina circulante.

La plasmina activa altamente purificada de la presente invención fue preparada por lo tanto a partir del plasminógeno que había sido purificado a partir de la Fracción II + III de Cohn. La pureza de la plasmina fue superior al 95% y la actividad específica estaba en el rango de 18-23 CU/mg. Las preparaciones de plasmina estaban sustancialmente libres de uroquinasa, o de cualquier otro activador del plasminógeno, que haya sido utilizado para la conversión de plasminógeno en plasmina. La presente invención también contempla que la plasmina sustancialmente libre del activador del plasminógeno se pueda preparar a partir de cualquier fuente que incluya, pero no se limite a, suero de mamífero, un plasminógeno recombinante o un plasminógeno truncado tal como, pero que no se limite a, el miniplasminógeno o el microplasminógeno divulgados por Wu y colaboradores en la patente estadounidense No. 4.774.087.

La plasmina de la presente invención fue purificada hasta remover sustancialmente a los activadores del plasminógeno por medio del enlazamiento a una columna cromatográfica de Sefarosa con benzamidina y la plasmina eluida fue recolectada y almacenada en un excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable que tiene un amortiguador con baja capacidad de amortiguación. Un pH bajo el rango de aproximadamente 2,5 hasta aproximadamente 4,0 estabilizó significativamente a la plasmina, aún cuando se mantuvo a temperatura ambiente o superior. Mientras no esté limitado

por ninguna teoría, se cree que a este valor tan bajo de pH, la plasmina ya no tiene la actividad de la serina proteasa que de otra forma conduciría a la autodegradación de la plasmina, como se observaría cuando la plasmina es almacenada a un pH fisiológico aproximadamente 7,0-7,5.

Cuando se administra plasmina acidulada inactivada en forma reversible, de acuerdo a los métodos de la presente invención, directamente dentro de un trombo o en forma próxima al mismo, la plasmina acidulada inactivada en forma reversible en el amortiguador con baja o ninguna capacidad de amortiguación encuentra al suero, encuentra la capacidad de amortiguación del suero en el pH fisiológico de aproximadamente 7,4. Se neutraliza la baja capacidad de amortiguación del excipiente farmacéuticamente aceptable, con lo cual la plasmina se revierte hasta su estado activado y digiere proteolíticamente la fibrina del trombo.

Empleando inicialmente un método de preparación de plasmina que suministre plasmina proteolíticamente inactiva hasta administrarla dentro, o en forma inmediatamente adyacente a un trombo, y que esté también sustancialmente libre de cualquier activador del plasminógeno, se disminuye la probabilidad de inducir una hemorragia sistémica indeseable. La plasmina administrada en exceso es rápidamente inactivada por los inhibidores que circulan en el suero tales como la α_2-antiplasmina, y los activadores relativamente estables del plasminógeno que de otra manera circularían para inducir fibrinólisis distal, están prácticamente ausentes.

La plasmina acidulada se puede almacenar fácilmente en excipientes farmacéuticamente estables que tienen una capacidad de amortiguación baja o nula tal como, pero sin limitarse a, glicina acuosa 5 mM. Se puede utilizar cualquier ión farmacéuticamente aceptable, ya sea sólo o en combinación, si un pH está en el rango aproximadamente de 2,5-4,0. Típicamente, la plasmina acidulada inactivada en forma reversible ha sido mantenida a un pH de 3,1-3,5. Los iones ácidos farmacéuticamente aceptables incorporados en el excipiente para mantener un pH bajo se pueden seleccionar entre oligopéptidos, al menos un aminoácido, o ácidos orgánicos o inorgánicos o una combinación de los mismos. La estabilización se puede mejorar además por medio de la inclusión de al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable que puede ser, pero sin limitarse a, un carbohidrato.

La administración de la composición de plasmina se pueda hacer por cualquier método que suministrará la plasmina como un bolo o como una infusión prolongada directamente dentro de un trombo, o en un sitio a una distancia corta próxima al trombo, con lo cual puede encontrar rápidamente al trombo. Minimizando esta distancia hasta el trombo o administrándola directamente dentro de los coágulos, se reduce la exposición de la plasmina a los inhibidores de plasmina en el suero que está situado entre la aguja o el catéter suministrados y el trombo. La presente invención contempla que la plasmina acidulada inactivada en forma reversible puede ser suministrada al trombo por medio de un catéter. La presente invención contempla además que se pueda utilizar una aguja con cánula, tal como, pero sin limitarse a, una aguja de jeringa, para inyectar la plasmina acidulada inactivada en forma reversible dentro de un trombo. Esto está, sin embargo, dentro del alcance de la presente invención por cualquier medio conocido por alguien capacitado en el arte, para administrar localmente un fluido en una ubicación específica en un humano o animal. El suministro de un catéter a un trombo vascular o coronario permite además precisión en la colocación de la plasmina, específicamente dentro del trombo. Aun cuando la presente invención provee métodos de suministro localizado de una plasmina acidulada inactivada en forma reversible en un amortiguador con baja capacidad de amortiguación a un trombo, está dentro del alcance de la presente invención para el suministro de una composición de plasmina acidificada inactivada en forma reversible de la misma a una oclusión de fibrina de un catéter implantado en un humano o en un animal.

Utilizando un ensayo *in vitro* de trombólisis de fibrina marcada con ^{125}I, se observó que la plasmina era capaz de disolver trombos en forma dependiente de la dosis. Se reforzó la fibrinólisis por medio de la supresión ya sea de la α_2-antiplasmina o de la α_2-microglobulina en el plasma que rodea al trombo, así como por medio de la supresión de todos los inhibidores (esto es, en PBS). Estos resultados muestran que la trombólisis por plasmina está bajo una regulación muy estricta por parte de los inhibidores endógenos de la plasmina, y provee las bases para una terapia trombolítica más segura.

Se comparó la eficacia *in vivo* de la plasmina acidulada inactiva en forma reversible (1-3 mg/kg) en un amortiguador con baja capacidad amortiguación directamente administrada en forma local a un trombo a través de un catéter con aquella del tPA (0,5 y 1,0 mg/kg) en el modelo de trombosis en la vena yugular de conejo. Se monitoreó la velocidad de la trombólisis. Además, el consumo del Factor VIII y de fibrinógeno, así como el tiempo de sangrado de la cutícula (CBT), se midieron como indicadores del estado sistémico lítico. En comparación con 0,5 mg/kg del tPA, la plasmina proveyó una trombólisis comparable o significativamente mejor, con un consumo comparable del Factor VIII y de fibrinógeno y un CBT similar con una dosis de 1 mg/kg. Hubo un consumo significativamente mayor y de CBT con una dosis de plasmina de 3 mg/kg. Cuando se compara con 1 mg/kg del tPA, tanto la plasmina como el tPA proveyeron velocidades de trombólisis muy similares con un consumo menos significativo de fibrinógeno con una dosis de plasmina de 3 mg/kg.

De este modo, se puede almacenar en forma efectiva y segura la plasmina acidulada inactivada en forma reversible y utilizarla como un agente trombolítico durante la trombólisis local asistida por un catéter sin neutralización antes de la administración a un humano o a un animal. La plasmina tiene una actividad fibrinolítica comparable, si no superior, comparada con la del tPA, y el perfil de seguridad parece al menos similar en este modelo animal de suministro trombolítico local.

Se contempla dentro del alcance de la presente invención que la enzima fibrinolítica acidulada inactiva a en forma reversible puede ser, pero no se limita a, plasmina, derivados de plasmina tales como las formas truncadas de la misma que incluyen, pero no se limitan a, miniplasmina y microplasmina.

La presente invención provee un método para administrar una dosis terapéutica de una preparación de una composición fibrinolítica fluida sustancialmente libre de activadores del plasminógeno en la vecindad inmediata de, o directamente dentro, de una oclusión trombótica de un vaso vascular o de un dispositivo ocluido tipo catéter. La invención provee además un método para suministrar una dosis terapéutica de una composición fluida de plasmina acidulada inactivada en forma reversible a una oclusión trombótica en donde la plasmina se puede estabilizar antes de administrarla a un pH aproximadamente de 4,0. La presente invención provee además un método para suministrar una dosis terapéutica de una composición fluida de plasmina acidulada inactivada en forma reversible en un amortiguador con baja capacidad de amortiguación directamente dentro de una oclusión vascular trombótica, o de un trombo, con lo cual la composición de plasmina se revierte hasta un pH fisiológico que permitiera plasmina escindir proteolíticamente a la fibrina.

En una modalidad de la presente invención, el método de la invención comprende las etapas de identificar a un humano o a un animal que tienen una oclusión trombótica, administrándole al humano o al animal una dosis terapéutica de una composición fibrinolítica acidificada inactivada en forma reversible en un amortiguador con baja capacidad de amortiguación, permitiendo que la composición fibrinolítica administrada interactúe con la oclusión vascular, monitoreando el nivel de flujo vascular del humano o del animal; y repitiendo las etapas de administrar la composición fibrinolítica hasta lograr un nivel preseleccionado de flujo vascular.

En otra modalidad de la presente invención, la composición fibrinolítica acidulada inactivada en forma reversible contiene plasmina y un excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable que tiene un amortiguador con baja capacidad de amortiguación.

En aún otra modalidad de la presente invención, el excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable contiene agua y al menos un ácido farmacéuticamente aceptable, en donde el ácido es un ácido orgánico, que puede ser, pero no se limita a, un ácido carboxílico, un oligopéptido, un aminoácido, o un ácido inorgánico y que tiene una capacidad de amortiguación baja o nula, y el excipiente acidulado tiene un pH aproximadamente menor a 4,0.

En aún otra modalidad, el excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable contiene agua y un ácido farmacéuticamente aceptable seleccionado de las formas ácidas de formato, acetato, citrato, glicina, isoleucina, serina, treonina, glutamina, y alanina, en donde el excipiente acidulado tiene un pH aproximadamente menor a 4,0.

En una modalidad adicional, el ácido farmacéuticamente aceptable es la forma ácida de acetato o citrato.

En aún otra modalidad, el ácido farmacéuticamente aceptable es la forma ácida de acetato.

En una modalidad del método de la presente invención, la composición fibrinolítica acidulada inactivada en forma reversible tiene un pH aproximadamente entre 2,5 y aproximadamente 4,0. En otra modalidad del método de la presente invención, la composición fibrinolítica tiene un pH aproximadamente de 3,7.

En otras modalidades del método de la presente invención, la plasmina está en el rango de concentración de aproximadamente entre 0,01 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml. En una modalidad del método de la presente invención, la plasmina está en el rango de concentración aproximadamente entre 0,1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml.

En modalidades adicionales del método que la presente invención, el ion ácido está en el rango de concentración aproximadamente entre 1 mM y aproximadamente 500 mM. En una modalidad del método de la presente invención, el ion ácido está en el rango de concentración aproximadamente entre 1 mM y 50 mM.

Las modalidades para practicar el método de la presente invención comprenden además un estabilizador de plasmina fisiológicamente aceptable, en donde el carbohidrato se selecciona de glucosa, maltosa, manitol, sorbitol, sacarosa, lactosa o trehalosa, en donde el azúcar tiene una concentración en el rango aproximadamente de 0,2% p/v hasta aproximadamente 20% p/v. En una modalidad, el azúcar es glucosa y la concentración de la misma es aproximadamente del 20%.

Las modalidades del método de la presente invención comprenden además la dosis terapéutica de la plasmina acidulada inactivada en forma reversible en el rango aproximadamente entre 0,01 mg de plasmina/kg de peso corporal y 10 mg de plasmina/kg de peso corporal.

En modalidades del método de la presente invención, la composición fibrinolítica acidulada inactivada en forma reversible se administra intravascularmente o dentro del trombo. En una modalidad del método de la presente invención, se administra la plasmina acidulada inactivada en forma reversible en un amortiguador con baja capacidad de amortiguar el pH directamente dentro, o en forma próxima a un trombo por medio de un dispositivo intravascular tipo catéter. En aún otra modalidad del método de la presente invención, el catéter intravascular está dirigido a una oclusión vascular.

Los ejemplos siguientes se presentan para describir las modalidades preferidas y los usos de la presente invención, y no se deben interpretar como limitantes de la misma.

Se apreciará por parte de aquellos capacitados en el arte que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen formas preferidas para practicarlas.

Ejemplo 1

Fuentes de proteínas investigadas

El plasminógeno se purificó a partir de una pasta de la Fracción II + III de Cohn por medio de cromatografía de afinidad sobre Sefarosa con Lys como lo describen *Deutsch & Mertz* (1970). Por lo tanto, se resuspendieron 200 g de la pasta en 2 litros de una solución 0,15 M de amortiguador de citrato de sodio, pH 7,8. Se incubó la suspensión durante la noche a 37ºC, se centrifugó a 14.000 rpm, se filtró a través de fibra de vidrio y se mezcló con 500 ml de Sefarosa 4B con Lys (Pharmacia). El enlazamiento del plasminógeno se hizo a temperatura ambiente durante 2 horas. Se transfirió luego la columna de Sefarosa con Lys sobre un filtro de vidrio de 2 litros, y se lavó varias veces con citrato de sodio 0,15 M que contenía NaCl 0,3 M hasta que la absorbancia a 280 nm cayó por debajo de 0,05. Se eluyó el plasminógeno enlazado con tres porciones de 200 ml de ácido ε-aminocapróico 0,2 M. Se precipitó el plasminógeno eluido con 0,4 g de sulfato de amonio sólido/ml de solución de plasminógeno. El precipitado de plasminógeno crudo (80-85% de pureza) se almacenó a 4ºC.

Se purificó adicionalmente la uroquinasa de bajo peso molecular (uroquinasa LMW) (Abbokinase-Abbott Laboratories, Chicago III) por medio de cromatografía de afinidad sobre Sefarosa con benzamidina. La uroquinasa se acopló luego a la Sefarosa 4B activada con CNBr por medio de la mezcla de 1,3 mg de uroquinasa LMW en amortiguador de acetato 50 mM, pH 4,5, y diluyendo con 5 ml del amortiguador de acoplamiento, bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 8,0.

Esta solución se combinó inmediatamente con 5 ml de Sefarosa activada con CNBr previamente hinchada y lavada en HCl 0,1 M. El acoplamiento ocurrió durante 4 horas sobre hielo con agitación. El exceso del grupo activado con CNBr fue bloqueado con Tris 0,1 M, pH 8,0. Cada lote de Sefarosa con uroquinasa fue utilizado 5 veces y almacenado en glicerol al 50% en agua a 4ºC entre los ciclos. El activador del plasminógeno tisular (ACTIVASE^{TM}) era de Genentech. El fibrinógeno libre de plasminógeno y la α-trombina (3793 U/ml) eran de Enzyme Research, Inc. La α_2-antiplasmina se obtuvo de Athens Research Technologies. La plasmina comercialmente disponible era de Haemotologic Technologies, Inc. El sustrato S2251 de plasmina cromogénica era de Chromogenix. El fibrinógeno humano marcado con ^{125}I (150-250 μCi/mg) era de Amersham Pharmacia Biotech. La electroforesis sobre gel de poliacrilamida SDS se realizó sobre un aparato Phast System de Pharmacia utilizando geles con un gradiente elaborado previamente de 8-25% y tiras de amortiguador con SDS.

Ejemplo 2

Purificación de plasmina activa

(i) *Activación del plasminógeno hasta plasmina utilizando Sefarosa con uroquinasa*

El plasminógeno se escindió hasta plasmina produciendo plasmina sin contaminación de la preparación final por medio del uso de un activador inmovilizado del plasminógeno. La uroquinasa escinde directamente al plasminógeno. La activación del plasminógeno por la uroquinasa no depende de la presencia de fibrina como en el caso del tPA, y la uroquinasa es una proteína humana. Estos factores, y su costo relativamente bajo, hacen de la uroquinasa el activador preferido, aunque esto no impide el uso del tPA, la estreptoquinasa o cualquier otro medio de escisión que produce una plasmina activa capaz de degradar fibrina. El precipitado de sulfato de amonio de plasminógeno crudo fue centrifugado a 14.000 rpm y resuspendido en un volumen mínimo utilizando Tris 40 mM, que contenía lisina 10 mM, NaCl 80 mM a pH 9,0 para lograr la concentración de final de proteína de 10-15 mg/ml. Se dializó la solución de plasminógeno durante la noche contra el mismo amortiguador para remover el sulfato de amonio. La solución dializada de plasminógeno (10-20 ml) fue diluida con un volumen igual del glicerol al 100% y combinada con 5 ml de Sefarosa con uroquinasa. El uso de glicerol al 50% reduce la autodegradación de la plasmina formada durante la activación. La plasmina es estable en glicerol al 50% y se puede almacenar en esta solución a -20ºC durante un largo período de tiempo.

La activación del plasminógeno ocurre a temperatura ambiente entre 2 y 24 horas dependiendo de la frescura de la Sefarosa con uroquinasa. Con un lote fresco de Sefarosa con uroquinasa, la activación se podría completar en 2 horas. Sin embargo, se deteriora y se hace menos eficiente después de varios ciclos, necesitándose del uso de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras para monitorear el progreso de la activación del plasminógeno. Después de completarse la activación, se filtró la solución de plasmina de la Sefarosa con uroquinasa con un filtro de vidrio, y se aplicó directamente a la Sefarosa con benzamidina.

(ii) *Captura de la plasmina sobre Sefarosa con benzamidina*

Ya que la plasmina es una serina proteasa con especificidad como de tripsina, la Sefarosa con benzamidina es un absorbente de afinidad que permite la captura de la plasmina activa. Se aplicó una solución de plasminógeno en glicerol al 50% en la columna de Sefarosa con benzamidina de 50 ml equilibrada con Tris 0,05 M, pH 8,0, que contenía NaCl 0,5 M con una velocidad de flujo de 3 ml/min. Se corrió la columna a razón de 3 ml/min a 3-7ºC. La porción frontal del pico no enlazado contenía impurezas de alto peso molecular. El resto del pico no enlazado está representado por el plasminógeno residual no activado y por los productos inactivos de autodegradación de plasmina.

(iii) *Elución de la plasmina enlazada con amortiguador de bajo pH*

Para proteger a la plasmina de la inactivación en condiciones de pH neutro, se seleccionaron condiciones ácidas de elución. Se eluyó la plasmina enlazada a Sefarosa con benzamidina con amortiguador de glicina 0,2 M, pH 3,0 que contenía NaCl 0,5 M. El pico enlazado fue dividido típicamente en tres porciones, dos picos frontales, B1 y B2, y el grueso del material eluido como B3.

Los análisis sobre gel no reductor mostraron que las tres porciones contenían plasmina de alta pureza (>95%). El análisis del gel, sin embargo, junto con las cadenas pesada y liviana de la plasmina, reveló algunas bandas de bajo peso molecular en un rango de 10-15 kDa como resultado de la degradación parcial por escisión interna de la plasmina.

La porción frontal del pico B1 contenía típicamente la mayor parte de las impurezas de bajo peso molecular. Las porciones B2 y B3 se degradaron menos. La porción frontal del pico enlazado tenía muy poco de la actividad de la plasmina y fue usualmente descartada. La pérdida de actividad en este material puede ser debida a autodegradación durante la cromatografía, debido a que no existe glicerol presente en el material eluido, y el pH de la porción frontal es intermedia entre el pH de los amortiguadores de equilibrio y de elución, típicamente en un rango de pH 6-6,5. La plasmina eluida, sustancialmente libre de activadores de plasminógeno, fue recolectada en tubos que contenían amortiguador de glicina 2 M, pH 3,0 (10% del volumen recolectado).

(iv) *Formulación del material eluido en agua acidulada (pH 3,7)*

La plasmina eluida fue dializada contra agua que había sido acidulada hasta aproximadamente pH 3,7 con ácido acético glacial, o contra agua que contenía NaCl 0,15 M también acidulada aproximadamente hasta pH 3,7 con ácido acético glacial.

Cualquier ácido que provea un excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable que tenga un amortiguador con baja capacidad de amortiguación y que tenga un pH aproximadamente entre 2,5 y aproximadamente 4,0 puede ser utilizado. Por ejemplo, también está contemplado dentro del alcance de esta invención el uso de otros ácidos y aminoácidos tales como, pero sin limitarse a, ácidos inorgánicos, ácidos carboxílicos, ácidos alifáticos y aminoácidos incluyendo, pero sin limitarse a, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido benzoico, serina, treonina, valina, glicina, glutamina, isoleucina, β-alanina y derivados de los mismos, ya sea solos o cualquier combinación de los mismos, que mantendrán el pH en el excipiente farmacéuticamente aceptable aproximadamente entre 2,5 y aproximadamente 4,0.

La plasmina es extremadamente estable en agua acidulada y puede ser efectivamente utilizada en esta forma para estudios *in vivo* e *in vitro*. La actividad específica de la plasmina fue medida utilizando un ensayo caseinolítico adaptado como lo describen *Robbins & Summaria (1970).* Se añadieron un ml de solución de caseína al 4% en agua acidulada y un volumen apropiado de amortiguador fosfato de sodio 67 mM, pH 7,4 a un tubo de ensayo de policarbonato. Se agitaron las soluciones en un vórtice y se incubaron a 37ºC durante 10 minutos. Se añadieron las muestras de plasmina o de amortiguador (blanco) a cada tubo en intervalos de 15 segundos, se mezclaron bien y se incubaron a 37ºC durante 30 minutos. Se detuvo la reacción con la adición de 3 ml de ácido tricloroacético al 15% y se permitió la formación del precipitado durante 15 minutos. Se centrifugaron los tubos a 3200 rpm durante 20 minutos. Se trasfirieron los sobrenadantes a cubetas y se determinó la A_{280} de cada muestra. Se determinó la actividad caseinolítica específica de cada muestra por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{3{,}27 \times [A_{280}\text{ (Muestra de Plasmina)} - A_{280}\text{ (Blanco)}]}{\mu\text{g de Plasmina en el Ensayo}} = \text{unidades caseinolíticas (CU/mg de proteína)}$$

La concentración de plasmina se determinó espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de extinción de 1,7 para una solución al 0,1%.

Ejemplo 3

Estabilidad de la plasmina dependiente del pH

La plasmina exhibe una dependencia del pH en forma de campana de su actividad catalítica. Como se observa en la Figura 1, la plasmina tiene una actividad enzimática máxima a un pH entre 7,5-8,0, y su actividad decirse rápidamente ya sea con valores de pH más alcalinos o más ácidos. La plasmina es más inactiva, y también reversible, por debajo de pH 4,0, debido a la protonación de la histidina en el centro catalítico, como lo muestran *Robbins & Summaria, (1976) y Castellino & Powell (1981).*

La plasmina es muy inestable a un pH fisiológico. Tanto la cadena pesada como las cadenas livianas de plasmina se degradan dramáticamente en horas a temperatura ambiente y a 4ºC. La plasmina fue formulada a 1 mg/ml en fosfato de sodio 0,04 M, pH 7,4, e incubada a 22ºC o a 4ºC durante 6 horas. Durante la incubación, se analizó la integridad de la plasmina cada dos horas por medio de análisis SDS-PAGE en condiciones de reducción. Tanto la cadena pesada como la cadena liviana se degradaron rápidamente en horas a 22ºC y a 4ºC como se observa en la Tabla 1.

TABLA 1

La rápida degradación de la plasmina en solución de pH neutro a 22ºC y a 4ºC

		% de cadena pesada intacta						% de cadena liviana intacta			
Plasmina	Amortiguador	pH	Temp.	Inicial	2 h	4 h	6 h	Inicial	2 h	4 h	6 h
1 mg/ml	PO_4 0,04 M	7,4	22°C	100%	27%	27%	29%	100%	29%	26%	28%
1 mg/ml	PO_4 0,04 M	7,4	4°C	100%	32%	27%	25%	100%	33%	25%	22%
(La cadena pesada y la cadena liviana intactas de plasmina fueron normalizadas en un punto inicial de tiempo como 100%)											

La plasmina en una concentración de 1 mg/ml fue incubada a 37ºC durante 14 días bajo diferentes condiciones ácidas. Los cambios en la cadena pesada y en la cadena liviana de plasmina fueron analizados por medio de SDS-PAGE en condiciones de reducción. La plasmina fue formulada en una concentración de 1 mg/ml en fosfato de sodio 0,04 M, pH 7,4 y fue también incubada a 4ºC durante seis horas. Durante la incubación, se midió la actividad de la muestra de plasmina cada dos horas por medio del ensayo cromogénico de potencia. Se midió cuantitativamente la potencia de la plasmina utilizando el analizador MLA 1600C (Pleasantville, NY). La plasmina hidrolizó al sustrato cromogénico S-2403 (clorhidrato de D-piroglutamil-L-Fenilalanil-L-Lisina-p-Nitroanilina, o abreviado como pyro-Glu-Phe-Lys-pNA) para formar al péptido y al grupo cromofórico p-nitroanilina (pNA). Se midió la velocidad de formación del color cinéticamente a 405 nm. La cantidad de sustrato hidrolizado era proporcional a la actividad de la plasmina en la muestra. Se generó una curva estándar de la regresión lineal de la velocidad de formación del color (OD/min) versus la potencia de un estándar de plásmido. La ecuación lineal junto con la velocidad observada para una muestra desconocida fue utilizada para calcular la potencia de las desconocidas. La potencia de la plasmina fue reportada en unidades de mg/ml.

La integridad de la plasmina disminuyó significativamente por incubación a un pH fisiológico, como se observa en la Tabla 2.

TABLA 2

La disminución rápida de la actividad de la plasmina en una solución de pH neutro a 4ºC

			Potencia Cromogénica			
Plasmina	Amortiguador	pH	Inicial	2 h	4 h	6 h
1 mg/ml	PO_4, 0,04 M	7,4	100%	43,3%	32,6%	26,4%
(* La actividad de la solución de plasmina se normalizó en un punto inicial de tiempo como 100%)						

En esta solución de pH neutro, la actividad de la plasmina disminuyó más del 70% después de 6 horas a 4ºC.

La plasmina formulada en agua acidulada a pH 3,7 es estable. Puede ser mantenida en esta forma durante meses a temperaturas reducidas sin ninguna pérdida de actividad o la aparición de productos de degradación de naturaleza proteolítica o ácida. La Figura 2 y los datos de la Tabla 3 muestran la estabilidad de la plasmina a 4ºC y a temperatura ambiente.

TABLA 3

Estabilidad de 1 mg/ml de plasmina en las siguientes condiciones ácidas a 37ºC

Formulación	Plasmina (mg/ml)	Condición Ácida	pH	% de cadena pesada intacta después de 14 días a 37°C	% de cadena liviana intacta después de 14 días a 37°C
1	1	HAC/NaAc 5 mM	2,5	19%	62%
2	1	HAC/NaAc 5 mM	3,0	41%	92%
3	1	HAC/NaAc 5 mM	3,4	48%	92%
4	1	HAC/NaAc 5 mM	3,4	49%	96%
5	1	HAC/NaAc 5 mM	3,4	50%	96%
6	1	HAC/NaAc 5 mM	3,7	13%	123%
7	1	HAC/NaAc 5 mM	4,0	9,3%	107%
8	1	Ácido cítrico/ Citrato de Na 5 mM	2,27	9,3%	64%
9	1	Ácido cítrico/ Citrato de Na 5 mM	3,1	33%	68%
10	1	Ácido cítrico/ Citrato de Na 5 mM	3,56	46%	88%
11	1	Ácido cítrico/ Citrato de Na 5 mM	4,0	7,4%	104%
12	1	Glicina 5 mM	2,2	7,3%	104%
13	1	Glicina 5 mM	3,1	36%	70%
14	1	Glicina 5 mM	3,5	49%	85%
15	1	Glicina 5 mM	3,8	12%	85%
16	1	Glicina 5 mM	4,1	6%	81%
17	1	Serina 5 mM	3,4	56%	100%
18	1	Treonina 5 mM	3,4	54%	100%
19	1	Valina 5 mM	3,4	52%	96%
20	1	Isoleucina 5 mM	3,4	51%	100%
21	1	β-alanina 5 mM	3,7	33%	90%
22	1	Ácido benzoico 2 mM	3,5	42%	93%
23	1	Ácido láctico 2 mM	3,5	45%	91%
24	1	Ácido málico 2 mM	3,5	50%	90%
25	1	Ácido tartárico 2 mM	3,5	28%	87%
(La cadena pesada y la cadena liviana intactas en cada formulación antes de incubación se normalizaron como 100%; HAc/NaAc = ácido acético/acetato de sodio)					

A 4ºC, la plasmina es estable al menos durante 9 meses. Aún a temperatura ambiente, la plasmina acidulada inactivada en forma reversible es estable al menos durante dos meses. La estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente es importante ya que haría a esta formulación compatible con regímenes largos de administración trombolítica. Por ejemplo, la administración durante 36 horas de trombolíticos tales como el activador del plasminógeno tisular o la uroquinasa es común en el tratamiento de oclusiones arteriales periféricas. En la Figura 3 se muestra una gráfica d pH versus el porcentaje de cadena pesada con relación a la proteína total en cada senda de los geles SDS. Los resultados

demuestran una óptima estabilidad de pH de aproximadamente 3,1-3,5, con independencia del tipo amortiguador, o de la concentración del amortiguador.

La habilidad de la plasmina acidulada inactivada en forma reversible para convertirse en completamente activa por transferencia a un pH fisiológico se evidencia por su actividad en el ensayo caseinolítico y también en los ensayos de trombólisis de fibrina marcada con ^{125}I. Ambos ensayos se realizaron a pH 7,4, y hubo una completa recuperación de la actividad de la plasmina durante el cambio de pH y pasando a través del punto isoeléctrico (pH 5-5,5). La plasmina se formula en un solvente con baja capacidad de amortiguación y, cuando se la añade a una solución amortiguada tal como plasma, rápidamente adopta el pH neutro o fisiológico en forma instantánea y la precipitación que usualmente acompaña al paso lento a través del punto isoeléctrico, no se presenta.

Ejemplo 4

La plasmina tiene la misma potencia fibrinolítica intrínseca que una mezcla de plasminógeno/activador del plasminógeno

La plasmina tiene la misma potencia fibrinolítica intrínseca que una mezcla de plasminógeno/activador del plasminógeno. La potencia fibrinolítica de la plasmina se comparó con aquella de una mezcla de Lys-plasminógeno y tPA. Estos experimentos se realizaron en un sistema definido que consiste de un trombo de fibrina marcado en forma radiactiva con ^{125}I sumergido en PBS. La Figura 4 muestra que, en un ambiente amortiguado, la trombosis lograda con la plasmina es casi idéntica a la de la mezcla Lys-plasminógeno más tPA (curvas a y b, respectivamente). Al mismo tiempo, no se observó trombólisis solamente con tPA (curva c) o en ausencia de cualquiera de las proteínas (curva d). Los datos obtenidos únicamente con tPA muestran que su actividad depende de su sustrato, del plasminógeno, para ser un trombolítico efectivo.

Estos datos indican que, en ausencia de inhibidores y de otros factores de la proteína presente en el plasma, no existe diferencia en la habilidad para lisar los trombos de fibrina entre la plasmina purificada y la combinación de tPA y Lys-plasminógeno activado con tPA. Con el propósito de evaluar la potencia trombolítica de la plasmina activa, se llevó a cabo el ensayo de trombólisis de fibrina marcada con ^{125}I con trombos de plasma en un ambiente de plasma.

Ejemplo 5

Papel de los inhibidores de plasmina en la regulación de la actividad de la plasmina

Ensayo de trombólisis de fibrina marcada con ^{125}I. Las propiedades fibrinolíticas de la plasmina se determinaron en un sistema *in vitro* que consiste de un trombo del plasma marcado en forma radiactiva sumergido en plasma humano tratado con citrato como lo describen *Lijnen y colaboradores (1986)*. El plasma utilizado en todos experimentos fue un plasma donante sencillo descongelado a 37ºC, dividido en alícuotas, y vuelto a congelar y a almacenar a -80ºC. La solución patrón de fibrinógeno marcada con ^{125}I se preparó rehidratando los contenidos del vial (aproximadamente 110 μCi/vial) con 1,0 ml de citrato de sodio 0,15 M y se almacenó a 4ºC.

Se añadieron 10 μl de fibrinógeno marcado con ^{125}I a un tubo de ensayo de policarbonato que contenía 250 μl de plasma a 37ºC y se mezcló brevemente. Se añadieron al plasma 25 μl de α-trombina, diluida con $CaCl_2$ 0,1 M hasta una concentración final de 10-20 μM. A los trombos marcados en forma radiactiva se les permitió envejecer durante cinco minutos a 37ºC y luego se los lavó con PBS. Se transfirieron los trombos a tubos de ensayo que contenían 2,25 ml de plasma o de amortiguador, un trombo por tubo.

Se midió una muestra con reactividad de línea base para cada trombo. Se añadió plasmina a cada tubo después de la adición de cada trombo. Se retornaron los trombos a 37ºC durante el transcurso de todo el experimento. Se tomaron muestras adicionales en momentos específicos para medir la radioactividad liberada. Se calculó el grado de trombólisis a partir de la relación entre la cantidad de radioactividad liberada por el trombo dentro del plasma y la cantidad total de radioactividad soluble en el tubo de reacción. Se graficó la liberación de los productos marcados de degradación de la fibrina, expresada en porcentaje, versus el tiempo.

Además del medio ambiente el plasma, algunos experimentos de trombólisis se llevaron a cabo en el ambiente de un amortiguador o con plasma que carecía de actividad de α_2-antiplasmina o de α_2-macroglobulina. El plasma sin α_2-antiplasmina se obtuvo pasando el plasma normal a través de una columna de Sefarosa Kringles 1-3 como lo describe *Wiman* (1980). El plasma inactivado con α_2-macroglobulina se obtuvo por medio de tratamiento del plasma normal con metilamina 0,1 M *Barrett y colaboradores* (1979) durante 2 horas a 37ºC con diálisis posterior contra PBS a 4ºC.

Utilizando el ensayo de trombólisis anteriormente descrito, se observó que la plasmina era capaz de disolver a los trombos del plasma en una forma dependiente de la dosis como se observa en las Figuras 5 y 6. Se añadieron cantidades crecientes de plasmina a los trombos del plasma con fibrina marcada con ^{125}I y el grado de trombólisis se evaluó por medio de la medición de la liberación de radiactividad: (a) 0,15 mg/ml de plasmina en el tubo de reacción, (b) 0,30 mg/ml; (c) 0,45 mg/ml; (d) 0,60 mg/ml; (e) control sin adición de plasmina. Los datos de la Figura 6 de muestran que la plasmina es activa también en un ambiente de plasma y es capaz de disolver trombos en plasma. Este fenómeno depende de la dosis. Al mismo tiempo, a diferencia de la mezcla con Lys-plasminógeno y tPA, la trombólisis por medio de la plasmina sola no progresa hasta la terminación en una ambiente de plasma; la trombólisis tiende a

cesar después de 2 horas. Mientras que no se desea estar limitado por ninguna teoría, este fenómeno se puede explicar por medio de la presencia de diferentes inhibidores de proteasa en un ambiente de plasma y, especialmente por medio de la inhibición rápida de plasmina no enlazada al trombo por medio de la α_2-antiplasmina.

Para evaluar el papel de los inhibidores de plasma en la lisis de trombos catalizada por plasmina, se llevaron a cabo una serie de experimentos de trombólisis con plasma normal y con muestras de plasma que carecen de α_2-antiplasmina, de α_2-macroglobulina o de todos los inhibidores, o de PBS.

Como se observa en la Figura 6, se mejoró la fibrinólisis inducida por plasmina por medio de la supresión o bien de la de α_2-antiplasmina o de la α_2-macroglobulina en el plasma que rodea a los trombos, y aún más por la supresión de todos los inhibidores. Estos resultados confirman que la trombólisis por plasmina está bajo control fisiológico muy estricto por medio de los inhibidores endógenos de plasmina en plasma, proveyendo así una base para una terapia trombolítica más segura.

En contraste con la trombólisis inducida por el activador del plasminógeno, la trombólisis con plasmina se puede controlar por medio de estos inhibidores. La trombólisis inducida por el activador de plasminógeno utiliza la fuente interna de plasminógeno presente en plasma a que, desde el punto de vista práctico, es ilimitado en un organismo humano. Por otro lado, la trombólisis inducida por plasmina depende completamente de la fuente externa de plasmina. La cesación en la administración de plasmina al paciente de resultar en una interrupción rápida de la trombólisis y provee una base para terapia trombolítica más segura.

Ejemplo 6

Comparación de la plasmina acidulada inactivada en forma reversible y tPA en un modelo in vitro de Oclusión Arterial Periférica (PAO)

Los coágulos encogidos y envejecidos son deficientes en plasminógeno, el sustrato requerido por todos los activadores del plasminógeno para una lisis efectiva del coágulo. Robbie y colaboradores, Thrombosis and Haemostasis, 1996, 75(1), 127-33. Los coágulos envejecidos son significativamente menos susceptibles a la lisis por medio de los activadores del plasminógeno.

Los coágulos envejecidos difieren de los coágulos que causan infarto de miocardio o ataque fulminante tanto mecánicamente como en su composición de proteínas. Ellos se encuentran típicamente en las arterias periféricas y pueden crecer hasta un tamaño significativo. El tamaño promedio del coágulo periférico encontrado en las arterias activas es de 14,8 ± 11 cm como se describe en *Ouriel y colaboradores.* Los trombolíticos actuales representados exclusivamente por los activadores del plasminógeno son casi inefectivos en la lisis de estos tipos de coágulos. Típicamente, un paciente con PAO es tratado por más de 24 horas con uroquinasa y aún después de este tiempo tan prolongado, no se logra la completa permeabilidad del vaso. La situación se puede exacerbar cuando se suministran los trombolíticos a través de un catéter en el interior del coágulo, evitando además el acceso del sustrato de plasminógeno requerido por su eficacia.

Otra aproximación a la lisis de los coágulos encogidos es el suministro directo de plasmina activa a través de un catéter, en el interior del coágulo. El suministro de plasmina acidulada inactivada en forma reversible directamente dentro de los coágulos encogidos estrecha la deficiencia inherente del plasminógeno de aquellos coágulos y provee una trombólisis predecible del coágulo, rápida y efectiva independientemente del contenido del plasminógeno. Además, la presencia abundante del inhibidor natural de plasmina, α_2-antiplasmina, en plasma sirve para inactivar instantáneamente cualquier plasmina que se escape de la vecindad del coágulo, evitando así la fibrinólisis distal y los consecuentes episodios de sagrado.

Para comparar la eficacia de la plasmina y del tPA en la lisis de coágulos largos encogidos, hemos desarrollado un modelo *in vitro* que imita los parámetros de los coágulos formados en pacientes con PAO.

Modelo PAO In Vitro. Se recolectó sangre humana fresca entera en tubos de vidrio de 30 x 0,95 cm y se le permitió coagular espontáneamente sin aditivos. Se incubaron los tubos durante 20 horas a 37ºC para permitir un encogimiento completo. Los coágulos encogidos se separaron del suero utilizando tamices para análisis USA Standard D16 con malla 14 y se determinaron sus pesos. Se transfirieron los coágulos de sangre a tubos de vidrio de diámetro más pequeño que se parecían a los coágulos de tamaño promedio en las arterias de la pierna (0,6 x 12 cm). Se insertó un catéter "pulse-spray" de puerto en múltiples costados (tamaño francés con la punta rociadora de 11 cm, Cook, Inc.) dentro del coágulo y se suministró una composición trombolítica de plasmina acidulada activada en forma reversible de acuerdo con la presente invención, (o tPA) con una concentración de 1 mg/ml en incrementos de 1 ml separados con intervalos de 1 hora. El número de inyecciones corresponde a la dosis del trombolítico. Se midió el grado de lisis del coágulo por medio del peso de un coágulo residual y se lo expresó como un porcentaje de la reducción del peso del coágulo. Este modelo es llamado un modelo PAO. Imita las dimensiones de los trombos encontrados en los pacientes con PAO, aunque se utilizó sangre venosa para la formación del coágulo. Tanto tPA como la composición de plasmina acidulada inactivada en forma reversible de acuerdo con la presente invención fueron analizados en este modelo y los resultados son presentados más adelante.

La plasmina es tan efectiva como el tPA para la lisis de los coágulos frescos, a diferencia de cuando tPA y la plasmina son utilizados para la lisis de coágulos encogidos envejecidos durante 20 horas para permitir el entrecruzamiento completo por medio del Factor XIII. El tPA es incapaz de lisar tales coágulos. La reducción en el peso del coágulo obtenida con coágulos tratados con tPA es similar a la del control, aún cuando la dosis es aumentada hasta 5 mg por coágulo.

Por otro lado, la plasmina es efectiva con los coágulos completamente encogidos y entrecruzados. Existe una dependencia con la dosis del efecto lítico de la plasmina y después de cinco inyecciones (ó 5 mg de plasmina en total) los coágulos están casi completamente lisados. En una serie similar de experimentos, se observó la misma inhabilidad para disolver los trombos humanos encogidos y entrecruzados con uroquinasa. La plasmina suministrada localmente es por lo tanto un agente trombolítico más efectivo que tPA y que otros activadores del plasminógeno.

Estos datos *in vitro* muestran que tPA requiere de la presencia de su sustrato, plasminógeno, en el coágulo para iniciar y mantener la lisis del mismo. Por lo tanto, mientras que la plasmina es tan efectiva como el tPA para lisar coágulos frescos o ricos en plasminógeno, la plasmina es más efectiva que el tPA, y que otros activadores del plasminógeno, para lisar los coágulos largos encogidos pobres en plasminógeno. Además, los datos presentados en este ejemplo demuestran que la plasmina es efectiva en su forma acidulada inactivada en forma reversible cuando es inyectada directamente dentro del coágulo.

Los coágulos en los tubos de vidrio son también un modelo en donde se forma un trombo o tapón de fibrina en los catéteres colocados en un humano o en un animal y se ocluye el catéter.

Ejemplo 7

Modelo de trombosis en la vena yugular de conejo

Se determinó la eficacia y seguridad *in vivo* de la plasmina activa administrada localmente por medio de un modelo de trombosis en la vena yugular de conejo de *Collen y colaboradores* (1983). El modelo, en resumen era el siguiente: Los conejos (2-3 kg) son sedados con ketamina/xilazina y se les colocó un catéter venoso 22G en la vena de la oreja para la administración de una solución diluida de pentobarbital (5-10 mg/kg/h). Se les rasuró el cuello y se les colocó un catéter arterial en la arteria carótida para mediciones de la presión y el muestreo de sangre. Se les realizó una traqueotomía para colocarles un tubo traqueal para facilitar la respiración. Se aisló cuidadosamente la vena yugular practicando una disección sin filo e incluyendo la vena facial. Se colocó un catéter 24G en la vena facial y se aseguró la vena yugular tanto en forma distal como proximal a la vena facial aislada. El segmento aislado de la vena fue lavado varias veces con solución salina y se le drenó completamente la sangre. El segmento aislado fue lavado varias veces con una solución de trombina (500 U/ml). Después del último lavado, se retiraron 0,5 ml de muestra de sangre arterial del catéter arterial y se nos mezcló rápidamente con 50 μl de fibrinógeno marcado con ^{125}I (aproximadamente 1 μCi). Se hizo rápidamente infusión de la mezcla dentro del segmento aislado de la vena a través de la vena facial hasta que se distendió completamente el segmento de vena. Se mezcló el trombo masajeando la vena con pinzas y se colocó una pieza de Envoltura Saran sobre la vena yugular expuesta para evitar que se secara. Se administró heparina (100 IU/kg) para evitar la deposición de fibrinógeno frío sobre el trombo. Se le permitió al trombo envejecer durante 30 minutos y se removieron los sujetadores.

Se monitoreó la estabilidad del trombo durante un periodo de equilibrio de 30 minutos. Se monitoreó la disolución del trombo marcado (% de lisis) continuamente con una sonda contador gama G1LE colocada directamente sobre el trombo.

Ejemplo 8

Restauración del flujo venoso

Para proveer una lectura fisiológica de la disolución del trombo, se utilizó la restauración del flujo sanguíneo como otro indicador de trombólisis en una serie separada de experimentos. En esos experimentos, se colocó una sonda de flujo de tamaño apropiado en forma distal al trombo oclusivo (no marcado en forma radiactiva), conectada a un Flujómetro Transónico y se tomaron cada minuto las mediciones de flujo de sangre venosa.

La línea a base del flujo sanguíneo antes de la formación del trombo era de 12-18 ml/min y los datos se representan como el % de línea base. El porcentaje de restauración de flujo de sangre venosa y el consumo de Factor VIII y de fibrinógeno se observan a los 60 minutos en la Figura 7, y a los 90 minutos en la Figura 8. Con dosis de 0,5 mg/kg y 1,0 mg/kg, tPA indujo una restauración de línea base de 16 ± 4% y de 21 ± 10% del flujo sanguíneo a los 60 minutos, respectivamente. La plasmina en una concentración de 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg indujo una restauración de línea base de 20 ± 1% y de 33 ± 1% del flujo sanguíneo, respectivamente. A los 90 minutos, la infusión de tPA resultó en una restauración del flujo sanguíneo de 18 ± 3% y de 26 ± 11%, respectivamente y la plasmina había resultado en una restauración del flujo de 25 ± 5% y de 34 ± 6%, respectivamente.

Ejemplo 9

Tiempos de sangrado de la cutícula (CBT)

Los tiempos de sangrado de la cutícula a los 60 minutos son mostrados en la Figura 9. El tratamiento con solución salina resulta en tiempos de sangrado de 13 ± 1% minuto. El tPA en dosis de 0,5 mg/kg y de 1,0 mg/kg resultó en tiempos de sangrado de 13 ± 2 minutos y de 25 ± 4 minutos, respectivamente, mientras que la plasmina, en dosis de 1,0 mg/kg y de 2,0 mg/kg resultó en tiempos de sangrado de 17 ± 3 y de 19 ± 1 minutos, respectivamente. El tPA muestra un CBT prolongado comparado con cuando se utiliza la plasmina acidulada inactivada en forma reversible, demostrando que la fibrinólisis sistémica por la activación del tPA del plasminógeno endógeno es más extensa que si se administra plasmina y se inhibe rápidamente por factores del suero.

Ejemplo 10

Modelo de hemorragia fibrinolítica de conejo

La mayor seguridad de la plasmina, con relación al activador del plasminógeno tPA, se demostró en un modelo establecido de conejo de sangrado fibrinolítico que representa una indicación válida de hemorragia fibrinolítica, como lo describen *Marder y colaboradores*, (1992).

Las dosis trobolíticamente equivalentes (volúmenes de 10 ml) de plasmina y de tPA se compararon en un modelo de punción en la oreja por sus efectos relativos sobre la ocurrencia y duración de un nuevo sangrado, y sobre parámetros seleccionados de coagulación en plasma y fibrinolíticos. Se hizo infusión de dos dosis diferentes de plasmina (2,0 ó 4,0 mg/kg) o de tPA (1,0 ó 2,0 mg/kg) durante períodos de 60 minutos en conejos a través de un catéter insertado dentro de la vena yugular externa. Las punciones en la oreja (aproximadamente seis por oreja) con una cuchilla de escalpelo antes, durante y después de la infusión de cada agente fibrinolítico, fueron observadas tanto por el tiempo de sangrado como por el nuevo sangrado. Los tiempos del sangrado primario fueron realizados 30 minutos antes, 10 minutos antes, 0, 10, 30, 60, 70, 90, 120 y 180 minutos con relación al inicio de cada infusión. Las muestras de sangre tratadas con citrato (5 ml) fueron obtenidas antes, durante, y hasta dos horas después de infusión de cada agente fibrinolítico; estas muestra de sangre fueron analizadas por fibrinógeno, Factor VIII, y α_2-antiplasmina. Cada grupo experimental consistió de cinco conejos.

Los tiempos de sangrado primario tienden a ser más largos para los grupos con tPA en cada momento después de la iniciación de la infusión hasta el punto de 90 minutos (Tabla 4).

TABLA 4

Tiempos de sangrado primario

Grupo Experimental	**Tiempo Medio de Sangrado por Grupo (Minutos) a Diferentes Tiempos (Minutos) con Relación al Inicio de la Infusión**									
	-30	**-10**	**0**	**10**	**30**	**60**	**70**	**90**	**120**	**180**
tPA (1,0 mg/kg)	2,2	1,7	1,4	3,3	2,8	2,5	1,6	1,6	1,2	2,4
tPA (2,0 mg/kg)	1,7	1,9	1,6	1,6	2,7*	3,9	3,0*	2,3	1,7	1,0
Plasmina (2,0 mg/kg)	1,6	1,7	1,8	2,0	1,9	2,5	1,8	2,2	2,0	1,7
Plasmina (4,0 mg/kg)	1,5	1,5	1,4	2,3	1,1*	2,8	1,4*	0,9	1,4	1,5
***Estadísticamente superior que los valores medios correspondientes observados con los grupos indicados de plasmina (p<0,05)**										

Este efecto fue estadísticamente significativo (p<0,05) en la comparación de los grupos de dosis alta de tPA y de plasmina al minuto 30 y al minuto 70 de los tiempos experimentales.

La Tabla 5 muestra la ocurrencia observada de nuevo sangrado en cada uno de los cuatro grupos experimentales.

TABLA 5

Ocurrencia de Nuevo Sangrado en Cada Grupo Experimental

Grupo Experimental	Número de Animales que Exhiben Nuevo Sangrado
tPA (1,0 mg/kg)	5 de 5
tPA (2,0 mg/kg)	4 de 5
Plasmina (2,0 mg/kg)	0 de 5
Plasmina (4,0 mg/kg)	0 de 5
Grupos combinados con tPA (n=10)	9 de 10
Plasmina combinada	0 de 10

Los resultados distinguen la actividad hemorrágica del activador del plasminógeno, tPA, de aquella de la plasmina. Ninguno de los animales tratados con plasmina exhibió nuevo sangrado, a diferencia de los nueve de diez animales tratados con tPA.

La Tabla 6A resume los tiempos medio de nuevo sangrado en los sitios activos y en todos los sitios de nuevo sangrado para el grupo con dosificación de 1,0 mg/kg de tPA. La Tabla 6B resume los datos correspondientes para el grupo con dosificación de 2,0 mg/kg.

TABLA 6A

Tiempos Medios de Nuevo Sangrado en Conejos que Recibieron tPA a Razón de 1,0 mg/kg

	Tiempo Relativo para Inicio de la Infusión (Minutos)									
	-30	-10	0	10	30	60	70	90	120	180
Porcentaje de sitios que sangraron nuevamente	60	60	80	100	80	20	20	0	0	0
Tiempo medio de nuevo sangrado (minutos) de sitios activos	2,0	4,0	31,3	20,7	9,0	1,5	1,0	-	-	-
Tiempo medio de nuevo sangrado (minutos) de todos los sitios	1,2	2,4	25,0	20,7	7,2	0,3	0,2	-	-	-

TABLA 6B

Tiempos Medios de Nuevo Sangrado en Conejos que Recibieron tPA a Razón de 2,0 mg/kg

	Tiempo Relativo para Inicio de la Infusión (Minutos)									
	-30	-10	0	10	30	60	70	90	120	180
Porcentaje de sitios que sangraron nuevamente	40	80	60	80	60	40	0	0	0	0
Tiempo medio de nuevo sangrado (minutos) de sitios activos	32	23	44,7	68,4	48,7	2,5	-	-	-	-
Tiempo medio de nuevo sangrado (minutos) de todos los sitios	12,8	18,4	26,8	54,7	7,2	29,2	-	-	-	-

El nuevo sangrado en los sitios activos mostró una distinción entre los dos grupos de dosis para tPA, con una duración mayor de nuevo sangrado con las dosis de 2,0 mg/kg con relación a la dosis de 1,0 mg/kg de tPA. Los resultados de las mediciones de química sanguínea se resumen en las Tablas 7-9.

La Tabla 7 presenta los niveles de fibrinógeno medidas en los tiempos experimentales. Los niveles medios de fibrinógeno después de la infusión de tPA cayeron más rápidamente y hasta un punto más bajo que después de las infusiones de plasmina.

TABLA 7

Niveles Medios de Fibrinógeno (mg/dl) en Grupos Experimentales en Diferentes Tiempos (Minutos) con Relación al Inicio de la Infusión en el Minuto 60

	Tiempo Relativo para Inicio de la Infusión (Minutos)							
Grupo Experimental	**-30**	**0**	**10**	**60**	**70**	**90**	**120**	**180**
tPA (1,0 mg/kg)	221	205	202	93	145	126	194	205
tPA (2,0 mg/kg)	260	233	151	118	196	190	214	160
Plasmina (2,0 mg/kg)	208	231	214	149	167	134	183	145
Plasmina (4,0 mg/kg)	297	293	256	222	146	184	159	140

Los valores medios para el Factor VIII (Tabla 8) fueron mayores a la mayoría de los tiempos experimentales para los animales que recibieron infusión de tPA con relación a los animales que recibieron infusión de plasmina, con significancia estadística siendo alcanzada en el tiempo experimental al minuto 60 por cada grupo de tPA versus cada grupo de plasmina.

TABLA 8

Niveles Medios del Factor VIII (porcentaje inicial) en Grupos Experimentales en Diferentes Tiempos (Minutos) con Relación al Inicio de la Infusión en el Minuto 60

	Tiempo Relativo para Inicio de la Infusión (Minutos)							
Grupo Experimental	**-30**	**0**	**10**	**60**	**70**	**90**	**120**	**180**
tPA (1,0 mg/kg)	(100)	87	84	23*	58	77	57	64
tPA (2,0 mg/kg)	(100)	85	56	29*	41	36	46	44
Plasmina (2,0 mg/kg)	(100)	108	87	77	62	56	72	78
Plasmina (4,0 mg/kg)	(100)	85	65	58	58	61	47	50
*Estadísticamente inferior que los valores medios correspondientes de cualquiera de los grupos de plasmina a los 60 minutos ($p<0,05$).								

La recuperación del Factor VIII en animales que recibieron tPA fue aproximadamente de la misma concentración (50-60% de los valores iniciales) que con los animales que recibieron plasmina. La comparación de las dos dosis de tPA mostró una disminución más rápida en el Factor VIII con la dosis mayor y un incremento que repercute más dramáticamente en el Factor VIII con la dosis menor.

Los valores medios para la α_2-antiplasmina que se muestran en la Tabla 9 fueron menores que la mayoría de los tiempos experimentales para los animales que recibieron la infusión de tPA con relación a los animales que recibieron la infusión de plasmina.

TABLA 9

Niveles Medios de la α_2-antitripsina (porcentaje inicial) en Grupos Experimentales en Diferentes Tiempos (Minutos) con Relación al Inicio de la Infusión en el Minuto 60

	Tiempo Relativo para Inicio de la Infusión (Minutos)							
Grupo Experimental	**-30**	**0**	**10**	**60**	**70**	**90**	**120**	**180**
tPA (1,0 mg/kg)	(100)	100	39*	4*	34	37	51	43
tPA (2,0 mg/kg)	(100)	81	12*	0*	9**	15**	15	27
Plasmina (2,0 mg/kg)	(100)	104	93	55	55	56	45	79
Plasmina (4,0 mg/kg)	(100)	102	89	45	20	49	24	24

*Estadísticamente inferior que los valores medios correspondientes de cualquiera de los grupos de plasmina de estos tiempos experimentales ($p<0,05$).

** Estadísticamente inferior que los valores medios para los grupos de plasmina de dosis menor a estos tiempos experimentales ($p<0,05$).

La significancia estadística se alcanzó al minuto 10 y al minuto 60 de los tiempos experimentales entre cada uno de los grupos con tPA y cualquiera de los grupos con plasmina y al minuto 70 y al minuto 90 de los tiempos experimentales entre los grupos con dosis alta de tPA y los grupos correspondientes con baja dosis de plasmina.

Ejemplo 11

Fibrinólisis por medio de miniplasmina

La miniplasmina es una versión truncada de la plasmina que carece del primero de cuatro dominios kringle. Puede ser producida a partir de miniplasminógeno que es generado por medio de proteólisis limitada del plasminógeno con elastasa. La miniplasmina será más efectiva para la lisis de un coágulo que la plasmina de tamaño completo ya que: (a) la miniplasmina es más pequeña que la plasmina (38 kDa vs 84 kDa) y se difundirá más fácilmente dentro del coágulo; y (b) la miniplasmina carece del sito de enlazamiento para la α_2-antiplasmina del kringle 1, y por lo tanto será resistente a la inhibición por la α_2-antiplasmina entrecruzada con el coágulo. La α_2-antiplasmina es a menudo responsable por la resistencia de los coágulos envejecidos para la terapia trombolítica. Se purificó el miniplasminógeno como lo describen *Sottrup-Jensen y colaboradores* (1975). La conversión del miniplasminógeno en miniplasmina, su purificación y formulación se logró utilizando exactamente un protocolo como el descrito para la plasmina del Ejemplo 2.

La potencia trombolítica de la miniplasmina fue comparada con aquella de la plasmina en concentraciones equimolares utilizando el modelo PAO *in vitro* descrito en el Ejemplo 6. Los coágulos se envejecieron durante 20 horas y se suministraron dos dosis de plasmina de 1 ml (1 mg/ml) o de miniplasmina (0,45 mg/ml) al coágulo a través de un catéter. Entre inyecciones, los coágulos fueron incubados a 37ºC durante 1 hora. Se midió el grado de trombólisis por medio de la reducción del peso del coágulo. Los coágulos que recibieron la infusión son solución salina fueron utilizados como control. Dimensiones del coágulo - 0,6 x 12 cm.

Como se muestra en la Figura 10, la miniplasmina causa una lisis mayor del coágulo que la plasmina cuando se la utiliza en las cantidades equimolares. La reducción del peso del coágulo después de dos inyecciones de 1 ml de miniplasmina con una concentración de 0,45 mg/ml fue de 44,3 ± 4,4%, mientras que dos inyecciones de 1 ml de plasmina con una concentración de 1 mg/ml resultaron en una reducción en peso del coágulo de 36 ± 1,7%. La miniplasmina puede ser aún un agente trombolítico más efectivo que la plasmina cuando se suministra a través del catéter directamente a, o dentro del coágulo.

Ejemplo 12

Eficacia de la administración localizada de plasmina a través de un catéter

La eficacia de la plasmina *in vivo* (1-2 mg/kg) administrada localmente a través de un catéter fue comparada con aquella del tPA (0,5 y 1,0 mg/kg) en el modelo de trombosis de la vena yugular de conejo. Se utilizaron dos aproximaciones para evaluar la trombosis: 1) mediciones en tiempo real del porcentaje de lisis con un trombo marcado en forma radioactiva; y 2) restauración de la línea base del flujo sanguíneo a través de la aplicación de una sonda de flujo y de un medidor de flujo. Se monitoreó la velocidad de la trombólisis y se la cuantificó durante 90 minutos, como se describe en el Ejemplo 6. Concomitantemente, el consumo del Factor VIII y de fibrinógeno, así como el tiempo de sangrado de la cutícula (CBT), fueron medidos como indicadores del estado sistémico lítico. Para estos estudios de administración local, se introdujo un catéter (PE 50) a través de la vena marginal de la oreja, hasta 1 cm dentro del

trombo obstructor. Se utilizaron dos dosis de tPA: 0,5 y 1,0 mg/kg y dos dosis de plasmina: 1,0 mg/kg y 2,0 mg/kg. Estas dosis estaban contenidas en un volumen total de 10,0 ml con los cuales se hizo una infusión durante 30 minutos. El porcentaje de lisis a los 60 y 90 minutos con el trombo marcado en forma radioactiva fue medido y, en otra serie separada de experimentos con trombos no marcados, el porcentaje de restauración de flujo fue medido en momentos similares. Las muestras de sangre arterial (4 ml) obtenidas a los 0 minutos y a los 60 minutos fueron utilizadas para la determinación de los niveles de fibrinógeno y del Factor VIII. Los niveles del Factor VIII y las concentraciones de fibrinógeno fueron determinados utilizando un Reloj para Medición de la Coagulación MLA Electra 800 y el Juego para Ensayo del Fibrinógeno. Los niveles de Factor VIII fueron determinados por medio del ensayo COATEST VIII C4 utilizando el Factor VII humano para generar una curva estándar. Los tiempos de sangrado de la cutícula a los 0 minutos y a los 60 minutos fueron determinados pellizcando con una pinza la uña del conejo, en el ápice, con un cortaúñas para perro. La sangre fue untada ligeramente, sin tocar la uña, con un papel filtro cada dos minutos hasta que se formó un trombo y el papel filtro no absorbió más sangre. Los resultados se presentan como la Media ± SEM, y para evaluar las diferencias significativas entre los grupos se utilizó un ANOVA de un solo sentido seguido por un procedimiento de Bonferroni para análisis por comparación múltiple. P<0,05 fue considerado significativo.

Se hizo infusión de plasmina o de tPA (volumen total 10 ml) durante 30 minutos a través de un catéter colocado próximo 1 cm del trombo. Un volumen igual de solución salina sirvió como control. Las dosis de plasmina de 1,0-2,0 mg/kg fueron comparadas con una dosis de 0,5 mg/kg de tPA. Se utilizó un ANOVA de un solo sentido seguido por el método de Dunn para un análisis de comparación múltiple para evaluación estadística, (*p<0,05 comparado con tPA con una concentración de 0,5 mg/kg, o # vs tPA o una concentración de 1,0 mg/kg).

Cuando se compara con tPA (0,5-1,0 mg/kg), la infusión de plasmina (1,0-2,0 mg/kg) indujo localmente una trombólisis comparable o significativamente mejor, con un consumo similar o menor del Factor VIII y de fibrinógeno y CBT. La evaluación de riesgo/beneficio del tratamiento con plasmina reveló que una dosis doble de plasmina (con base en el peso) indujo efectos similares de sangrado a los de tPA. Por lo tanto, se puede utilizar plasmina en forma efectiva y segura como agente trombolítico durante la trombólisis local asistida por catéter. La plasmina tiene una actividad lítica comparable o superior cuando se la compara con tPA, y el perfil de seguridad parece similar en este modelo animal para el suministro trombolítico local.

El grado de trombólisis se calculó a partir de la relación entre la cantidad de radiactividad liberada por el trombo en el plasma y la cantidad total de radiactividad en el tubo de reacción. La liberación de los productos de degradación de la fibrina marcada, expresada en porcentaje, fue graficada versus tiempo.

El porcentaje de lisis de los trombos marcados en forma radioactiva y el consumo del Factor VIII y de fibrinógeno se muestran con períodos de incubación de 60 minutos (Figura 11) y de 90 minutos (Figura 12). Con una concentración de 0,5 mg/kg y de 1,0 mg/kg, tPA indujo 16 ± 2% y 21 ± 2% de lisis, respectivamente, la plasmina con una concentración de 1,0 mg/kg y de 2,0 mg/kg indujo 26 ± 3% y 33 ± 4% de lisis, respectivamente. A los 90 minutos, la infusión de tPA había resultado en 21 ± 2% y 26 ± 2% de lisis, respectivamente, comparado con la plasmina que indujo una lisis de 31 ± 4% y 36 ± 2%, respectivamente.

Ejemplo 13

Evaluación del riesgo/beneficio del tratamiento con plasmina vs el tratamiento con tPA

Se hizo una extensa evaluación farmacológica comparativa (riesgo/beneficio) de la plasmina en el modelo de trombólisis en conejo. La eficacia de la plasmina fue comparada con aquella del tPA. Se utilizaron el porcentaje de lisis y de restauración del flujo sanguíneo como índices de eficacia. Estos análisis se llevaron a cabo en experimentos separados. Los respectivos efectos secundarios inducidos por estos agentes trombolíticos fueron comparados por medio de la medición del consumo del Factor VIII y de fibrinógeno y evaluando los tiempos de sangrado. Esto permitió una determinación de un perfil aproximado de riesgo/beneficio.

Para determinar el perfil de riesgo, se calculó la dosis de ED_{50} para tPA, utilizando el consumo del Factor VIII como marcador sustituto para la inducción del estado lítico y del sangrado. El consumo del Factor VIII fue directamente relacionado con el efecto secundario del sangrado surtiendo de nuevo Factor VIII (Kogenatee) y retornando a la hemostasis normal. Se examinaron las dosis de tPA en el rango de 0,1 mg/kg hasta 3,0 mg/kg con un N de al menos 10 animales/dosis. 1,0 mg/kg es considerada una dosis clínica para tPA. El ED_{50} calculado para tPA fue de 1,8 mg/kg. Un cálculo similar para la administración local de plasmina produjo un ED_{50} de 3,6 mg/kg. Por lo tanto, una dosis doble de plasmina (con base en el peso) indujo efectos secundarios similares de sangrado que el tPA. Se evaluó la eficacia (% de lisis y de flujo sanguíneo) con dosis de tPA y de plasmina con perfiles equivalentes de riesgo, esto es, consumo de proteínas de coagulación y sangrado, como se muestra en la Figura 13. Con todas las dosis equivalentes de riesgo analizadas, tPA (0,5 - 3,0 mg/kg) y plasmina (1,0 - 3,0 mg/kg), la plasmina indujo tasas de lisis por lo menos similares o significativamente mejores y de restauración del flujo sanguíneo en comparación con tPA. Los datos farmacológicos, por lo tanto, son suficientes para recomendar que la plasmina sea considerada para el tratamiento lítico de trombos accesibles por medio de la colocación de un catéter.

Ejemplo 14

Péptidos de la degradación de las muestras de plasmina caracterizados por la secuenciación N-terminal

Los péptidos de la degradación de las muestras de plasmina se caracterizaron por medio de la secuenciación N-terminal de la siguiente manera. Se formularon composiciones de plasmina con valores de pH bajos: un pH menor a 2,5 y un pH de 3,5 y de 3,8 que contenía ácido acético 2 mM. Las muestras de plasmina se analizaron utilizando SDS-PAGE con geles Bis-Tris NuPage al 4-12%, como se observa en la Figura14. Se transfirieron las bandas de proteína a una membrana de PVDF, se las coloreó con Azul de Coomassie R-250 (Bio-RAD Laboratories, Hercules, CA) y se cortaron las bandas utilizando un escalpelo.

El análisis de la secuencia N-terminal fue realizado directamente a partir de la membrana utilizando un Secuenciador de Proteína Hewlett Packard 241(Hewlett Packard, Inc., Glen Allen, VA.). Se corrieron diez ciclos para cada banda para que pudiera ser identificado el fragmento correspondiente de plasmina. Se determinaron los pesos moleculares de cada banda por medio de un análisis de densitometría utilizando el marcador Mark 12 disponible con Invitrogen, Inc. (San Diego, CA).

Tres polipéptidos generados por incubación de plasmina a pH 3,8 comenzaron en las posiciones (numeración con relación a Lys-plasmina) treonina (T105), glicina (G190) y ácido glutámico (E623). A partir de la secuencia conocida de aminoácidos de la plasmina, se determinó que los primeros dos polipéptidos eran de cadena pesada y el tercero de cadena liviana. Como se observa en la Figura 15, el aminoácido que precede al aminoácido N-terminal era o bien arginina o bien lisina (K104, R189, y K622). Se sabe comúnmente que la plasmina escinde proteínas sobre el lado del carboxílico de la lisina y de la arginina. Estos resultados demostraron que las composiciones de plasmina a pH 3,8 eran susceptibles a la autodegradación.

Tres polipéptidos generados por incubación de plasmina a pH 2,2 comenzaron con prolina en los N-terminales. A partir de la secuencia conocida de aminoácidos de la plasmina, se determinó que estos polipéptidos eran de cadena pesada, comenzando en las posiciones P63, P155 y P347, como se observa en la Figura 15. El aminoácido que precede a cada prolina era un ácido aspártico (D62, D154, y D346). Es comúnmente sabido que los enlaces del péptido aspartilo-prolilo (D-P) son lábiles al ácido. Estos resultados demostraron que las composiciones de plasmina a un pH de 2,2 eran susceptibles a hidrólisis ácida de los enlaces del péptido.

Ejemplo 15

Azúcares en una formulación de bajo pH que estabilizan a la plasmina

La plasmina fue formulada en uno de los siguientes ácidos con al menos uno de los siguientes azúcares, a pH 2,5 a 4,0. El grupo de ácidos incluía 1 mM a 500 mM de ácido acético, ácido cítrico, serina, treonina, isoleucina, valina, glutamina, β-alanina, u otros ácidos, preferiblemente en el rango de 1 mM a 50 mM. El grupo de los azúcares incluía 0,2% a 20% de maltosa, manitol, sorbitol, sacarosa, lactosa, glucosa y trehalosa. La formulación de plasmina sin ningún excipiente fue incluida como control. Todas las muestras fueron incubadas a 37ºC durante 7días. El cambio en la integridad de la plasmina fue analizado corriendo un SDS-PAGE reductor.

Los resultados mostrados en la Figura 16 demuestran que los azúcares tienen un efecto estabilizante sobre la plasmina a un pH de 3,5 y que mejoran los beneficios de almacenar la plasmina acidulada inactivada en forma reversible a un pH bajo.

Ejemplo 16

Estabilización de la composición de plasmina acidulada inactivada en forma reversible con agentes de estabilización que no son carbohidratos

Las composiciones aciduladas inactivadas en forma reversible fueron formuladas en una concentración de 1 mg/ml en ácido acético 5 mM, pH 3,7, de acuerdo a la presente invención, con 0,1 M de glucosamina, niacinamida, citrulina o tiamina añadidas como estabilizadores que no son de carbohidrato. Una formulación de plasmina acidulada inactivada en forma reversible sin ningún agente de estabilización como excipiente fue incluida como control. Todas las muestras fueron incubadas a 37ºC durante 7días de febrero y se analizó el cambio en la integridad de la plasmina utilizando SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras. Con referencia ahora a la Figura 17, todos los agentes de estabilización analizados que no son azúcares mejoraron la estabilidad de la composición de plasmina acidulada inactivada en forma reversible a 37ºC durante los 7 días del período de análisis.

Las composiciones de plasmina con aciduladas inactivadas en forma reversible fueron formuladas también en una concentración de 1 mg/ml en ácido acético 2 mM, pH 3,4, de acuerdo a la presente invención, con cloruro de sodio 150 mM como agente de estabilización. La misma formulación, pero sin cloruro de sodio, fue preparada también e incubada como control. Las muestras fueron incubadas a 4ºC durante 28 días. El cambio en la integridad de la plasmina fue analizado utilizando SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, como se describe en el Ejemplo 3 más arriba. Los valores fueron normalizados con relación a los controles el día 0 y se les asignó un valor de 100%. En la Tabla 5, los resultados demuestran que la plasmina almacenada a 4ºC es más estable en la formulación de pH bajo que contiene cloruro de sodio.

TABLA 5

Estabilidad de la composición de plasmina acidulada inactivada en forma reversible (NaAc 2 mM, pH 3,4) con o sin cloruro de sodio 150 mM, almacenada a 4ºC

Concentración de Cloruro de Sodio (mM)	Plasmina (mg/ml)	% de la cadena pesada intacta después de 28 días	% de la cadena liviana intacta después de 28 días	% de actividad después de 28 días
0	1	90	93	81
150	1	101	95	97

Ejemplo 17

El plasma puede neutralizar proporcionalmente grandes volúmenes de solución salina acidulada

Con el propósito de estimar el volumen de las composiciones de plasmina aciduladas inactivadas en forma reversible de la presente invención que puede ser neutralizado por un mililitro de suero a pH fisiológico, se llevaron a cabo una serie de experimentos de titulación. Se estima que un volumen de 1 ml de suero representa el volumen en fase líquida de un coágulo encogido promedio encontrado en la arteria de un paciente con PAO. Se tituló el suero (1 ml) con una solución acidulada (pH 3,7) de amortiguador con baja capacidad de amortiguación típica de aquella en la cual es formulada la plasmina acidulada inactivada en forma reversible de acuerdo a la presente invención. 1 ml de suero es capaz de neutralizar aproximadamente 150 ml de solución salina acidulada. El último volumen excederá el volumen probable de plasmina acidulada inactivada en forma reversible requerida para el tratamiento de oclusiones arteriales periféricas.

Por lo tanto, la formulación de la plasmina acidulada inactivada en forma reversible en un amortiguador con baja capacidad de amortiguación provee las bases para una composición farmacéutica estable y efectiva. Tales composiciones permitirían la administración de plasmina acidulada inactivada en forma reversible, a temperatura ambiente durante el tiempo requerido por el tratamiento sin que la plasmina pierda potencia significativamente durante el suministro de la preparación al paciente.

Ejemplo 18

La tripsina estabilizada a pH bajo puede ser reactivada por medio de la transferencia a un ambiente con un pH más alto

Se disolvió tripsina (16,4 mg, Sigma Chemical Co. Catálogo No. T-1426) en 2,28 ml de Tris 50 mM/NaCl 0,5 M (pH 8,0). Se cargó la solución de tripsina sobre una columna de 1 ml de Sefarosa con Benzamidina (Pharmacia Código No. 17-0568-01) que había sido previamente equilibrada con Tris 50 mM/NaCl 0,5 M (pH 8,0). Se lavó esta columna volumen 4 ml de este último amortiguador, resultando en una disminución en la absorbancia del eluato (280 nm) a menos de 0,03. Se eluyó la tripsina de esta columna en un estado inactivado con volúmenes de 0,5 ml de glicina 200 mM/NaCl 0,5 M (pH 3,0); la tercera a la quinta fracciones de 0,5 ml que eluyeron de esta columna contenían los valores pico de absorbancia (280 nm) y fueron reunidas. Se determinó que la absorbancia (280 nm) de este eluato reunido de tripsina era de 9,22; con base en el coeficiente de extinción para la tripsina (E_{280} para una solución al 1% = 17,09) y el peso molecular de la tripsina (24.000), se calculó que la concentración total de la proteína tripsina en este eluato reunido de la columna era de 225 μM.

La concentración de los sitios activos de tripsina en este eluato reunido de tripsina de la columna fue determinado por medio del método descrito por Case & Shaw, Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 508 (1967) utilizando p-nitrofenilguanidinobenzoato como titulante del sitio activo. Este ensayo fue llevado a cabo a un pH de 8,3, por medio de la dilución de un pequeño volumen (100 μl) del eluato reunido de la tripsina de la columna en una mezcla de ensayo que también contenía 700 μl de borato de sodio 50 mM (pH 8,3), 200 μl de fosfato de sodio 10 mM/glicina al 1% (pH 7,0) más 10 μl de p-nitrofenilguanidinobenzoato (disuelto en dimetil formamida); se determinó que el pH final de esta composición de la mezcla era de 8,3. La cantidad dependiente de tripsina del p-nitrofenol formado en este ensayo fue monitoreado a 410 nm. Con base en el coeficiente de extinción para el p-nitrofenol a 410 nm y un pH de 8,3 (16.595 M^{-1}), 100 μl de este eluato reunido de la tripsina de la columna presentes en el ensayo de 1,01 ml correspondieron a una concentración de sitios activos de tripsina de 22,95 μM presentes en la cubeta. Por lo tanto, la solución patrón original del eluato reunido de la tripsina de la columna contenía 231 μM de sitios activos de tripsina. Este último valor es idéntico, dentro del error experimental, a la concentración de la proteína tripsina total presente (225 μM). Estos resultados demuestran que la tripsina se puede ajustar a un pH bajo y luego transferirla a un ambiente de pH más alto con reactivación de su sitio activo.

Referencias

Deutsch, D. G. & **Mertz**, E.T., *Science* 170, 1095-1096. (1970)

Robbins, K.C. & **Summaria**, L. *Meth. Enzymol*., 19,257-273 (1970)

Castellino, F.J. & **Powell**, JR. *Meth. Enzymol*., 80, 365-378.(1981)

Lijnen, H.R., **Zamarron**, C., **Blaber**, M., **Winkler**, M.E. & **Collen**, D, *J. Biol. Chem*. 261, 1253-1258 (1986)

Wiman, B., *Biochem. Journal*. 191(1):229-32(1980)

Barrett, A.J., **Brown**, M.A., & **Sayers**, C.A., 181, 401-418 (1979)

Collen, D, **Stassen**, J.M., & **Verstraete**, M., *J. Clin. Invest*. 71(2), 368-376 (1983)

Marder, V.J., **Shortell**, C.K., **Fitzpatrick**, P.G., **Kim**, C & **Oxley**, D. *Thrombosis Res*. 67, 31-40 (1992)

Patentes estadounidenses Nos:

5.288.489

3.950.513

5.879.923

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5288489 A, Reich [0011] [0149]
- US 5879923 A, Yago [0013] [0149]
- US 3950513 A, Jenson [0012] [0149]
- US 4774087 A [0042] [0046]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- **ROBBIE** y colaboradores *Thrombosis and Haemostasis*, 1996, vol. 75 (1), 127-33 [0101]
- **CASE**; **SHAW**. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 1967, vol. 29, 508 [0148]
- **DEUTSCH**, D. G.; **MERTZ**, E.T. *Science*, 1970, vol. 170, 1095-1096 [0149]
- **ROBBINS**, K.C.; **SUMMARIA**, L. *Meth. Enzymol*., 1970, vol. 19, 257-273 [0149]
- **CASTELLINO**, F.J.; **POWELL**, JR. *Meth. Enzymol*., 1981, vol. 80, 365-378 [0149]
- **LIJNEN**, H.R.; **ZAMARRON**, C.; **BLABER**, M.; **WINKLER**, M.E.; **COLLEN**, D. *J. Biol. Chem*., 1986, vol. 261, 1253-1258
- **WIMAN**, B. *Biochem. Journal*, 1980, vol. 191 (1), 229-32 [0149]
- **COLLEN**, D; **STASSEN**, J.M.; **VERSTRAETE**, M. *J. Clin. Invest*., 1983, vol. 71 (2), 368-376 [0149]
- **MARDER**, V.J.; **SHORTELL**, C.K.; **FITZPATRICK**, P.G.; **KIM**, C; **OXLEY**, D. *Thrombosis Res*., 1992, vol. 67, 31-40 [0149]

REIVINDICACIONES

1. El uso de una plasmina acidulada inactivada en forma reversible que está sustancialmente libre de un activador de plasminógeno, un excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable que tiene, o que ha sido acidulado hasta, un pH por debajo de 4,0, y opcionalmente, un estabilizador, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una oclusión trombótica en un humano o animal sin neutralización antes de la administración, en donde la dosis terapéutica puede ser suministrada dentro de, o en forma próxima a dicha oclusión trombótica.

2. El uso de la Reivindicación 1, en donde la oclusión trombótica es una oclusión vascular seleccionada de una trombosis coronaria, una trombosis venosa profunda, una trombosis periférica, una trombosis embólica, una trombosis en la vena hepática, una trombosis marásmica, una trombosis en el seno, una trombosis venosa, una trombosis arterial, una derivación arterio-venosa ocluida, hubo un dispositivo tipo catéter ocluido.

3. El uso de la Reivindicación 1 ó 2, en donde el medicamento está liofilizado.

4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la plasmina es Glu-plasmina, Lys-plasmina, mini-plasmina, microplasmina, o una variante truncada de las mismas.

5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el medicamento comprende además un agente anti-trombótico.

6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el excipiente acidulado farmacéuticamente aceptable es un ácido orgánico seleccionado de un ácido carboxílico, un oligopéptido, un aminoácido, o un ácido inorgánico.

7. El uso de la reivindicación 6, en donde el ácido farmacéuticamente aceptable se selecciona de ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, glicina, isoleucina, serina, treonina, glutamina, ácido aspártico, valina y alanina.

8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde el ácido está en el rango de concentraciones entre 1 mM y 500 mM.

9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, en donde el ácido está en el rango de concentraciones entre 1 mM y 50 mM.

10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el medicamento tiene un pH entre 2,5 y 4,0.

11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el medicamento tiene un pH entre 3,0 y 4,0.

12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el medicamento tiene un pH entre 3,1 y 3,5.

13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la plasmina de mamífero está en el rango de concentraciones entre 0,01 mg/ml y 50 mg/ml.

14. El uso de la Reivindicación 7, en donde la plasmina de mamífero está en el rango de concentraciones entre 0,1 mg/ml y 10 mg/ml.

15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el medicamento comprende además un agente estabilizante.

16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el agente de estabilización es un carbohidrato farmacéuticamente aceptable seleccionado de glucosa, maltosa, manitol, sorbitol, sacarosa, lactosa o trehalosa.

17. El uso de la Reivindicación 16, en donde el carbohidrato tiene una concentración en el rango de 0,2% p/v y 20% p/v.

18. El uso de la Reivindicación 16 ó 17, en donde el carbohidrato es glucosa y la concentración del mismo es del 20%.

19. El uso de la Reivindicación 16, en donde el agente de estabilización tiene una concentración en el rango de 0,01 M a 0,1 M.

20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el agente de estabilización se selecciona de glucosamina, niacinamida y tiamina.

21. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la dosis terapéutica de la plasmina acidulada inactivada en forma reversible está en el rango entre 0,1 mg de plasmina/kg de peso corporal y 10,0 mg de plasmina/kg de peso corporal.

22. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la dosis terapéutica de la plasmina acidulada inactivada en forma reversible está en el rango entre 0,2 mg de plasmina/kg de peso corporal y 4,0 mg de plasmina/kg de peso corporal.

23. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la dosis terapéutica de la plasmina acidulada inactivada en forma reversible está en el rango entre 1,0 mg de plasmina/kg de peso corporal y 2,0 mg de plasmina/kg de peso corporal.

24. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en donde el medicamento puede ser administrado por medio de un dispositivo tipo catéter.

25. El uso de la reivindicación 24, en donde el dispositivo tipo catéter es un catéter intravascular.

26. El uso de la Reivindicación 25, en donde el catéter intravascular puede ser dirigido a una oclusión vascular.

27. El uso de la Reivindicación 25 ó 26, en donde el catéter intravascular puede suministrar el medicamento en forma próxima a, o dentro, de una oclusión trombótica.

28. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde el catéter intravascular es capaz de entrar a la oclusión trombótica y el catéter puede suministrar el medicamento directamente dentro de la oclusión trombótica.

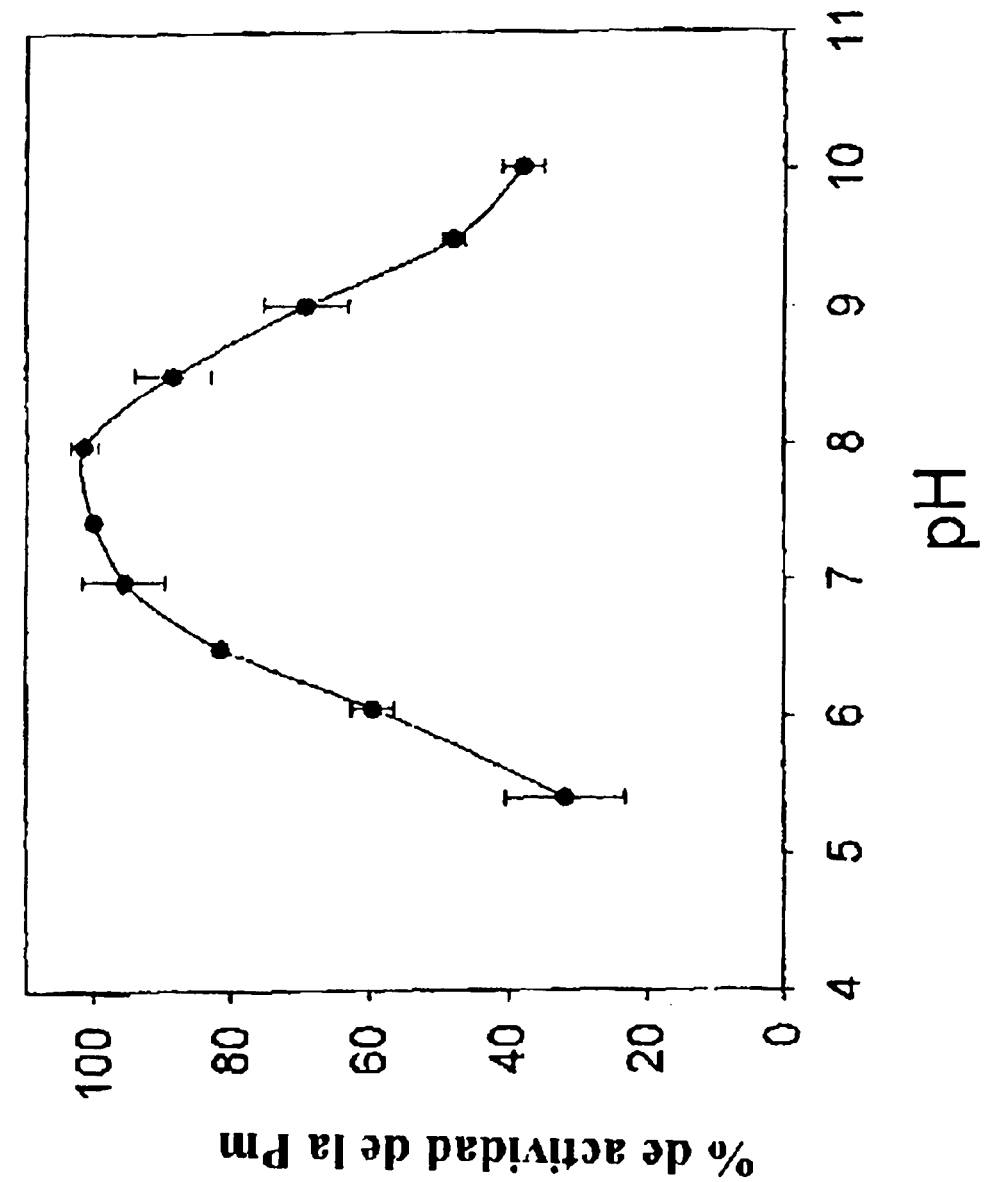


Fig 1.

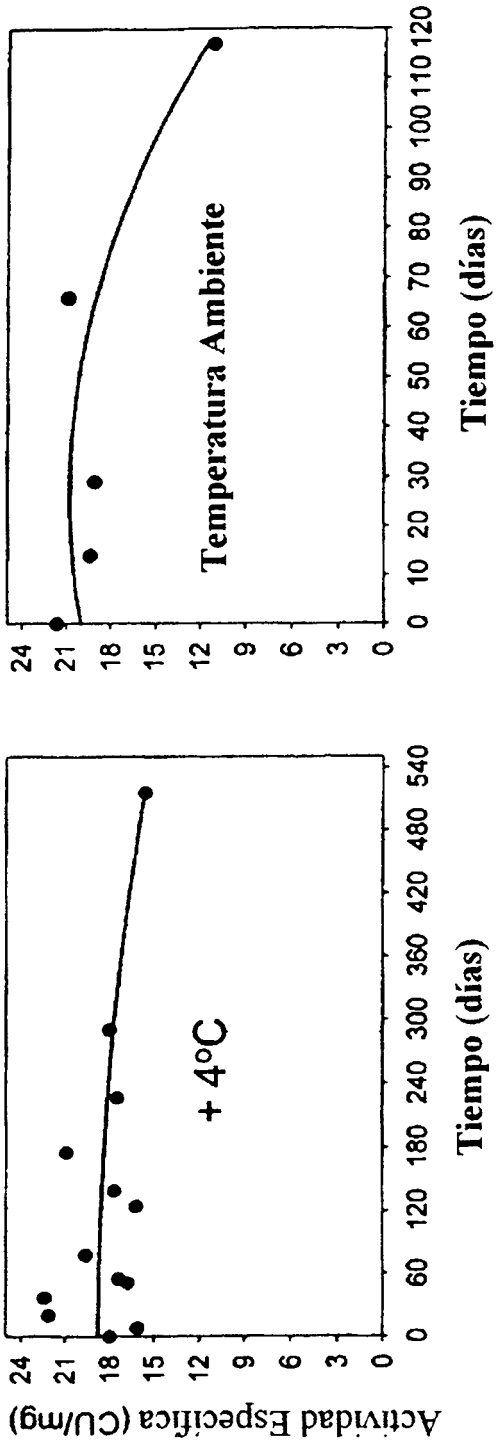

Actividad Específica (CU/mg)
24
21
18
15
12
9
6
3
0
0 60 120 180 240 300 360 420 480 540
Tiempo (días)
+ 4°C
Temperatura Ambiente
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
Tiempo (días)

Fig 2.

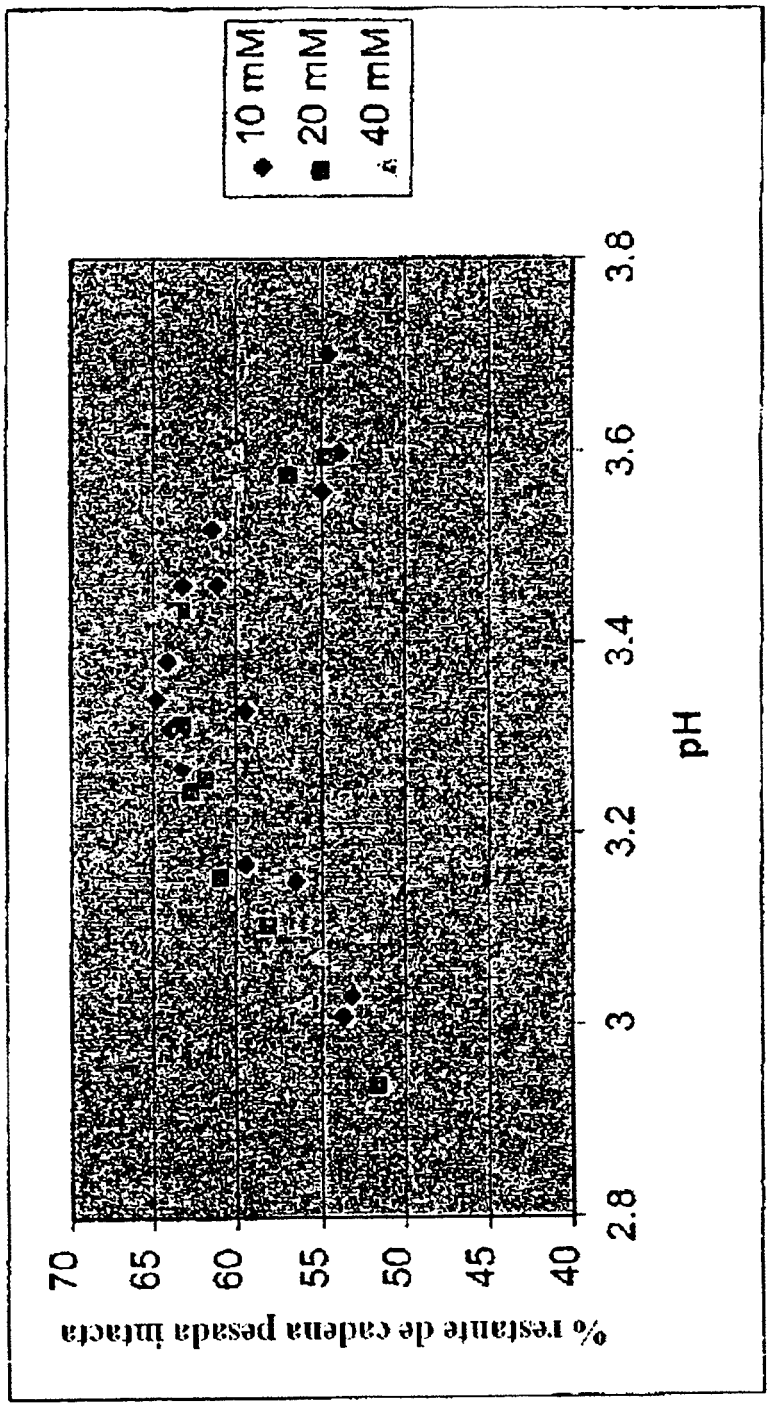

10 mM
20 mM
40 mM
% restante de cadena pesada ltacta
70
65
60
55
50
45
40
2.8
3
3.2
3.4
3.6
3.8
pH

Fig 3.

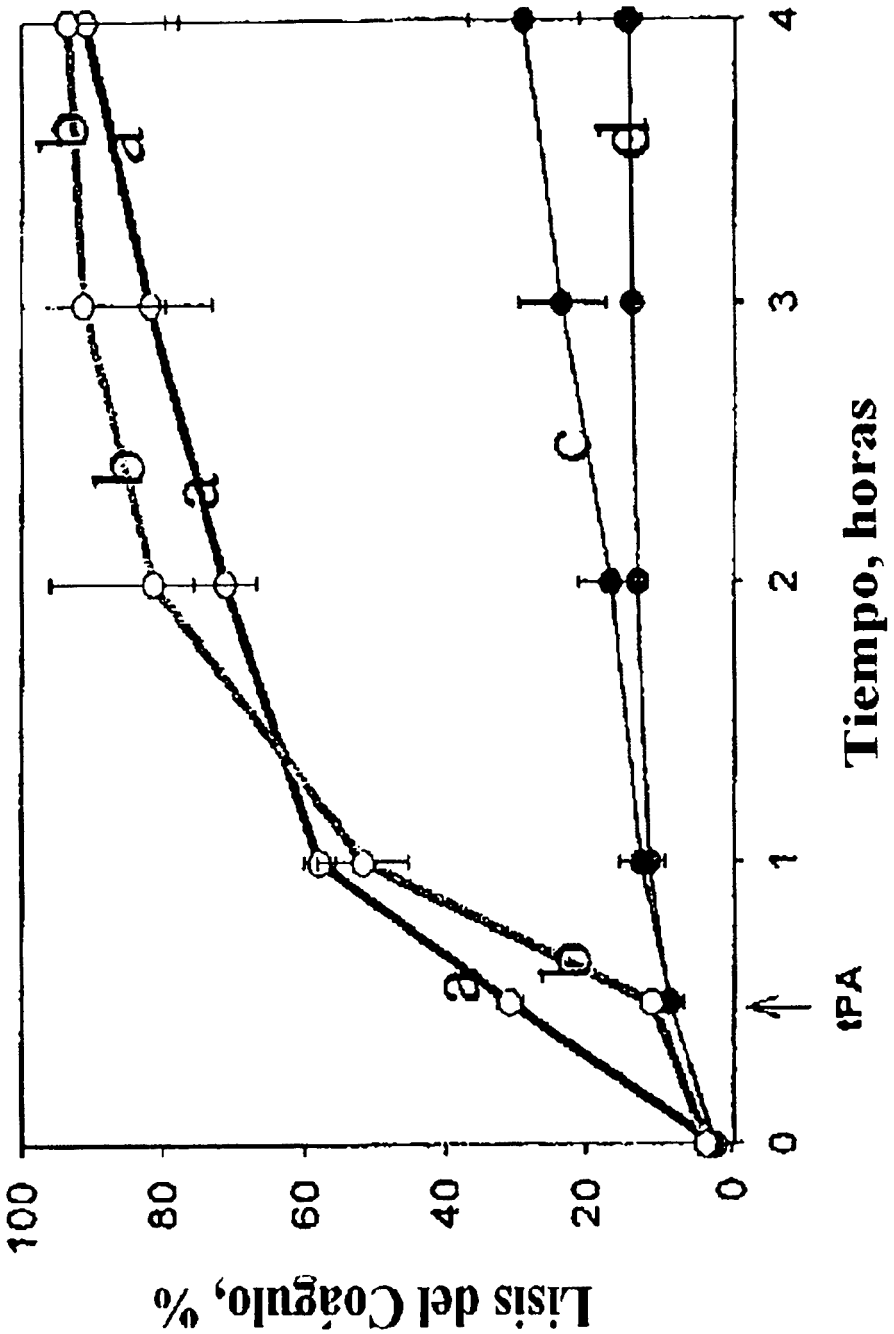

Lisis del Coágulo, %
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
tPA
Tiempo, horas
a
b
c
d

Fig 4.

Fig. 5

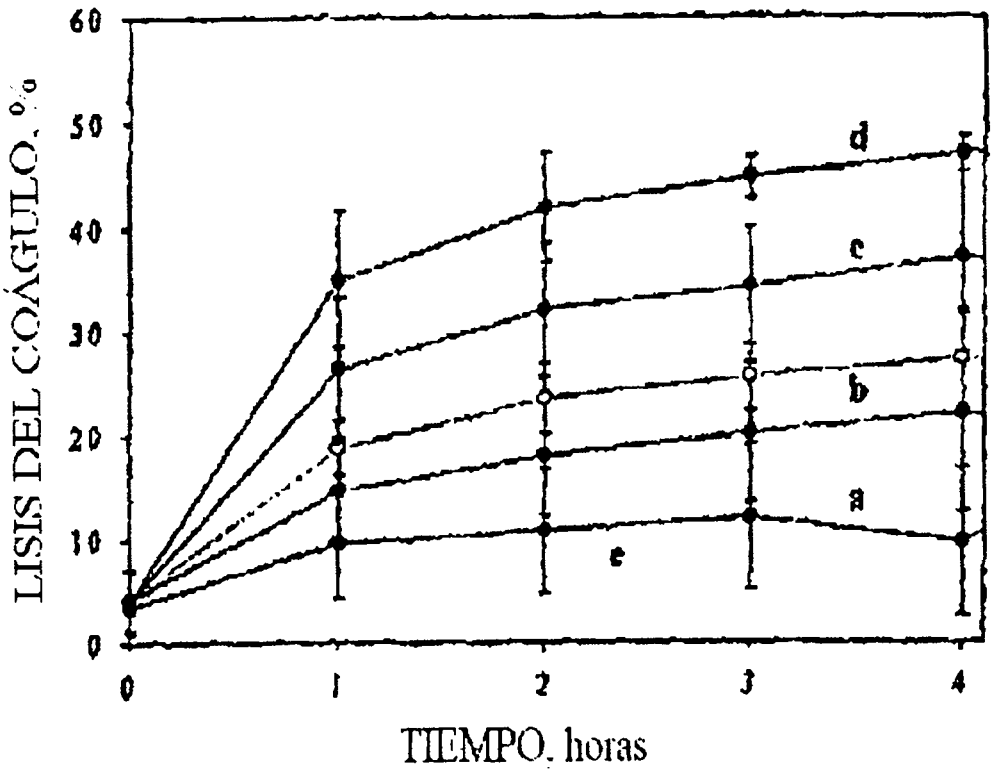
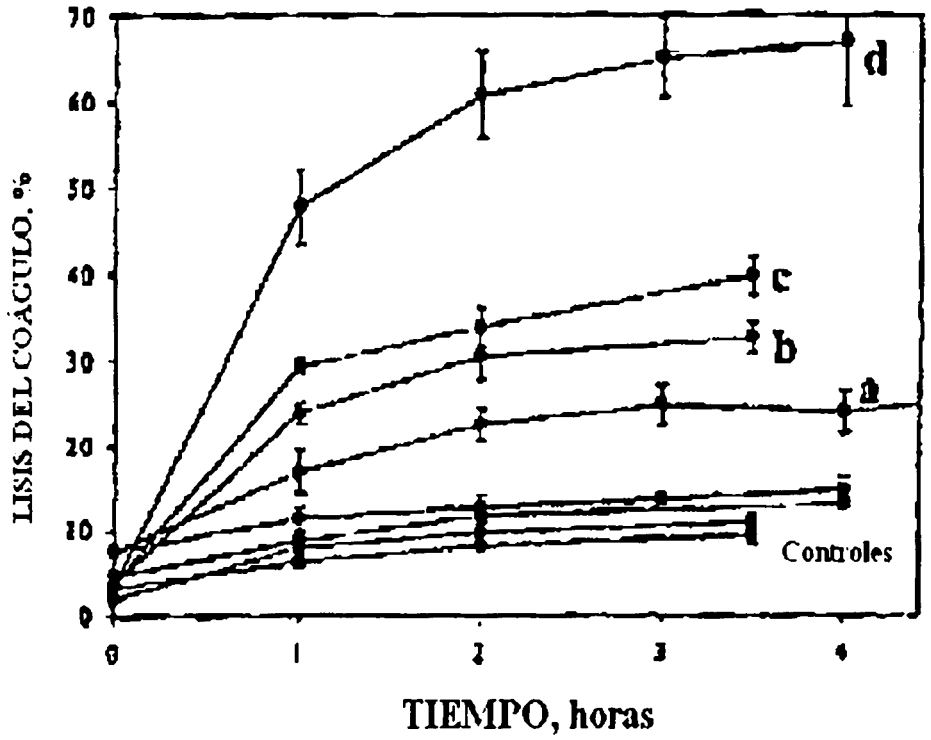
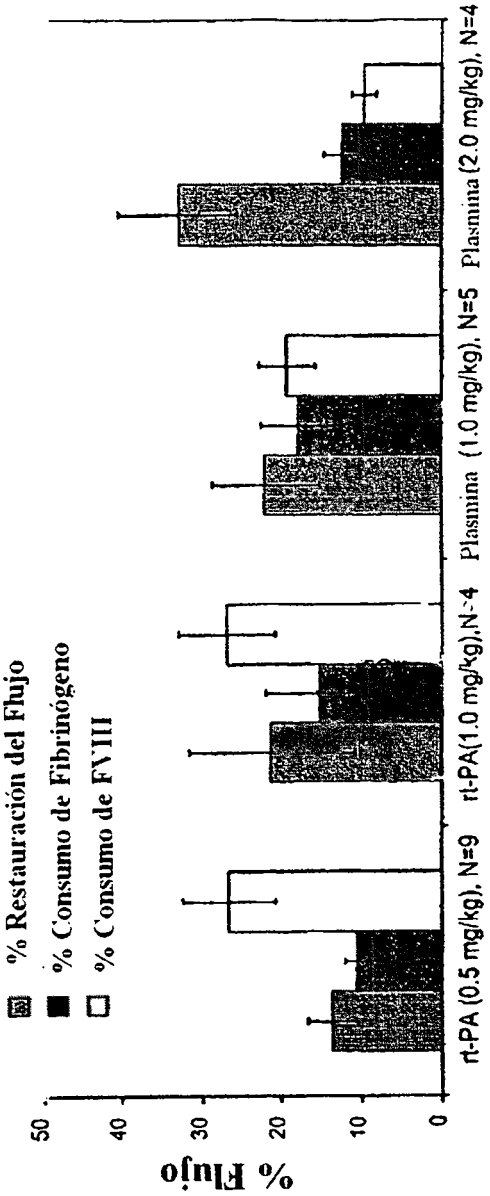
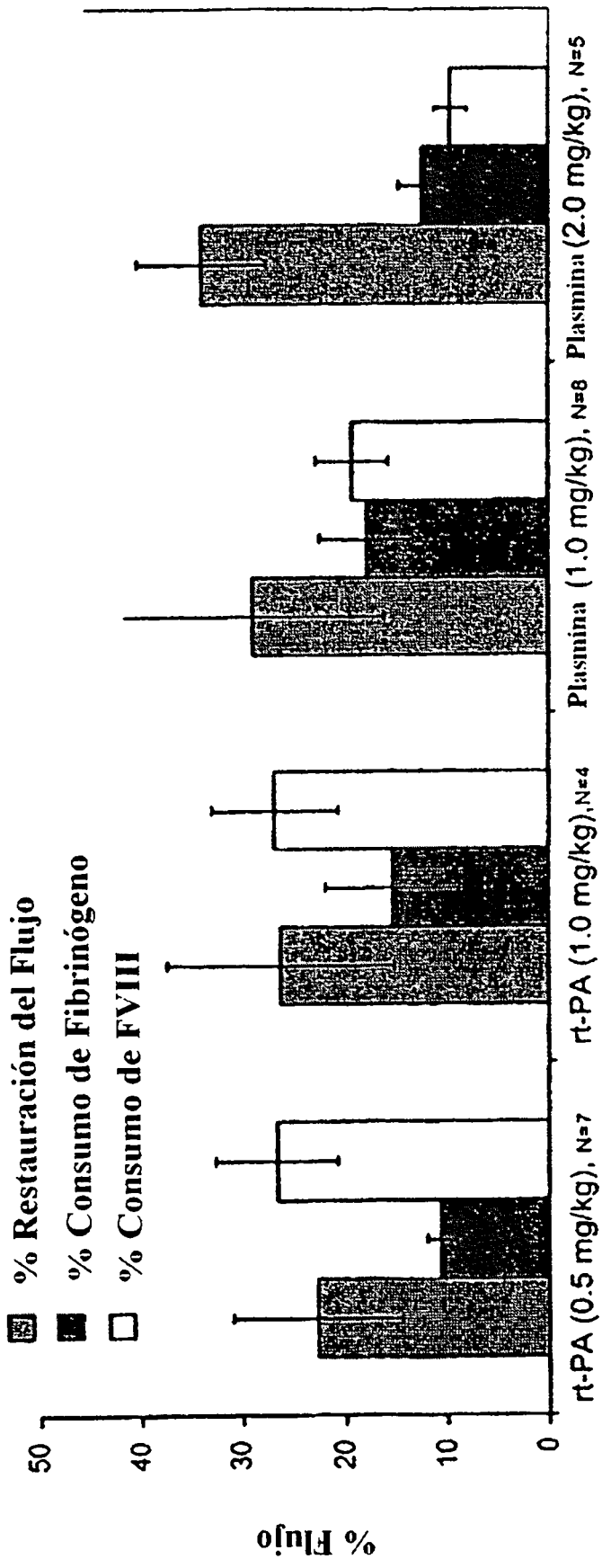


Fig. 6.


LISIS DEL COÁGULO, %
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
TIEMPO, horas
d
c
b
a
Controles


% Restauración del Flujo
% Consumo de Fibrinógeno
% Consumo de FVIII
% Flujo
0
10
20
30
40
50
rt-PA (0.5 mg/kg), N=9
rt-PA(1.0 mg/kg),N=4
Plasmina (1.0 mg/kg), N=5
Plasmina (2.0 mg/kg), N=4


% Restauración del Flujo
% Consumo de Fibrinógeno
% Consumo de FVIII
% Flujo
50
40
30
20
10
0
rt-PA (0.5 mg/kg), N=7
rt-PA (1.0 mg/kg), N=4
Plasmina (1.0 mg/kg), N=8
Plasmina (2.0 mg/kg), N=5

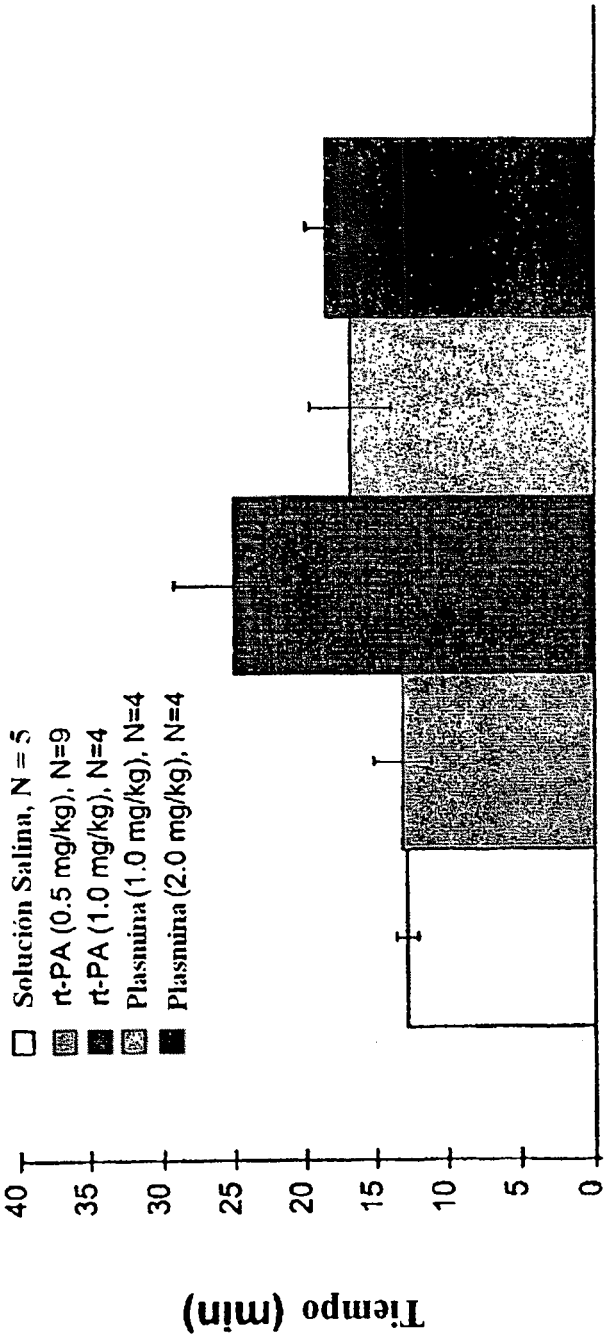
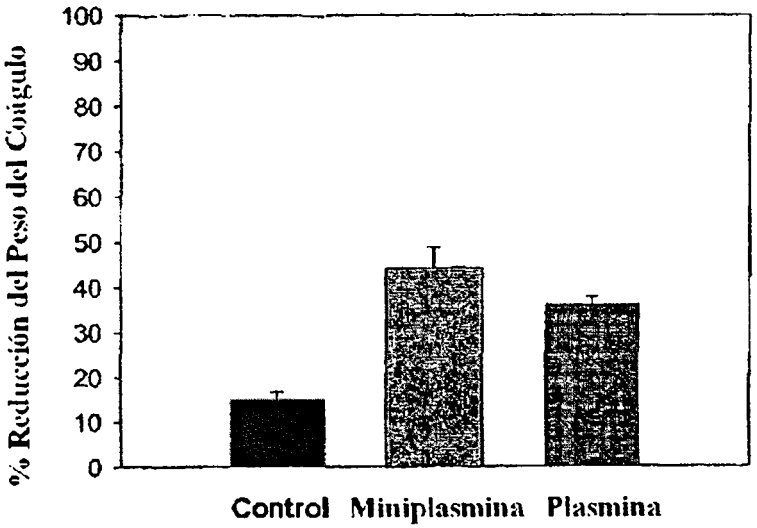
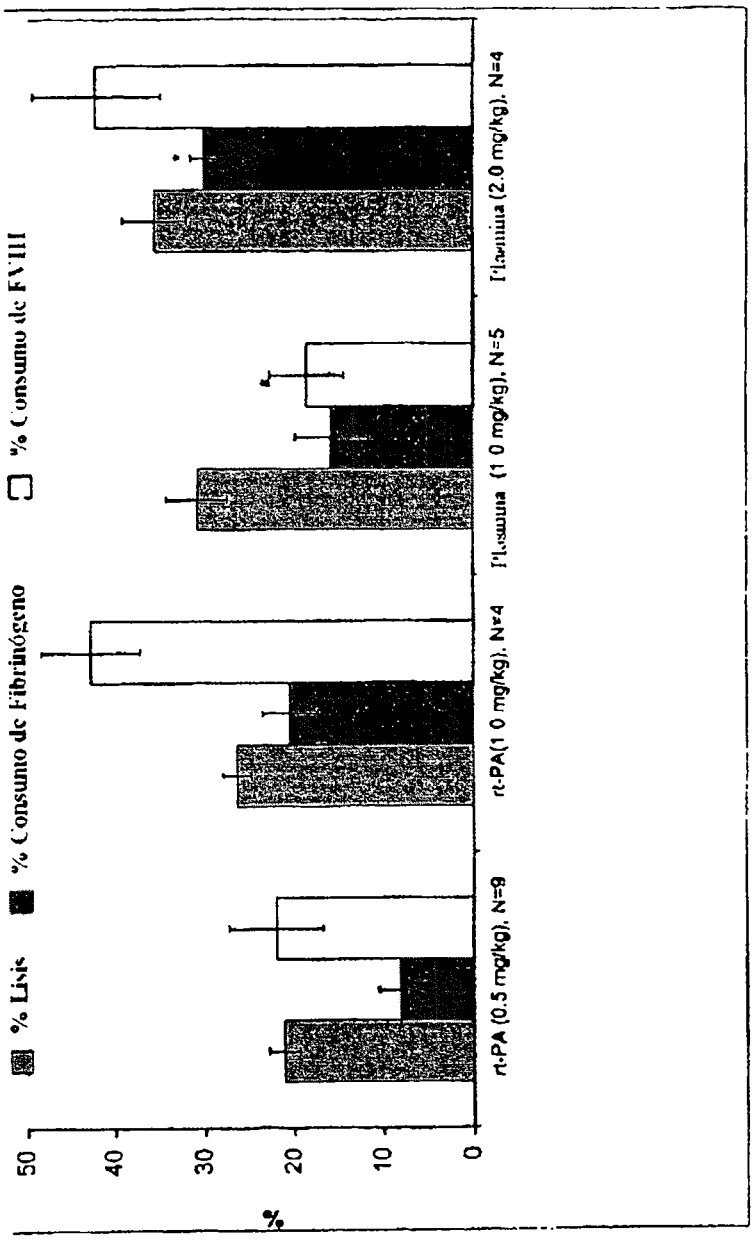

Solución Salina, N = 5
rt-PA (0.5 mg/kg), N=9
rt-PA (1.0 mg/kg), N=4
Plasmina (1.0 mg/kg), N=4
Plasmina (2.0 mg/kg), N=4
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Tiempo (min)

Fig 10


% Reducción del Peso del Coágulo
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Control
Miniplasmina
Plasmina


% Lisis
% Consumo de Fibrinógeno
% Consumo de FVIII
%
50
40
30
20
10
0
rt-PA (0.5 mg/kg), N=9
rt-PA(1.0 mg/kg), N=4
Plasmina (1.0 mg/kg), N=5
Plasmina (2.0 mg/kg), N=4

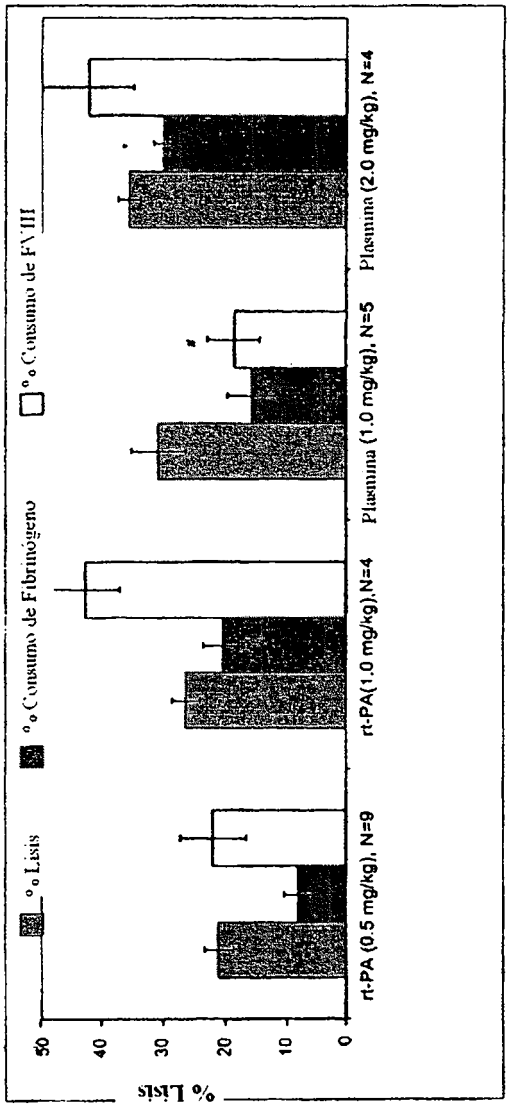
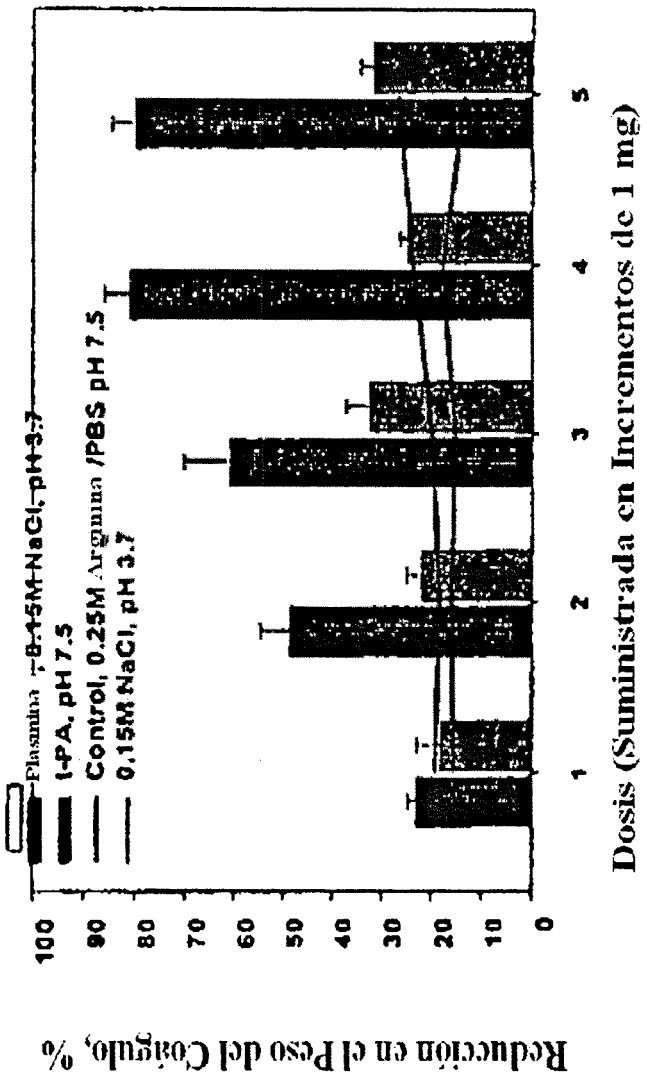

% Lisis
50
40
30
20
10
0
% Lisis
% Consumo de Fibrinogeno
% Consumo de FVIII
rt-PA (0.5 mg/kg), N=9
rt-PA(1.0 mg/kg),N=4
Plasmina (1.0 mg/kg), N=5
Plasmina (2.0 mg/kg), N=4

Fig. 12

Fig. 13


Reducción en el Peso del Coágulo, %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
Dosis (Suministrada en Incrementos de 1 mg)
Plasmina + 0.15M NaCl, pH 3.7
I-PA, pH 7.5
Control, 0.25M Arginina /PBS pH 7.5
0.15M NaCl, pH 3.7

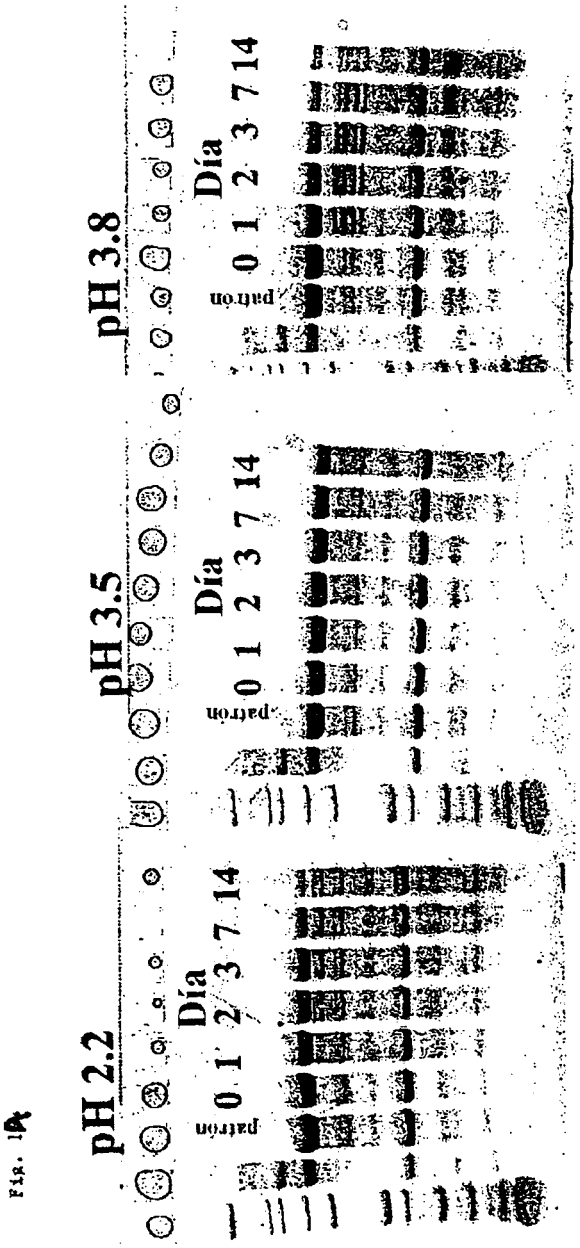
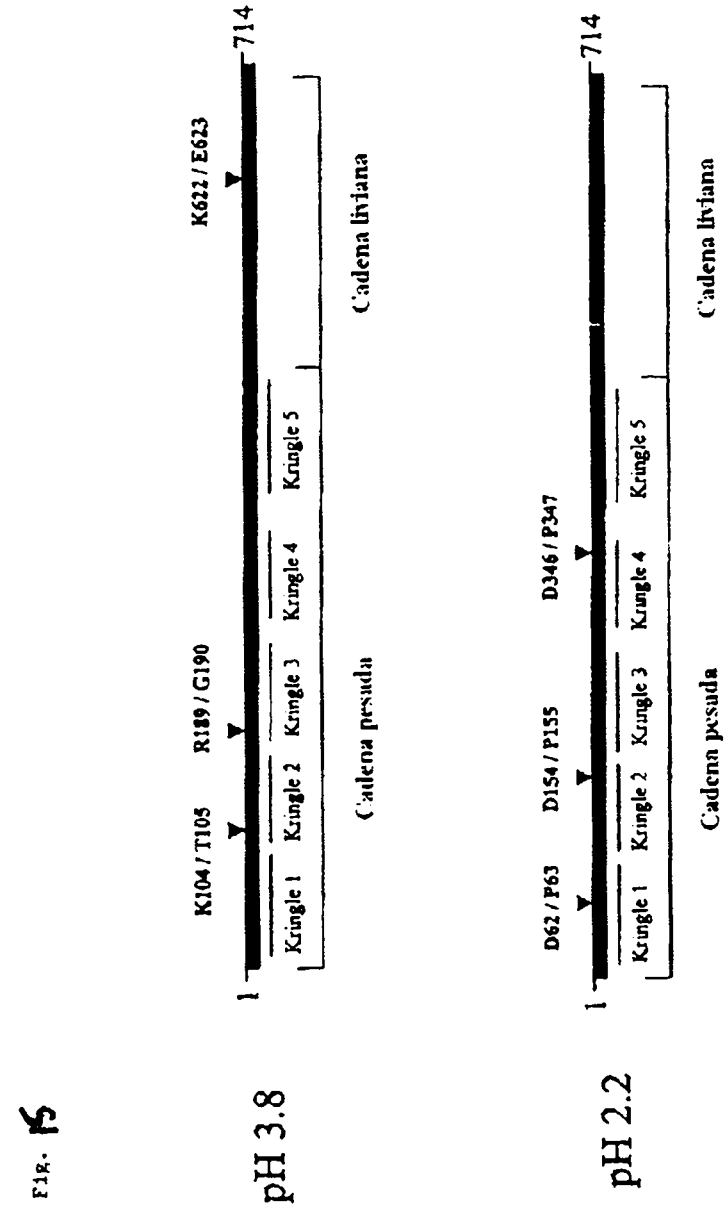


FIG. 1A

Fig. 15


pH 3.8
K104 / T105
R189 / G190
K622 / E623
1
714
Kringle 1
Kringle 2
Kringle 3
Kringle 4
Kringle 5
Cadena pesada
Cadena liviana
pH 2.2
D62 / P63
D154 / P155
D346 / P347
1
714
Kringle 1
Kringle 2
Kringle 3
Kringle 4
Kringle 5
Cadena pesada
Cadena liviana

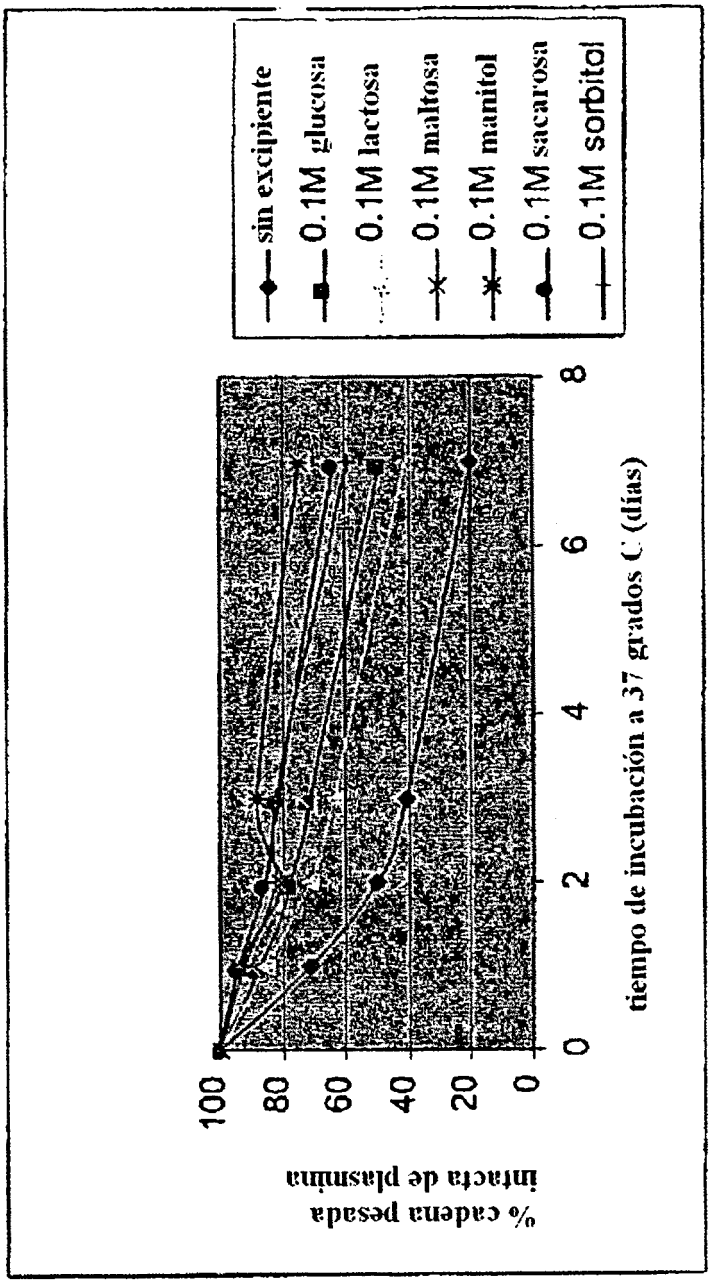

% cadena pesada intacta de plasmina
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
tiempo de incubación a 37 grados C (días)
sin excipiente
0.1M glucosa
0.1M lactosa
0.1M maltosa
0.1M manitol
0.1M sacarosa
0.1M sorbitol

Fig. 1b

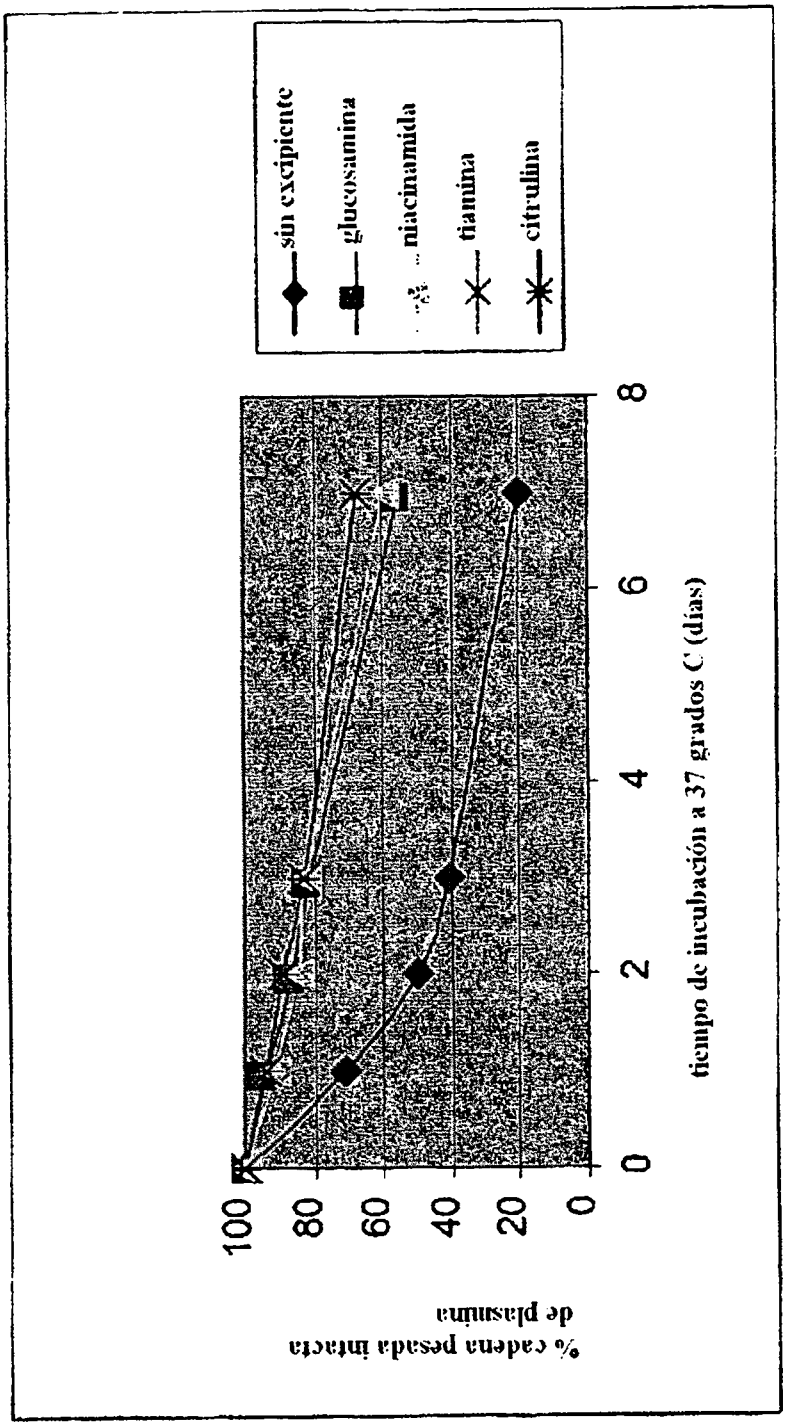

% cadena pesada intacta de plasmina
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
tiempo de incubación a 37 grados C (días)
sin excipiente
glucosamina
niacinamida
tiamina
citrulina

Fig. 17

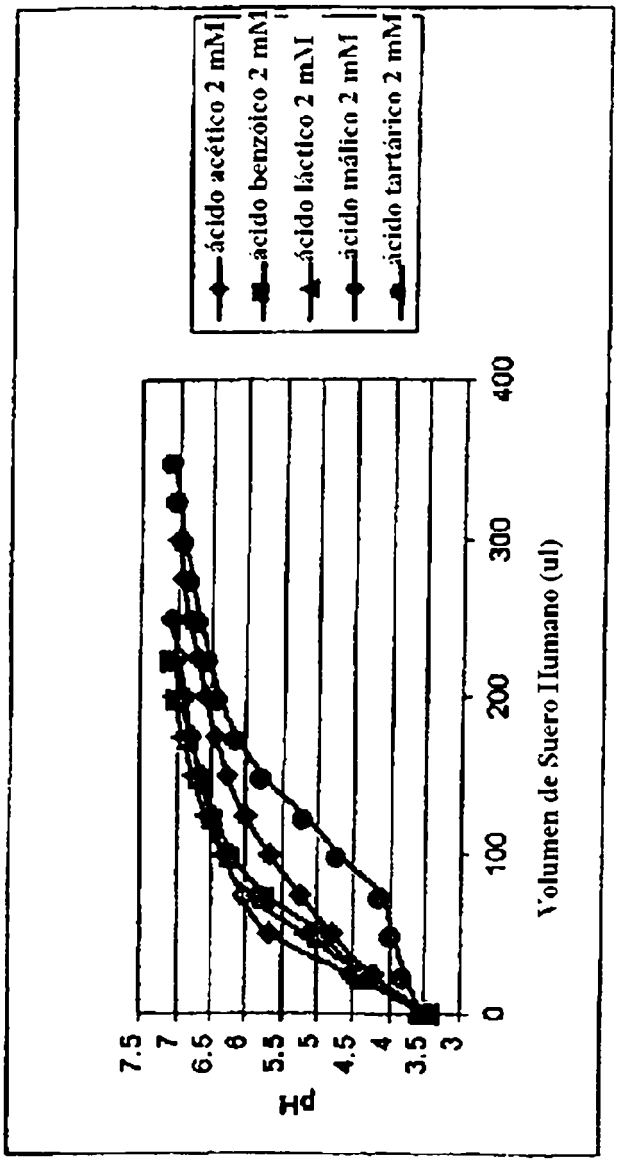

ácido acético 2 mM
ácido benzóico 2 mM
ácido láctico 2 mM
ácido málico 2 mM
ácido tartárico 2 mM
pH
7.5
7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
3.5
3
0
100
200
300
400
Volumen de Suero Humano (ul)

FIG. 6