

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 224**

51 Int. Cl.:
A61K 38/49 (2006.01)
C12N 9/72 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08012976 .0**
96 Fecha de presentación: **31.10.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1997510**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Factores activadores de plasminógeno no neurotóxicos para el tratamiento terapéutico de la apoplejía**

30 Prioridad:
02.11.2001 DE 10153601
17.12.2001 EP 01130006

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2012

73 Titular/es:
H. Lundbeck A/S
Ottiliavej 9
2500 Valby, DK

72 Inventor/es:
Söhngen, Mariola;
Söhngen, Wolfgang;
Schleuning, Wolf-Dieter y
Medcalf, Robert

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 382 224 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Factores activadores del plasminógeno no neurotóxicos para el tratamiento terapéutico de la apoplejía.

La invención se refiere al uso terapéutico de activadores del plasminógeno no neurotóxicos, en particular procedentes de la saliva de *Desmodus rotundus* (DSPA) para el tratamiento de la apoplejía.

5 "Apoplejía" es un término colectivo para diversos síndromes que tienen síntomas clínicos similares. Se puede hacer una diferenciación inicial de estos síndromes en las denominadas lesiones isquémicas y lesiones hemorrágicas, basándose en la patogénesis particular.

10 Las lesiones isquémicas (isquemia) implican una reducción o interrupción de la circulación sanguínea en el cerebro como resultado de un riego sanguíneo arterial inadecuado. Esto está provocado frecuentemente por una trombosis de un vaso con estenosis arterioesclerótica, pero también por embolias arterio-arteriales o cardíacas.

Por otra parte, las lesiones hemorrágicas se atribuyen, entre otras causas, a una perforación de las arterias que irrigan el cerebro, dañadas por la hipertensión arterial. Sin embargo, solamente alrededor del 20% de todas las lesiones cerebrales están provocadas por esta forma de hemorragia, de manera que las apoplejías provocadas por trombosis son con mucho las más importantes.

15 La isquemia del tejido neuronal va acompañada en particular por la necrosis de las células afectadas, en comparación con las isquemias de otros tejidos. La incidencia incrementada de la necrosis se puede explicar de acuerdo con la comprensión reciente del fenómeno de la denominada excitotoxicidad, que es una cascada compleja de un gran número de etapas de reacción. Esta se desencadena, por tanto, por las neuronas isquémicas que están sufriendo la deficiente de oxígeno y que pierden rápidamente ATP y se despolarizan. Esto conduce a una liberación postsináptica incrementada del neurotransmisor glutamato, el cual a su vez activa los receptores de glutamato asociados a la membrana, que regulan los canales de cationes. Como consecuencia de la secreción incrementada de glutamato, no obstante, los receptores de glutamato están hiperactivados.

20 Los receptores de glutamato a su vez regulan los canales de cationes dependientes del potencial, que se abren cuando el glutamato se une a su receptor. Por lo tanto, comienza la entrada de Na^+ y Ca^{2+} a la célula, lo que conduce a una gran alteración del metabolismo celular dependiente de Ca^{2+} , lo que incluye el metabolismo energético. En este contexto, la activación de las enzimas catabólicas dependientes de Ca^{2+} en particular podría ser responsable de la muerte celular que se da posteriormente (Lee, Jin-Mo y col., "The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms"; Dennis W. Zhol "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system").

30 Aunque el mecanismo de la neurotoxicidad mediada por glutamato no se comprende todavía con detalle, parece, sin embargo, haber unanimidad en que este fenómeno contribuye en un grado considerable a la muerte de las células neuronales tras una isquemia cerebral (Jin-Mo Lee y col.).

35 Junto con la protección de las funciones vitales y la estabilización de los parámetros fisiológicos, los esfuerzos para reabrir el vaso ocluido son de gran importancia en la terapia de la isquemia cerebral aguda. Se intenta lograr este objetivo mediante diversas aproximaciones. La reapertura puramente mecánica todavía no ha alcanzado resultados satisfactorios, tal como, por ejemplo, la PTCA tras un infarto de miocardio. Hasta ahora solamente ha sido posible demostrar una mejora adecuada del estado del paciente con una fibrinólisis eficaz. Esta se puede llevar a cabo mediante la aplicación local por medio de un catéter (PROCAT, un estudio con pro-uroquinasa), pero a pesar de los resultados positivos iniciales, este método todavía no ha conducido a la aprobación de una sustantiva farmacéutica.

40 La fibrinólisis endógena se basa en la actividad proteolítica de la serin-proteasa plasmina, que se origina a partir del precursor inactivo plasminógeno mediante catálisis (activación). La activación natural del plasminógeno es llevada a cabo por los activadores endógenos del plasminógeno u-PA (activador del plasminógeno de tipo uroquinasa) y t-PA (*activador del plasminógeno tisular*). Este último forma, en contraste con u-PA, el denominado complejo activador junto con la fibrina y el plasminógeno. La actividad catalítica del t-PA es, por lo tanto, dependiente de la fibrina y experimenta un incremento de aproximadamente 550 veces en presencia de fibrina. Junto con la fibrina, el fibrinógeno puede estimular también la catálisis mediada por t-PA de la plasmina a plasminógeno, aunque en un grado mucho menor. La actividad de t-PA experimenta así solamente un incremento de 25 veces, en presencia de fibrinógeno. Los productos de escisión de la fibrina (*productos de degradación de la fibrina* (FDP)), a su vez, estimulan de manera similar la actividad de t-PA.

50 Las aproximaciones anteriores al tratamiento trombolítico de la apoplejía aguda se remontan a la década de 1950. Sin embargo, los primeros estudios clínicos exhaustivos con estreptoquinasa, un agente fibrinolítico procedente de estreptococos beta-hemolíticos, se llevaron a cabo a partir del año 1995. La estreptoquinasa forma un complejo con el plasminógeno que es capaz de convertir otras moléculas de plasminógeno en plasmina.

55 Sin embargo, la terapia con estreptoquinasa está asociada a desventajas considerables, ya que como proteasa bacteriana, la estreptoquinasa puede desencadenar reacciones alérgicas en el organismo. También puede existir la denominada resistencia a estreptoquinasa en caso de una infección previa por estreptococos, con la formación

correspondiente de anticuerpos, lo que dificulta la terapia. Los estudios clínicos en Europa (*Multicenter Acute Stroke Trial of Europe* (MAST-E), *Multicenter Acute Stroke Trial of Italy* (MAST-I)) y Australia (*Australian Streptokinase Trial* (AST)) indicaron además un riesgo tan incrementado de mortalidad y el riesgo considerable de hemorragia intracerebral (*hemorragia intracerebral*, HIC) tras el tratamiento de los pacientes con estreptoquinasa, que estos estudios se tuvieron que suspender prematuramente.

En una aproximación terapéutica alternativa, se administra uroquinasa, de forma similar a un fibrinolítico "convencional", y ésta no tiene propiedades antigénicas, en contraste con la estreptoquinasa, ya que es una enzima endógena que se da en numerosos tejidos. Es un activador independiente de cofactores del plasminógeno. La uroquinasa se produce en cultivos de células renales.

Existe una experiencia extensa en el campo de la trombolisis terapéutica con un activador del plasminógeno de tipo tisular, denominado rt-PA (véase el documento EP 0 093 619, memoria descriptiva de la patente de EE.UU. 4.766.075), que se produce en células recombinantes de hámster. En la década de 1990 se llevó a cabo una serie de estudios clínicos en todo el mundo con t-PA, además de la indicación principal de infarto agudo de miocardio, con resultados que en algunos casos todavía no se comprenden y son contradictorios. Así, en el denominado *European Acute Stroke Trial* (ECASS) los pacientes se trataron primero de manera intravenosa con rt-PA en un periodo de seis horas tras el inicio de los síntomas de apoplejía, y se investigó la tasa de mortalidad y el índice de Barthel, como medida de la incapacidad o la capacidad de vida independiente del paciente, después de 90 días. En este caso los resultados fueron la ausencia de una mejora significativa de la capacidad de vida, y sin duda alguna un incremento de la mortalidad, aunque no significativa. Esto llevó a la conclusión de que podría ser posiblemente ventajoso el tratamiento trombolítico de pacientes seleccionados individualmente de una manera específica, según el historial del caso particular, con rt-PA inmediatamente después del inicio de la apoplejía. Basándose en el riesgo incrementado de hemorragia intracerebral (HIC) observada después de solo unas horas tras el inicio de la apoplejía, no se recomendó sin embargo el uso general de rt-PA en el periodo investigado de seis horas tras el inicio de la apoplejía (véase, C. Lewandowski C y Wiliam Barsan, 2001: *Treatment of Acute Stroke*; en: *Annals of Emergency Medicine* 37:2; pág. 202 y sigs.).

El tratamiento trombolítico de la apoplejía, de manera similar, fue objeto más tarde de un estudio clínico del *National Institute of Neurologic Disorder and Stroke* (denominado *NINDS rtPA Stroke Trial*) en los EE.UU. En este contexto, sin embargo, la investigación del efecto de un tratamiento con rt-PA intravenoso en un periodo de tiempo de solamente tres horas tras el inicio de los síntomas, sobre el estado de salud de los pacientes después de tres meses, fue de gran importancia. Aunque en este caso los autores también descubrieron un riesgo incrementado de HIC, el tratamiento con rt-PA en este periodo de tiempo limitado de tres horas se recomienda, no obstante, basándose en los efectos positivos de este tratamiento sobre la viabilidad del paciente, igualmente reconocido por el estudio.

En dos estudios adicionales (Ensayo ECASS II; *Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke* (ATLANTIS)) se investigó si esta conclusión positiva del efecto del tratamiento con rt-PA en tres horas tras el inicio de la apoplejía, se podría confirmar también para un tratamiento en un periodo de tiempo de seis horas. Sin embargo, no fue posible responder a esta pregunta de manera afirmativa, ya que además del riesgo incrementado de HIC no se observó ninguna mejora de los síntomas clínicos o una reducción de la mortalidad mediante el tratamiento en este periodo de tiempo.

Estos resultados a veces contradictorios han conducido a una gran cautela en el uso de rt-PA. Así, ya se confirmó en 1996 en una publicación de la *American Heart Association*, que predominaba un escepticismo pronunciado entre los médicos con respecto al tratamiento trombolítico de la apoplejía, que no fue el caso con respecto a la terapia del infarto de miocardio con agentes fibrinolíticos (van Gijn J, MD, FRCP, 1996 - *Circulation* 1996, 93: 1616-1617).

Los argumentos para el escepticismo se hallan en una revisión de todos los "Ensayos de Apoplejía" publicada por primera vez en 1997 y actualizada en marzo de 2001. Según esto, todos los tratamientos trombolíticos (uroquinasa, estreptoquinasa, rt-PA o uroquinasa recombinante) condujeron a una mortalidad significativamente incrementada, debida en particular a HIC, en los primeros diez días tras la apoplejía, mientras que en el caso de un tratamiento en el periodo de 6 horas, se redujo el número total de pacientes muertos o incapacitados. Por lo tanto, se desaconseja el uso generalizado de agentes trombolíticos para el tratamiento de la apoplejía.

Estos resultados ya habían impulsado de antemano a otros autores a la conclusión sarcástica de que los pacientes de apoplejía podrían elegir entre morir o sobrevivir con incapacidad (SCRIP 1997: 2265,26).

La terapia con rt-PA, no obstante, es actualmente el único método de tratamiento para la isquemia cerebral aguda aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en los EE.UU. Esto, sin embargo, se limita a la administración de rt-PA en tres horas tras el inicio de la apoplejía.

rt-PA se aprobó en 1996. Justamente antes, concretamente en 1995, se conocieron las primeras indicaciones de los efectos secundarios dañinos de t-PA, lo cual proporciona una explicación propuesta para los efectos drásticos de rt-PA en el tratamiento de la apoplejía, fuera del periodo de tratamiento de 3 horas. Según esta explicación, las células microgliales y las células neuronales del hipocampo producen t-PA endógeno, que está implicado en la

excitotoxicidad mediada por el glutamato. Esta conclusión surgió de una comparación de ratones deficientes de t-PA y de ratones de tipo natural, cada uno de los cuales recibió una inyección de agonistas de glutamato en el hipocampo. Los ratones deficientes de t-PA mostraron aquí una resistencia significativamente incrementada al glutamato administrado externamente (de manera intratecal) (Tsirka SE y col. *Nature*, vol. 377,1995, "Exzitoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator"). Estos resultados se confirmaron en 1998, cuando Wang y col. fueron capaces de demostrar prácticamente una duplicación del tejido neuronal necrótico en ratones deficientes de t-PA, mediante la inyección intravenosa de t-PA. En contraste, este efecto negativo del t-PA externo era solamente alrededor del 33% en los ratones de tipo natural (Wang y col., 1998, *Nature*, "Tissue plasminogen activator (t-PA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia, in wild type and t-PA deficient mice").

Nicole y col. publicaron resultados posteriores sobre la estimulación de la excitotoxicidad mediante t-PA al comienzo de 2001 (Nicole O; Docagne F Ali C; Margail I; Carmeliet P; MacKenzie ET; Vivien D y Buisson A, 2001: The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling; en: *Nat Med* 7, 59-64). Fueron capaces de demostrar que el t-PA secretado por las neuronas corticales despolarizadas interacciona con la subunidad denominada NR1 del receptor de glutamato de tipo NMDA y la escinde. Esta modificación conduce a un incremento de la actividad del receptor, que a su vez es responsable de un daño tisular incrementado tras la administración del agonista de glutamato NMDA, debido a una excitotoxicidad inducida. Así, t-PA tiene una acción neurotóxica por la activación del receptor de glutamato de tipo NMDA.

Según una explicación adicional propuesta, la neurotoxicidad de t-PA se debe atribuir indirectamente a la activación de la plasmina a partir del plasminógeno. Según este modelo, el efector real de la neurotoxicidad es, por lo tanto, la plasmina (Chen ZL y Strickland S, 1997: Neuronal Death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalysed degradation of laminin. *Cell*: 91, 917-925).

Se muestra una presentación resumida de los efectos neurotóxicos dependientes del tiempo de t-PA en la Fig. 9. En ésta, se hace evidente la toxicidad incrementada del t-PA recombinante en comparación con el t-PA endógeno, y esto presumiblemente es atribuible al hecho de que el rt-PA entra en el tejido en concentraciones más elevadas.

El hecho de que, a pesar de estas indicaciones de los efectos secundarios neurotóxicos de t-PA y a pesar del incremento demostrado de la mortalidad debida a t-PA, la aprobación según la legislación de preparaciones medicas fue concedida, no obstante, por la FDA, se puede explicar sin duda solamente por la carencia de alternativas seguras y eficaces, y por un análisis coste/beneficio muy pragmático. Sin embargo, todavía existe la demanda de terapias más seguras, y es necesario para el desarrollo de agentes trombolíticos nuevos, si no debe renunciarse completamente a la trombolisis, tomar en consideración el problema de la neurotoxicidad (así, p. ej., Wang y col. loc. cit.; Lewandowski y Barsan 2001 loc. cit.).

Por esta razón, no se han llevado a cabo investigaciones adicionales sobre agentes trombolíticos conocidos, que incluyen DSPA (activador del plasminógeno de *Desmodus rotundus*) para el desarrollo de un agente terapéutico nuevo para la apoplejía, aunque en principio podrían ser adecuados todos los agentes trombolíticos, y, por ejemplo en el caso de DSPA, ya se ha apuntado su posible idoneidad para este campo de indicación en una primera publicación (Medan P; Tatlisumak T; Takano K.; Carano RAD; Hadley SJ; Fisher M: Thrombolysis with recombinant Desmodus saliva plasminogen activator (rDSPA) in a rat embolic stroke model; en: *Cerebrovasc Dis* 1996;6: 175-194 (4th International Symposium on Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke)). DSPA es precisamente, sin embargo, un activador del plasminógeno con una homología elevada (similitud) respecto de t-PA, de forma que, al mismo tiempo que la desilusión por los efectos secundarios neurotóxicos de t-PA, tampoco se han puesto más esperanzas en DSPA.

Más bien, en la estrategia que se ha seguido recientemente, entre otras, para mejorar el tratamiento trombolítico previo de la apoplejía con los agentes trombolíticos conocidos, las sustancias ya no se administran de forma intravenosa sino que se llevan directamente al trombo intravascular de manera intraarterial por medio de un catéter. Las primeras experiencias de esto están disponibles con uroquinasa producida por medios recombinantes. La dosis necesaria para la trombolisis, por tanto, probablemente se puede disminuir, y por lo tanto se pueden reducir algunos de los efectos secundarios. Sin embargo, esta forma de administración requiere unos costes técnicos elevados y por lo tanto no está disponible en todas partes, y además requiere cierto tiempo para la preparación minuciosa del paciente, que no siempre está disponible y representa un riesgo adicional.

Los esfuerzos actuales se dirigen además a los anticoagulantes, tales como heparina, aspirina o ancrod, la sustancia activa del veneno de la víbora malaya. Sin embargo, dos estudios clínicos dirigidos, entre otros, también a la investigación de las acciones de la heparina (*International Stroke Trial* (IST) y *Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST)) no indican una mejora significativa de la mortalidad y una prevención de una nueva apoplejía.

Un método de tratamiento nuevo adicional no se dirige ni al trombo ni a la licuefacción de la sangre o a la anticoagulación, sino que intenta incrementar la vitalidad de las células dañadas por la interrupción del riego sanguíneo (documentos WO 01/51613 A1 y WO 01/51614 A1). Se administran para esto antibióticos del grupo de las quinonas, aminoglicósidos o cloranfenicol, Por una razón similar, se propone también comenzar la administración de citicolina, que se escinde en citidina y colina en el organismo, inmediatamente después de la apoplejía. Estos

productos de escisión son constituyentes de la membrana de las células neuronales y pueden ayudar así en la regeneración del tejido dañado (memoria descriptiva de la patente de EE.UU. 5 827 832).

Los esfuerzos recientes en la búsqueda de métodos de tratamiento más seguros, se basan en el conocimiento nuevo de que algunas de las consecuencias mortales de la apoplejía se deben atribuir solamente de manera indirecta al riego sanguíneo interrumpido, pero de manera directa a la excitotoxicidad o neurotoxicidad con la implicación del receptor de glutamato sobreestimulado, que a su vez también se intensifica en particular por t-PA (véase anteriormente). Una aproximación para reducir esta excitotoxicidad es, por lo tanto, la administración de los denominados agentes neuroprotectores. Estos se pueden usar solos o en combinación con agentes fibrinolíticos para minimizar así su efecto neurotóxico. En este contexto, pueden conducir a una atenuación de la excitotoxicidad directamente, por ejemplo como antagonistas de los receptores de glutamato, o indirectamente por medio del bloqueo de los canales de sodio o calcio dependientes del voltaje (Jin-Mo Lee y col. loc. cit.).

Una inhibición competitiva (antagonismo) del receptor de glutamato de tipo NMDA, es posible en este contexto, por ejemplo, con 2-amino-5-fosfonovalerato (APV) o 2-amino-5-fosfonoheptanoato (APH). Se puede realizar una inhibición no competitiva, por ejemplo, mediante sustancias que se unen al lado de fenciclidina de los canales, tales como fenciclidina, MK-801, dextrorfano o ketamina.

Sin embargo, los tratamientos hasta ahora con neuroprotectores no han producido todavía el éxito deseado, posiblemente porque se tendrían que combinar con agentes trombolíticos para exhibir su acción protectora. Esto también es aplicable en el mismo grado a otros compuestos activos (véase la Fig. 10).

Incluso con una combinación de t-PA y un agente neuroprotector, es posible no obstante, en el mejor de los casos solamente el éxito en el sentido de una limitación del daño. Por tanto, las desventajas de la neurotoxicidad del agente fibrinolítico usado no se evitan.

La presente invención se basa por lo tanto en el objetivo de proporcionar una aproximación terapéutica nueva para el tratamiento de la apoplejía en humanos.

Este objetivo se realiza mediante el uso de DSPA alfa 1 según la reivindicación principal, para el tratamiento terapéutico de la apoplejía. Los usos ventajosos adicionales son en cada caso la materia de las reivindicaciones dependientes adicionales.

El uso según la invención de este activador del plasminógeno se basa en el conocimiento de que la neurotoxicidad del activador del plasminógeno tisular (t-PA) se debe atribuir al hecho de que debido a la destrucción de tejido en el cerebro provocada por la apoplejía, se daña o se destruye la barrera hematoencefalica y el fibrinógeno que circula en la sangre puede penetrar, por tanto, en el tejido neuronal del cerebro. El fibrinógeno activa el t-PA allí, el cual, indirectamente por la activación del receptor de glutamato o mediante la activación del plasminógeno, conduce a un daño tisular adicional. Según la invención, para evitar este efecto se emplea ahora un activador del plasminógeno que muestra una selectividad incrementada por la fibrina y, a la inversa, una capacidad reducida para ser activado por el fibrinógeno. De esto se deduce que cuando el fibrinógeno de la sangre cruza hacia el tejido neuronal como consecuencia de una barrera hematoencefalica dañada, el activador del plasminógeno según la invención no se activa, o se activa hasta un grado significativamente reducido en comparación con t-PA, ya que su activador, la fibrina, no puede entrar en el tejido neuronal debido a su tamaño. Los activadores del plasminógeno según la invención no son, por tanto, neurotóxicos.

Se muestra también un incremento elevado de la actividad en presencia de fibrina, concretamente un incremento de 100.000 veces, por el activador del plasminógeno DSPA procedente de la saliva del murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*). DSPA es un término colectivo para cuatro proteasas diferentes que satisfacen una necesidad fundamental del murciélago vampiro, concretamente la duración prolongada de la hemorragia de las heridas de la presa, provocadas por estos animales (Cartwright, 1974). Estas cuatro proteasas (DSPA α_1 , DSPA α_2 , DSPA β , DSPA γ) tienen unánimemente una elevada similitud (homología) respecto del t-PA humano. Asimismo, tienen actividades fisiológicas similares o coincidentes, lo que justifica agruparlas mediante el término genérico DSPA. DSPA es la materia del documento EP 0 352 119 A1 y de las patentes de EE.UU. 6 008 019 y 5 830 849 a las que se hace referencia en su totalidad para fines divulgativos.

DSPA α_1 es la proteasa de este grupo que se ha investigado mejor hasta ahora. Tiene una homología en su secuencia de aminoácidos de más del 72%, en comparación con la secuencia de aminoácidos del t-PA humano conocido (Krätzschar y col., 1991). Sin embargo, existen dos diferencias esenciales entre t-PA y DSPA. En primer lugar, DSPA en forma de una cadena simple, representa concretamente una molécula completamente activa con respecto a los sustratos peptídicos, que no se convierte, como el t-PA, en una forma de cadena doble (Gardell y col., 1989; Krätzschar y col., 1991). En segundo lugar, la actividad catalítica de DSPA muestra una dependencia de la fibrina prácticamente absoluta (Gardell y col., 1989; Bringmann y col., 1995; Toschi y col., 1998). Así, por ejemplo, la actividad de DSPA α_1 se incrementa 100.000 veces en presencia de fibrina, mientras que la actividad de t-PA se incrementa solamente alrededor de 550 veces. Por otra parte, la actividad de DSPA se induce de manera considerablemente menos intensamente por el fibrinógeno; experimenta solamente un incremento de 7 a 9 veces (Bringmann y col., 1995). Así, DSPA es considerablemente más dependiente de la fibrina y más específica por la

fibrina que el t-PA de tipo natural, que se activa solamente aproximadamente 550 veces con la fibrina.

Basándose en sus propiedades fibrinolíticas y la gran similitud respecto de t-PA, DSPA es de hecho un candidato interesante para el desarrollo de un agente trombolítico. Sin embargo, en el pasado, el desarrollo de DSPA como agente trombolítico se limitó al tratamiento del infarto de miocardio, ya que, debido a la implicación del t-PA en la neurotoxicidad dependiente del glutamato, no existía una esperanza justificada sobre el empleo con éxito de un activador del plasminógeno relacionado con el t-PA para el tratamiento de la apoplejía aguda.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que, a pesar de la gran similitud (homología) respecto de t-PA y a pesar de la coincidencia sustancial de su acción fisiológica con t-PA, al contrario de éste, DSPA no tiene acción neurotóxica. Este hallazgo va acompañado directamente por el conocimiento de que, de hecho, se puede usar DSPA como un agente trombolítico para la terapia de la apoplejía sin que haya asociado a esto un riesgo adicional de lesión del tejido neuronal. Esto significa en particular que también se puede emplear DSPA después de tres horas tras el inicio de los síntomas de la apoplejía.

Una enseñanza adicional de la presente invención es la posibilidad que resulta del conocimiento ya descrito, de modificar o preparar también otros activadores del plasminógeno, de forma que tengan esta propiedad del DSPA o que no tengan la neurotoxicidad del t-PA. La base de esto es la relación conocida de acciones que permitirán en el futuro la conversión de activadores del plasminógeno neurotóxicos en activadores del plasminógeno no neurotóxicos, o la preparación de activadores del plasminógeno no neurotóxicos basándose en los activadores del plasminógeno neurotóxicos conocidos o recién descubiertos.

La nueva enseñanza se basa en estudios comparativos *in vivo* de la acción neurodegenerativa del t-PA por una parte, y DSPA por la otra, que se llevaron a cabo con la ayuda del denominado "modelo de ácido kaínico" y un modelo para la investigación de la lesión inducida por NMDA del cuerpo estriado.

El modelo de ácido kaínico (también modelo de lesión por ácido kaínico) se basa en el hecho de que la cascada de glutamato neurotóxico se estimula mediante la administración de ácido kaínico externo (AK) como agonista del receptor de glutamato de tipo ácido kaínico (tipo AK) y de los receptores de glutamato de tipo NMDA y AMPA. Mediante el uso de una cepa de ratón deficiente de t-PA como modelo del estudio, fue posible demostrar por tanto que la sensibilidad de los animales del ensayo hacia el ácido kaínico alcanzaba el nivel del ratón de tipo natural solamente con la administración adicional de t-PAs externos. Por otra parte, la infusión de una concentración equimolar de DSPA en las mismas condiciones experimentales, no restableció la sensibilidad hacia el ácido kaínico (AK). La acción del t-PA, por lo tanto, no se pudo sustituir por DSPA. Un resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Grupo de tratamiento	Número de animales	Longitud de hipocampo intacta (mm)		Porcentaje restante
		Media del lado contralateral (EEM)	Media del lado ipsilateral (EEM)	
Infusión de t-PA (1,85 μ M) + AK	12	15,99 (0,208)	3,63 (0,458)	22,7*
Infusión de DSPA (1,85 μ M) + AK	11	16,07 (0,124)	13,8 (0,579)	85,87
Infusión de t-PA (1,85 μ M) + PBS	3	16,75 (0,381)	17,08 (0,363)	101,97
Infusión de DSPA (1,85 μ M) + PBS	3	15,75 (0,629)	15,83 (0,363)	100,50
Infusión de t-PA (0,185 μ M) + AK	3	15,60 (0,702)	5,07 (1,09)	32,5
Infusión de DSPA (18,5 μ M) + AK	3	16,06 (0,176)	13,80 (1,22)	85,93

* P < 0,0001

5 Las investigaciones cuantitativas mediante el uso de este modelo han demostrado que incluso un incremento de 10 veces de la concentración de DSPA no restableció la sensibilidad de los ratones deficientes de t-PA hacia el tratamiento con AK, mientras una concentración de t-PA 10 veces menor ya provocó una lesión tisular inducida por AK. De esto se deduce que DSPA tiene al menos una actividad 100 veces menor que t-PA en la promoción de la neurodegeneración tras el tratamiento con AK (véanse también las Figuras 11 y 12).

10 En el segundo modelo de neurodegeneración, se compararon los posibles efectos de t-PA y de DSPA sobre la promoción de la neurodegeneración dependiente de NMDA en ratones de tipo natural. Para esto, se inyectó NMDA a ratones de tipo natural (como agonista del receptor de glutamato de tipo NMDA) solo o en combinación con t-PA o DSPA. Este modelo permite que se investigue la acción de estas proteasas en condiciones en las que la neurodegeneración se da en cualquier caso y provoca una entrada de proteínas plasmáticas debido al colapso de la barrera hematoencefálica (Chen y col., 1999).

15 En el trabajo con este modelo, la inyección de NMDA condujo a lesiones reproducibles en el cuerpo estriado de los ratones. El volumen de estas lesiones se incrementó al menos un 50% mediante una inyección conjunta de t-PA y NMDA. Por otra parte, la coinyección con DSPA α 1 no condujo a un incremento del tamaño de las lesiones provocadas por la inyección de NMDA. Incluso en presencia de proteínas plasmáticas que pudieron difundir hacia el área de la lesión, como resultado de la neurodegeneración dependiente de NMDA, el DSPA no condujo a un incremento de la neurodegeneración (véase también la Tabla 3).

Tabla 3

Grupo de tratamiento	Número de ratones de tipo natural	Volumen medio de la lesión (mm ²) (EEM)
NMDA solo	8	1,85 (0,247)
NMDA + t-PA	8	3,987 (0,293)*
NMDA + DSPA	8	1,656 (0,094)**
t-PA solo	3	0,20 (0,011)
DSPA solo	3	0,185 (0,016)

* P < 0,0001

** No significativo

20 Estos resultados demuestran que DSPA es una proteasa esencialmente inerte en el sistema nervioso central de un mamífero, es decir, también en los seres humanos, y, en contraste con t-PA, no provoca ningún incremento de la neurotoxicidad inducida por AK o NMDA. Esta ausencia de neurotoxicidad hace que DSPA, en contra de todos los pronósticos, sea un agente trombolítico adecuado para el tratamiento de la apoplejía aguda.

25 Los primeros resultados de los estudios clínicos demuestran que estos resultados se pueden aplicar también al tratamiento de la apoplejía en seres humanos. Así, se deben hallar mejoras significativas en pacientes tras una perfusión eficaz (mejora de 8 puntos NIHSS o índice NIHSS de 0-1). Esto se aclara en la Tabla 1.

Tabla 1

Paciente	Valor inicial	NIHSS Post tmt	Día 7	Día 30	Día 90	sAEs
1001	12	7	4	4	*	reinfarto
1002	8	9	2	0	0	
1003	8	10	12	10	*	
1004	8	4	2	0	0	
1005	11	11	4	5	*	
1006	9	7	1	*	*	

Paciente	NIHSS					sAEs
	Valor inicial	Post tmt	Día 7	Día 30	Día 90	
1007	14	6	*	*	*	
2001	19	20	-	-	-	HIC, muerte
2002	15	21	-	-	-	HIC, muerte
3001	8	7	6	5	*	
3002	15	16	9	8	*	
3003	10	19	21	*	-	muerte, día 39

5 Basándose en la carencia de neurotoxicidad de DSPA y en los otros activadores del plasminógeno no neurotóxicos similares (véase anteriormente), el hecho de que el uso de estos activadores del plasminógeno, en contraste con los de t-PA de tipo natural, no se limite solamente al intervalo de tiempo corto de hasta tres horas tras el inicio de la apoplejía, se presenta como una ventaja particular para el tratamiento de la apoplejía. En su lugar, el tratamiento se puede llevar a cabo también en un momento posterior, es decir también sin reserva, tras seis horas o incluso más tarde, sin que exista el riesgo de promover la excitotoxicidad, como es el caso con t-PA. Las primeras investigaciones clínicas con DSPA demuestran incluso el tratamiento aceptable de pacientes en un periodo de tiempo de más de seis o nueve horas tras el inicio de los síntomas.

10 Esta opción de tratamiento con activadores del plasminógeno no neurotóxicos que no está limitada en el tiempo es tan significativa, precisamente porque hace posible por primera vez un tratamiento, sin reservas, de pacientes de apoplejía aguda en los que no se puede determinar el momento del inicio de la apoplejía con suficiente certeza. Este grupo de pacientes se excluía hasta ahora de la trombolisis con activadores del plasminógeno por precaución y por la estimación del riesgo. Por lo tanto, se elimina una contraindicación considerable del uso aprobado de un agente trombolítico en casos de apoplejía.

15 Tanto DSPA como otros activadores del plasminógeno no neurotóxicos no muestran efectos secundarios neurotóxicos perjudiciales para el tejido. Sin embargo, puede ser conveniente administrarlos en combinación con un agente neuroprotector para el tratamiento de la apoplejía con el fin de limitar las lesiones tisulares inducidas por el glutamato endógeno. Se pueden usar agentes neuroprotectores que inhiben competitiva o no competitivamente los receptores de glutamato. Es posible formar combinaciones útiles, por ejemplo, con los inhibidores conocidos de los receptores de glutamato del tipo NMDA, del tipo ácido kaínico o del tipo quisqualato tales como, por ejemplo, APV, APH, fenilcilidina, MK-801, dextrorfanol o ketamina.

20 Adicionalmente, puede ser conveniente una combinación con cationes, ya que éstos, sobre todo los iones de Zn, bloquean el canal catiónico regulado por el receptor de glutamato y pueden, por tanto, reducir los efectos neurotóxicos.

25 En una realización adicional ventajosa, se pueden combinar activadores del plasminógeno no neurotóxicos con al menos otro agente terapéutico o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Es especialmente ventajosa la combinación con un agente terapéutico que ayuda a evitar los daños tisulares mediante la vitalización de las células, lo que favorece una regeneración del tejido ya dañado o sirve para evitar posteriores apoplejías. Pueden ser ventajosas las combinaciones de, por ejemplo, antibióticos tales como quinonas, anticoagulantes como heparina o hirudina, así como citicolina o aspirina. También puede ser ventajosa una combinación con por lo menos un inhibidor de la trombolisis. Se pueden emplear preferentemente trombomodulina, análogos de trombomodulina tales como solulina, triabina o palidipina. También son ventajosas las combinaciones con sustancias antiinflamatorias que actúan sobre la infiltración de los leucocitos.

35 Investigaciones comparativas con t-PA y DSPA

A. Métodos

1. Animales

Los ratones de tipo natural (c57/Black 6) y los ratones deficientes de t-PA (ratones t-PA^{-/-}) (c57/Black 6) (Carmeliet y

col., 1994) fueron proporcionados por el Dr. Peter Carmeliet, Lovaina, Bélgica.

2. Extracción de proteínas del tejido cerebral

La determinación de la actividad proteolítica en el tejido cerebral tras la infusión de t-PA o DSPA α 1, se llevó a cabo por medio de análisis zimográfico (Granelli-Piperno y Reich, 1974). Tras la infusión a lo largo de 7 días en el hipocampo, los ratones se anestesiaron y después se perfundió PBS de manera transcardíaca y se extrajeron los cerebros. Se extrajo la región del hipocampo, se introdujo en recipientes Eppendorf y se incubó con los mismos volúmenes (p/v) (aproximadamente 30-50 μ l) con tampón de lisis NP-40 al 0,5% sin inhibidores de proteasas (NP-40 al 0,5%, Tris HCl 10 mM a pH 7,4, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 1 mM). Los extractos de cerebro se homogeneizaron por medio de un homogeneizador de vidrio manual y se dejaron en hielo durante 30 min. Las muestras se centrifugaron posteriormente y se extrajo el material sobrenadante. Se determinó la cantidad de proteína presente (reactivo de Bio-Rad).

3. Análisis zimográfico de las proteasas

Se determinó la actividad proteolítica de las muestras o de los extractos del tejido cerebral, mediante análisis zimográfico de acuerdo con el método de Granelli-Piperno y Reich (1974). En este análisis, las muestras de proteína recombinante (hasta 100 nmol) o del extracto de tejido cerebral (20 μ g), se sometieron a una SDS-PAGE del 10% en condiciones no reductoras. Los geles se extrajeron de las placas, se lavaron durante dos horas en Triton X100 al 1% y después se colocaron en un gel de agarosa con fibrinógeno y plasminógeno polimerizado (Granelli-Piperno y Reich, 1974). Los geles se incubaron en una cámara húmeda a 37°C, hasta que fue detectable la zona proteolisada.

4. Infusión intra-hipocampo de t-PA y DSPA e inyección posterior de ácido kaínico

El modelo de lesión por ácido kaínico se basa en el experimento de Tsirka y col. (1995). Se inyectó a los animales de forma intraperitoneal (i.p.) atropina (4 mg/kg) y después se anestesiaron con una inyección i.p. de pentobarbital sódico (70 mg/kg). Después se colocaron en un marco estereotáxico, de forma que se pudo implantar de forma subcutánea una bomba microosmótica (Alzet, modelo 1007D, Alzet CA. EE.UU.) con 100 μ l de PBS o t-PA humano recombinante (0,12 mg/ml; 1,85 μ M) o DSPA α 1 (1,85 μ M) entre los omoplatos. Las bombas se conectaron a una cánula cerebral mediante tubos estériles y se insertaron a través de una apertura en el cráneo en las coordenadas bregma -2,5 mm, mediolateral 0,5 mm y dorsoventral 1,6 mm, para introducir el líquido cerca de la línea media. La cánula se fijó posteriormente en la posición deseada y las bombas se abrieron para infundir las soluciones apropiadas con un caudal de 0,5 μ l por hora, a lo largo de siete días.

Dos días después de la infusión de las proteasas, los ratones se anestesiaron de nuevo y se introdujeron en el marco estereotáxico. Después se inyectó ácido kaínico 1,5 nmol en 0,3 μ l de PBS de forma unilateral en el hipocampo. Las coordenadas fueron: bregma 2,5 mm, mediolateral 1,7 mm y dorsoventral 1,6 mm. La excitotoxina (AK) se introdujo a lo largo de un periodo de 30 seg. Tras el tratamiento con ácido kaínico, la aguja permaneció en estas coordenadas durante otros 2 min para evitar que el líquido retrocediera.

5. Examen del cerebro

Cinco días después de la inyección de AK, los animales se anestesiaron y se perfundieron de manera transcardíaca 30 ml de PBS, seguido de 70 ml de una solución del 4% de paraformaldehído, se fijaron durante 24 horas, seguido de incubación en un 30% de sacarosa durante otras 24 horas. Después se realizaron cortes coronarios (40 μ m) del cerebro en un microtomo congelador y se realizó una tinción de contraste con tionina (BDH, Australia) o se prepararon para el análisis inmunohistoquímico.

6. Cuantificación de la tasa de pérdida neuronal en el hipocampo

La pérdida neuronal en los subcampos del hipocampo CA1-CA3 se cuantificó tal y como se describió previamente (Tsirka y col. 1995; Tsirka y col. 1996). Se prepararon cinco cortes sucesivos del hipocampo dorsal de todos los grupos tratados, y los cortes incluían exactamente el lugar de la inyección de AK y la región de la lesión. Los subcampos del hipocampo (CA1-CA3) de estos cortes se monitorizaron por medio de dibujos mediante cámara lúcida del hipocampo. La longitud total de estos subcampos se midió en comparación con patrones de 1 mm, que se monitorizaron con el mismo aumento. Se determinó la longitud de los cortes de tejido con neuronas piramidales vitales (con una morfología normal) y la longitud de los cortes de tejido sin neuronas (sin células presentes, sin tinción con tionina). Se realizó la media entre los cortes de las longitudes, las neuronas intactas y las pérdidas neuronales en la región de cada subcampo del hipocampo presentada, y se determinó la desviación estándar.

7. Lesiones por excitotoxicidad de NMDA en el cuerpo estriado con o sin t-PA o DSPA

Se anestesiaron ratones de tipo natural (c57/Black 6) y se colocaron en un marco estereotáxico (véase anteriormente). Después se administró a los ratones una inyección unilateral en el cuerpo estriado izquierdo de NMDA 50 nmol solo o en combinación con rt-PA 46 μ M o DSPA α 1 46 μ M. Como testigos, también se inyectaron t-PA y DSPA α 1 solos en una concentración de 46 μ M. Las coordenadas de la inyección fueron: bregma -0,4 mm, mediolateral 2,0 mm y dorsoventral 2,5 mm. Las soluciones (1 μ l de volumen total para todos los tratamientos) se

transfirieron a lo largo de un espacio de tiempo de 5 minutos a 0,2 µl/min, y la aguja permaneció en el lugar de la inyección durante otros 2 min tras la inyección para minimizar el retroceso del líquido. Después de 24 horas, los ratones se anestesiaron y se perfundieron de manera transcárdica 30 ml de PBS, seguido de 70 ml de una solución de para formaldehído al 4%, se fijaron en el mismo fijador durante 24 horas, seguido de incubación en 30% de sacarosa durante otras 24 horas. Después se realizaron cortes coronarios (40 µm) en un microtomo congelador y se colocaron en portaobjetos de vidrio revestidos con gelatina.

8. Cuantificación del volumen de la lesión tras la inyección de NMDA

El volumen de la lesión del cuerpo estriado se cuantificó con la ayuda del método descrito por Callaway y col. (2000). En este procedimiento, se prepararon 10 cortes coronarios sucesivos que incluían el área lesionada. La región lesionada se visualizó con la ayuda del método de Callaway, y el volumen de la lesión se cuantificó mediante el uso de un dispositivo de visualización mediante microcomputadora (MCID, Imaging Research Inc., Brock University, Ontario, Canadá).

9. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante métodos habituales. Los cortes coronarios se sometieron a inmersión en una solución de 3% de H₂O₂/10% de metanol durante 5 min, seguido de incubación con 5% de suero de cabra normal durante 60 min. Los cortes se incubaron después durante la noche con un anticuerpo anti-GFAP (1:1.000; Dako, Carpintería, Ca, EE.UU.) para la detección de astrocitos, con un anticuerpo anti-MAC-1 (1:1.000; Serotec, Raleigh, NC, EE.UU.) para la detección de microglía o anticuerpos anti-DSPA policlonales (Schering AG, Berlín). Tras el lavado, los cortes se incubaron con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Después de esto, se llevó a cabo una incubación final con un complejo de avidina/biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) durante 60 min, antes de la tinción final con 3,3'-diaminobenzidina/0,03% de H₂O₂. Los cortes se transfirieron después a portaobjetos revestidos con gelatina, se secaron, se deshidrataron y se cubrieron con Permount.

B. Resultados

1. La infusión de t-PA o DSPA se distribuye por el hipocampo de los ratones t-PA -/- y mantiene su actividad proteolítica

Los primeros estudios se diseñaron para confirmar que tanto DSPA como t-PA mantienen su actividad proteolítica a lo largo del periodo de 7 días de la infusión. Para este fin, se incubaron partes alícuotas de t-PA y DSPA (100 nmol) en un baño de agua durante siete días a 37°C y a 30°C. Para determinar la actividad proteolítica, se sometió a diluciones quíntuplas en serie de las muestras de una SDS-PAGE, en condiciones no reductoras, y se midió la actividad proteolítica mediante análisis zimográficos. En cada caso, se usó como testigo una parte alícuota de t-PA y DSPA que había permanecido congelada durante esos siete días. Como se puede observar en la Figura 1, solo hubo una ligera pérdida de actividad de DSPA o t-PA durante la incubación a 25°C y a 37°C a lo largo de ese periodo de tiempo.

2. Se puede hallar actividad de t-PA y DSPA también en extractos de hipocampo de ratones t-PA -/- tras la infusión

Primero se tuvo que determinar si las proteasas administradas durante la infusión estaban realmente presentes en el cerebro de los animales tratados, y que también mantuvieron allí su actividad proteolítica. Para esto, los ratones t-PA -/- recibieron infusiones de t-PA o DSPA durante siete días (véase anteriormente). Los ratones se sacrificaron después mediante perfusión transcárdica con PBS y se extrajeron los cerebros. Se aislaron las regiones ipsilaterales y contralaterales del hipocampo, al igual que una región del cerebelo (como testigo negativo). Las muestras de tejido (20 µg) se sometieron a una SDS-PAGE y a análisis zimográfico, de acuerdo con la descripción en la sección de métodos. Como se puede observar en la Figura 2, se midieron las actividades de t-PA y DSPA en la región ipsilateral del hipocampo, y se midió cierta actividad además en el lado contralateral. Esto demostró que las proteasas infundidas no solamente mantuvieron su actividad en el cerebro, sino que además se extendieron a la región del hipocampo. No se detectó actividad en el extracto del testigo preparado a partir del cerebelo.

3. Detección inmunohistoquímica de DSPA

Para demostrar que DSPA se había difundido realmente por la región del hipocampo, los cortes coronarios del cerebro de ratones t-PA -/- se sometieron a análisis inmunohistoquímico tras la infusión de DSPA. En este análisis se detectó el antígeno de DSPA en la región del hipocampo, y los alrededores del lugar de infusión mostraron la tinción más intensa. Este resultado confirma que el DSPA infundido es soluble y está realmente presente en el hipocampo.

4. La infusión de DSPA no restablece la sensibilidad hacia la neurodegeneración dependiente del ácido kaínico *in vivo*

Los ratones t-PA -/- son resistentes a la neurodegeneración dependiente del ácido kaínico. En contraste, una

infusión de rt-PA en el hipocampo conduce a que se restablezca completamente la sensibilidad de las lesiones dependientes del ácido kaínico. Para responder la pregunta de si el DSPA puede sustituir al t-PA en esta acción, se administraron a los ratones t-PA -/- infusiones de t-PA o DSPA en el hipocampo por medio de una bomba miniosmótica. Se usaron 12 ratones para ambos grupos. Dos días más tarde los animales recibieron inyecciones de ácido kaínico, seguido de una fase de reposo posterior. Cinco días más tarde se sacrificaron los animales. Los cerebros se extrajeron y se procesaron (véase anteriormente). Como testigos, también se infundió PBS a los ratones t-PA -/- antes del tratamiento con AK (n=3).

Se prepararon cortes coronarios de cerebro y las neuronas se detectaron mediante tinción de Nissl. Fue evidente que los ratones t-PA -/- eran resistentes al AK tras la infusión de PBS. Por otra parte, las infusiones con t-PA recombinante condujeron a que se restableciera la sensibilidad al tratamiento con AK. En contraste, la infusión de la misma concentración de DSPA en la región del hipocampo no cambió la sensibilidad de estos animales frente a AK (véanse las Figs. 4a y 4b).

Estos resultados se cuantificaron mediante el uso de 12 ratones en cada grupo. En 2 de los 12 ratones a los que se infundió DSPA, se observaron unas cuantas neurodegeneraciones ligeras. La razón de esto todavía no está clara, y posiblemente es independiente de la presencia de DSPA. Los datos combinados tienen en cuenta el efecto ligero observado en estos dos animales. Los 12 ratones tratados con t-PA fueron sensibles al tratamiento con AK. Estos resultados muestran que tras la infusión de t-PA o DSPA en concentraciones equimolares, solamente la administración de t-PA conduce a que se restablezca la sensibilidad respecto de la neurodegeneración inducida mediante AK.

5. La infusión de DSPA no provoca la activación de la microglía

Se demostró que el restablecimiento de la sensibilidad al AK de los ratones t-PA -/-, tras la infusión de t-PA, da como resultado la activación de la microglía (Rogove y col., 1999). Para determinar el grado de la activación de la microglía tras la infusión de t-PA o DSPA y el tratamiento subsiguiente con AK, los cortes coronarios de los ratones se sometieron a una tinción inmunohistoquímica para células microgliales activadas mediante el uso del anticuerpo Mac-1. El restablecimiento de la sensibilidad hacia el AK tras la infusión de t-PA, dio como resultado un incremento claro de las células Mac-1 positivas. Esto no se observó en los ratones que habían recibido infusiones de DSPA. Por tanto, la presencia de DSPA no conduce a la activación de las células microgliales tras el tratamiento con AK.

6. Titulación de DSPA y t-PA en la región del hipocampo de ratones

La concentración de t-PA usada para la infusión se basó en la concentración descrita por Tsirka y col. (1995) (100 μ l de 0,12 mg/ml [1,85 μ M]). Se repitieron los experimentos de exposición a AK mediante el uso de una cantidad 10 veces menor de t-PA (0,185 μ M) y una cantidad mayor de DSPA (18,5 μ M). La menor concentración de t-PA fue capaz aun de restablecer la sensibilidad al tratamiento con AK (n=3). Fue de interés particular que la infusión de la concentración de DSPA 10 veces mayor, provocó solamente una pérdida neuronal ligera tras el tratamiento con AK. Estos datos indican en gran medida que DSPA no incrementa la sensibilidad hacia AK.

7. Efecto de t-PA y DSPA sobre la neurodegeneración dependiente de NMDA en ratones de tipo natural

Los efectos de t-PA y DSPA se investigaron adicionalmente en un modelo de neurodegeneración en ratones de tipo natural. Se demuestra que la inyección de t-PA en el cuerpo estriado de estos ratones conduce a una intensificación del efecto neurodegenerativo provocado por el análogo de glutamato NMDA (Nicole y col., 2001).

Para esto, se administraron inyecciones de NMDA con un volumen total de 1 μ l en la región del cuerpo estriado de ratones de tipo natural, en presencia de t-PA o DSPA (en cada caso 46 μ M). Después de 24 horas se extrajeron los cerebros y se cuantificó el tamaño de las lesiones mediante el método de Callaway (Callaway y col., 2000) (véase anteriormente). Como se puede observar en la Figura 7, la inyección de NMDA solo provocó una lesión reproducible en todos los ratones tratados (n=4). Sin embargo, cuando se inyectaron juntos t-PA y NMDA, el tamaño de las lesiones se incrementó aproximadamente un 50% ($P < 0,1$, n=4). En contraste claro con esto, la coinyección de NMDA y la misma concentración de DSPA no provocaron ningún incremento en el tamaño de la lesión en comparación con NMDA solo.

Las inyecciones de t-PA o DSPA solos no condujeron a una neurodegeneración detectable. La ausencia de efecto de t-PA cuando se administra solo es coherente con los resultados de Nicole y col. (2001). Estos datos demuestran que la presencia de DSPA no incrementa la neurodegeneración adicionalmente, incluso durante un proceso neurodegenerativo.

Para confirmar que la inyección de DSPA se ha difundido realmente en la región del hipocampo, se llevaron a cabo análisis inmunohistoquímicos en cortes coronarios mediante el uso del anticuerpo de DSPA. Los análisis muestran que DSPA penetró realmente en la región del cuerpo estriado.

Análisis cinético de la activación del plasminógeno mediante un ensayo cromogénico indirecto

Los ensayos cromogénicos indirectos de la actividad de t-PA usan los sustratos Lys-Plasminogen (American

Diagnostica) y Spectrozyme PL (American Diagnostica), y se llevan a cabo de acuerdo con el método de Madison E.L., Goldsmith E.J., Gerard R.D., Gething M.-J., Sambrook J.F. (1989) Nature 339 721-724; Madison E.L., Goldsmith E.J. Gerard R.D., Gething M.J., Sambrook J.F. y Bassel-Duby R.S. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 3530-3533 y Madison E.L., Goldsmith E.J., Gething M.J., Sambrook J.F. y Gerard R.D. (1990) J. Biol. Chem. 265, 21423-21426. Los ensayos se llevaron a cabo tanto en presencia como en ausencia del cofactor DESAFIB (American Diagnostica). DESAFIB, una preparación de monómeros de fibrina solubles, se obtuvo mediante la escisión de fibrinógeno humano sumamente puro, mediante la proteasa batroxobina. En este procedimiento, la batroxobina escinde el enlace Arg¹⁶-Gly¹⁷ en la cadena A α del fibrinógeno, y por lo tanto libera fibrinopéptido A. El des-AA-fibrinógeno resultante en forma de monómeros de fibrina I es soluble en presencia del péptido Gly-Pro-Arg-Pro. La concentración de Lys-Plasminógeno varió de 0,0125 a 0,2 μ M en presencia de DESAFIB y de 0,9 a 16 μ M en ausencia del cofactor.

Ensayos cromogénicos indirectos en presencia de diversos estimuladores

Se llevaron a cabo ensayos cromogénicos indirectos convencionales de acuerdo con las publicaciones citadas anteriormente. Se usaron grupos de 100 μ l de volumen total con 0,25-1 ng de enzima, Lys-Plasminogen 0,2 μ M y Spectrozym PL 0,62 mM. Los ensayos se llevaron a cabo en presencia de cada tampón, 25 μ g/ml de DESAFIB, 100 μ g/ml de fragmentos de fibrinógeno obtenidos mediante bromuro de cianógeno (American Diagnostica) o 100 μ g/ml del péptido estimulador de 13 aminoácidos P368. Los análisis se llevaron a cabo en placas de microtitulación y se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 405 nm, cada 30 seg durante 1 h en un "Thermomax" de Molecular Devices. La temperatura de la reacción fue 37°C.

Referencias

- Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. 1998. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21:813-25.
- Bringmann P, Gruber D, Liese A, Toschi L, Kratzchmar J, Schleuning WD, Donner P. 1995. Structural features mediating fibrin selectivity of vampire bat plasminogen activators. *J Biol Chem* 270:25596-25603.
- 25 Callaway JK, Knight MJ, Watkins DJ, Beart PM, Jarrott B, Delaney PM. 2000. A novel, rapid, computerized method for quantitation of neuronal damage in a rat model of stroke. *J Neurosci Methods* 102:53-60.
- Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De Vos R, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. 1994. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 368:419-424.
- 30 Cartwright T. 1974. The plasminogen activator of vampire bat saliva. *Blood* 43:317-326.
- Chen ZL Strickland S. 1997. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalysed degradation of laminin. *Cell* 91:917-925.
- Chen, Z-L, Indyk, J.A., Bugge, T.H., Kombrinck, K.W. y Strickland S. 1999. Neuronal Death and blood-brain barrier breakdown after excitotoxic injury are independent processes. *J. Neuroscience* 19:9813-9820.
- 35 Frey U, Muller M, Kuhl D. 1996. A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* 16:2057-2063.
- Gardell SJ, Duong LT, Diehl RE, York JD, Hare TR, Register RB, Jacobs JW, Dixon RA, Friedman PA. 1989. Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. *J Biol Chem* 264:17947-17952.
- 40 Gardell SJ, Ramjit DR, Stabilito II, Fujita T, Lynch JJ, Cuca GC, Jain D, Wang SP, Tung JS, Mark GE, y col. 1991. Effective thrombolysis without marked plasminemia after bolus intravenous administration of vampire bat salivary plasminogen activator in rabbits. *Circulation* 84:244-253.
- Graneli-Piperno, A y Reich, E. 1974. A study of proteases and protease inhibitor complexes in biological fluids. *J. Exp. Med.* 148: 223-234.
- 45 Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P. 1996. Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:8699-86704.
- 50 Kratzschmar J, Haendler B, Langer G, Boidol W, Bringmann P, Alagon A, Donner P, Schleuning WD. 1991. The plasminogen activator family from the salivary gland of the vampire bat *Desmodus rotundus*: cloning and expression. *Gene* 105:229-237.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD. (1999) Enhanced hippocampal long-term

- potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18:3007-3012.
- 5 Mellott MJ, Stabilito II, Holahan MA, Cuca GC, Wang S, Li P, Barrett JS, Lynch JJ, Gardell SJ. 1992. Vampire bat salivary plasminogen activator promotes rapid and sustained reperfusion concomitant systemic plasminogen activation in a canine model of arterial thrombosis. *Arterioscler. Thromb.* 12:212-221.
- Muschick, P., Zeggert D., Donner, P., Witt, W. 1993. Thrombolytic properties of *Desmodus* (vampire bat) plasminogen activator DSPA α 1, Alteplase and streptokinase following intravenous bolus injection in a rabbit model of carotid artery thrombolysis. *Fibrinolysis* 7: 284-290.
- 10 Müller, C.M., Griesinger, C.B. 1998. Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nature Neuroscience.* 1: 47-53.
- National Institute of Neurological Disorders and stroke rt-PA study group. 1995. *New. Engl. J. Med.* 333: 1581-1587.
- Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D. & Buisson, A. (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 7, 59-64.
- 15 Rogove AD, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka SE. 1999. Activation of microglia reveals a non-proteolytic cytokine function for tissue plasminogen activator in the central nervous system. *J Cell Sci* 112:4007-4016.
- Schleuning WD, Alagon A, Boidol W, Bringmann P, Petri T, Kratzschmar J, Haendler B, Langer G, Baldus B, Witt W, y col. 1992. Plasminogen activators from the saliva of *Desmodus rotundus* (common vampire bat): unique fibrin specificity. *Ann N Y Acad Sci* 667:395-403.
- 20 Seeds, N.W., Williams, B.L., Bickford, P.C. 1995. Tissue plasminogen activator induction in purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science.* 270:1992-1994.
- Stewart RJ, Fredenburgh JC, Weitz JI. 1998. Characterization of the interactions of plasminogen and tissue and vampire bat plasminogen activators with fibrinogen, fibrin, and the complex of D-dimer noncovalently linked to fragment E. *J Biol Chem* 273:18292-18299.
- Traynelis, SF, Lipton, SA. 2001. Is tissue plasminogen activator a threat to neurons? *Nature Medicine,* 7:17-18.
- 25 Toschi L, Bringmann P, Petri T, Donner P, Schleuning WD. 1998. Fibrin selectivity of the isolated protease domains of tissue-type and vampire bat salivary gland plasminogen activators. *Eur J Biochem* 252:108-112.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S. 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature.* 377:340-344.
- Tsirka, S., Rogove, A. D., and Strickland, S. 1996. Neuronal cell death and tPA. *Nature* 384: 123-124.
- 30 Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. 1997. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 17:543-552.
- Tsirka SE, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. 1997. Neuronal death in the central nervous system demonstrates a non-fibrin substrate for plasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9779-9781.
- 35 Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. 1998. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med.* 4:228-231.
- Walker JB, Nesheim ME. 2001. A kinetic analysis of the tissue plasminogen activator and DSPA α 1 cofactor activities of untreated and TAFI α -treated soluble fibrin degradation products of varying size. *J Biol Chem* 276:3138-3148.
- 40 Witt W, Maass B, Baldus B, Hildebrand M, Donner P, Schleuning WD. 1994. Coronary thrombolysis with *Desmodus* salivary plasminogen activator in dogs. Fast and persistent recanalization by intravenous bolus administration. *Circulation.* 90:421-426.

REIVINDICACIONES

1. DSPA alfa 1 para el tratamiento terapéutico de la apoplejía en seres humanos después de que hayan pasado tres horas desde el inicio de la apoplejía.
- 5 2. DSPA alfa 1 de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el tratamiento tiene lugar después de que hayan pasado seis horas desde el inicio de la apoplejía.
3. DSPA alfa 1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el tratamiento tiene lugar después de que hayan pasado nueve horas desde el inicio de la apoplejía.
4. DSPA alfa 1 de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque DSPA alfa 1 se puede aislar a partir de *Desmodus rotundus*.
- 10 5. DSPA alfa 1 de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque DSPA alfa 1 se aísla a partir de *Desmodus rotundus*.

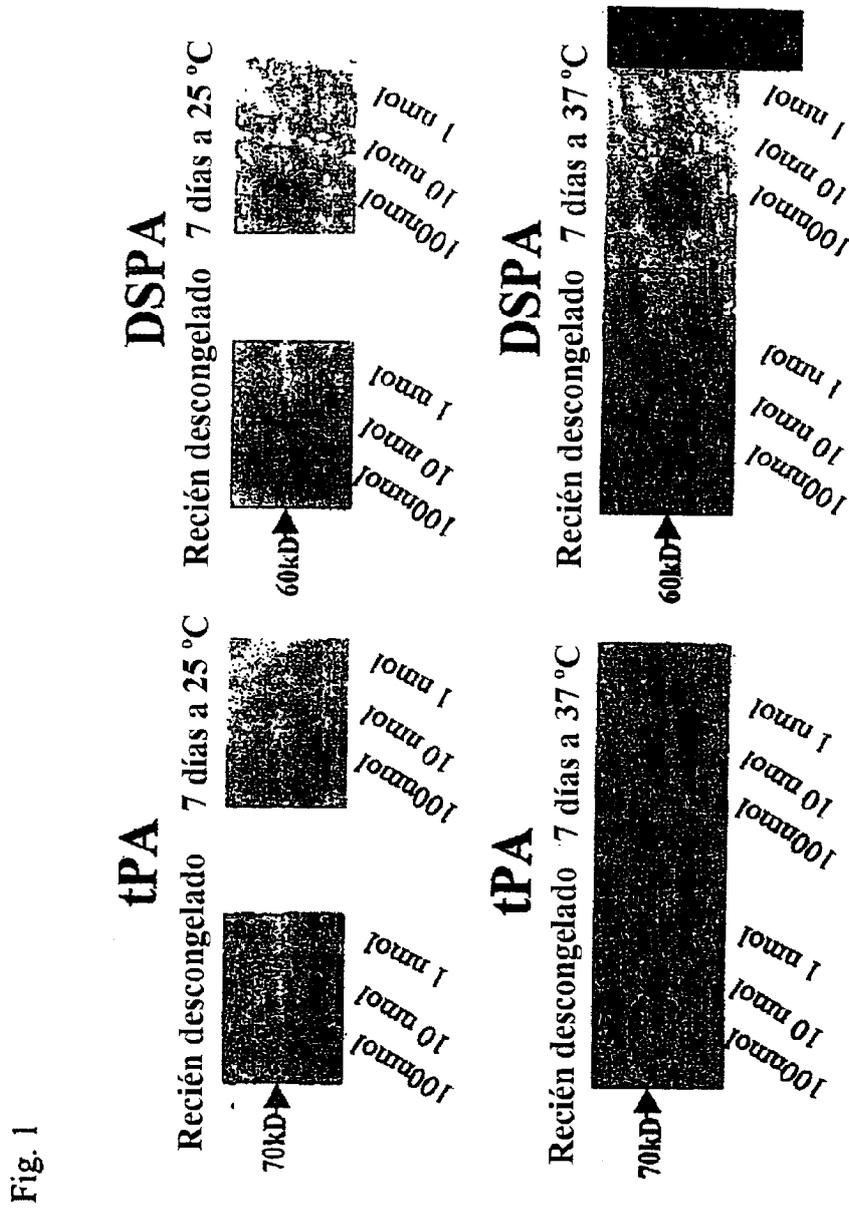


Fig. 1

Fig. 2

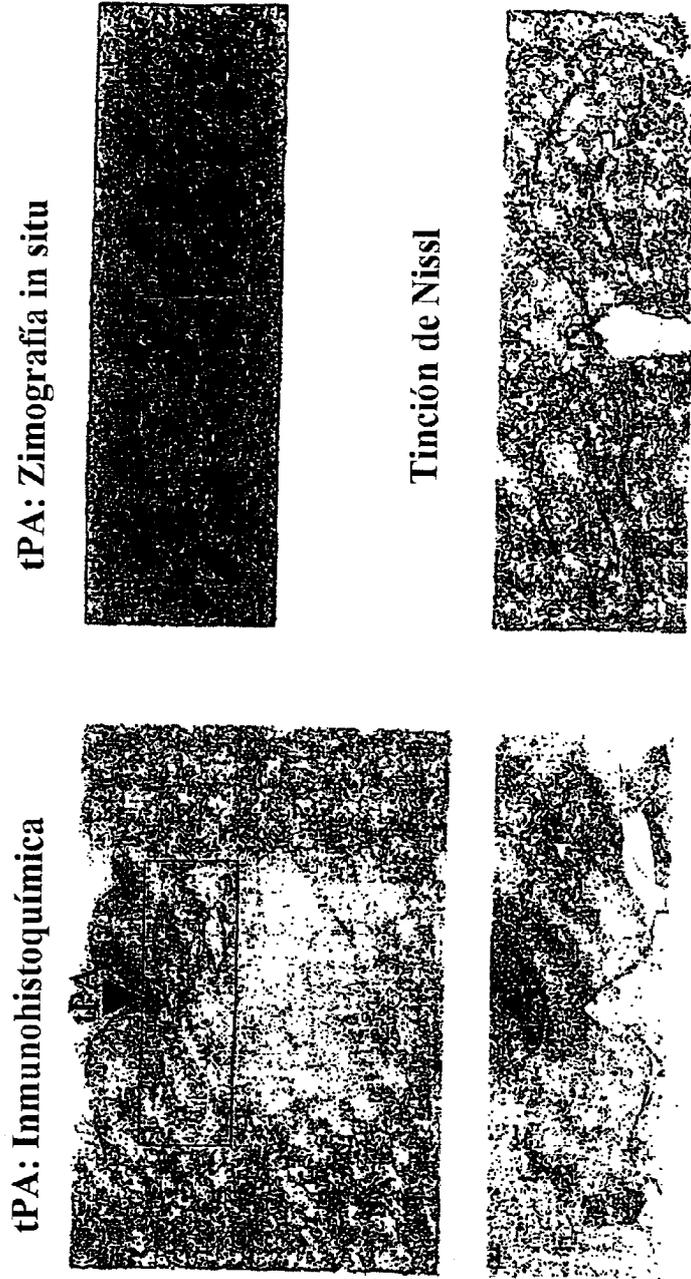


Fig. 4a

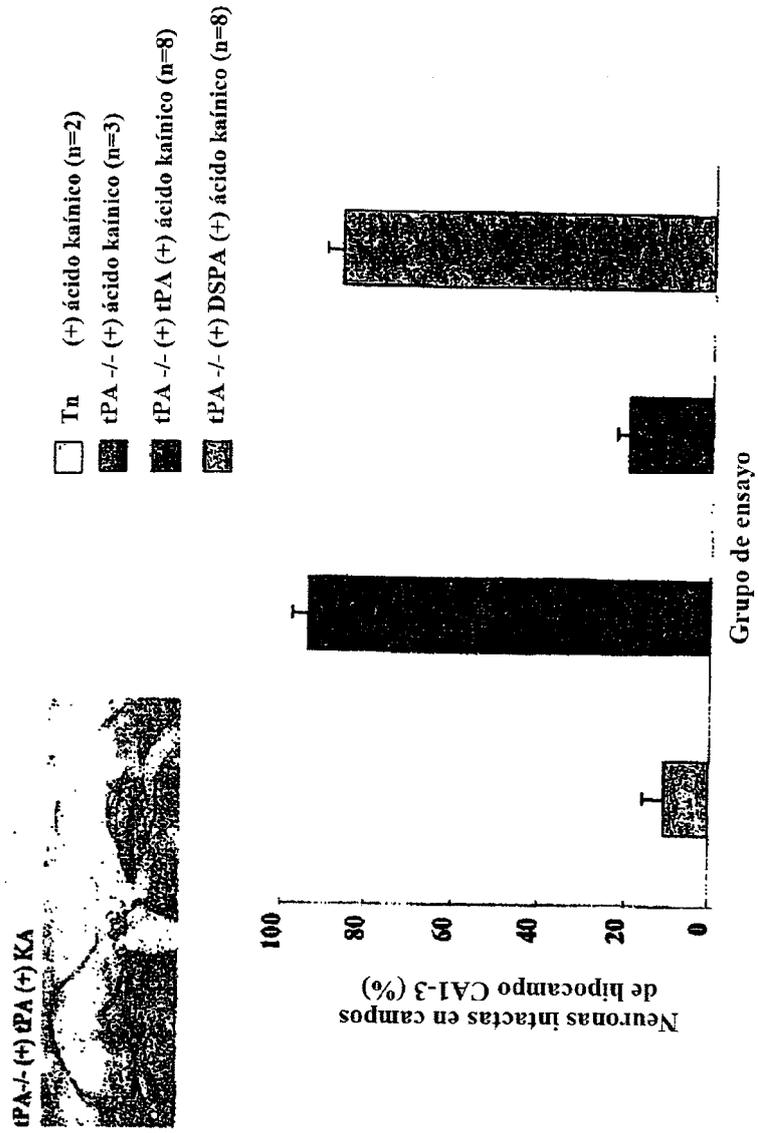
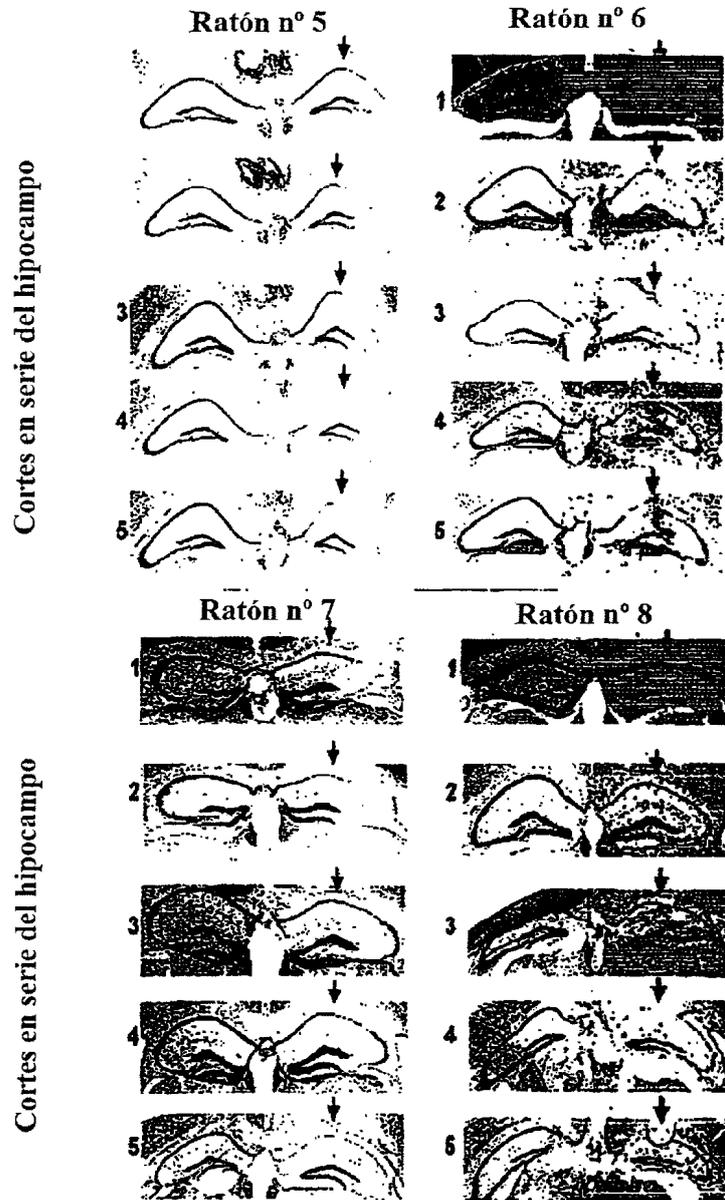
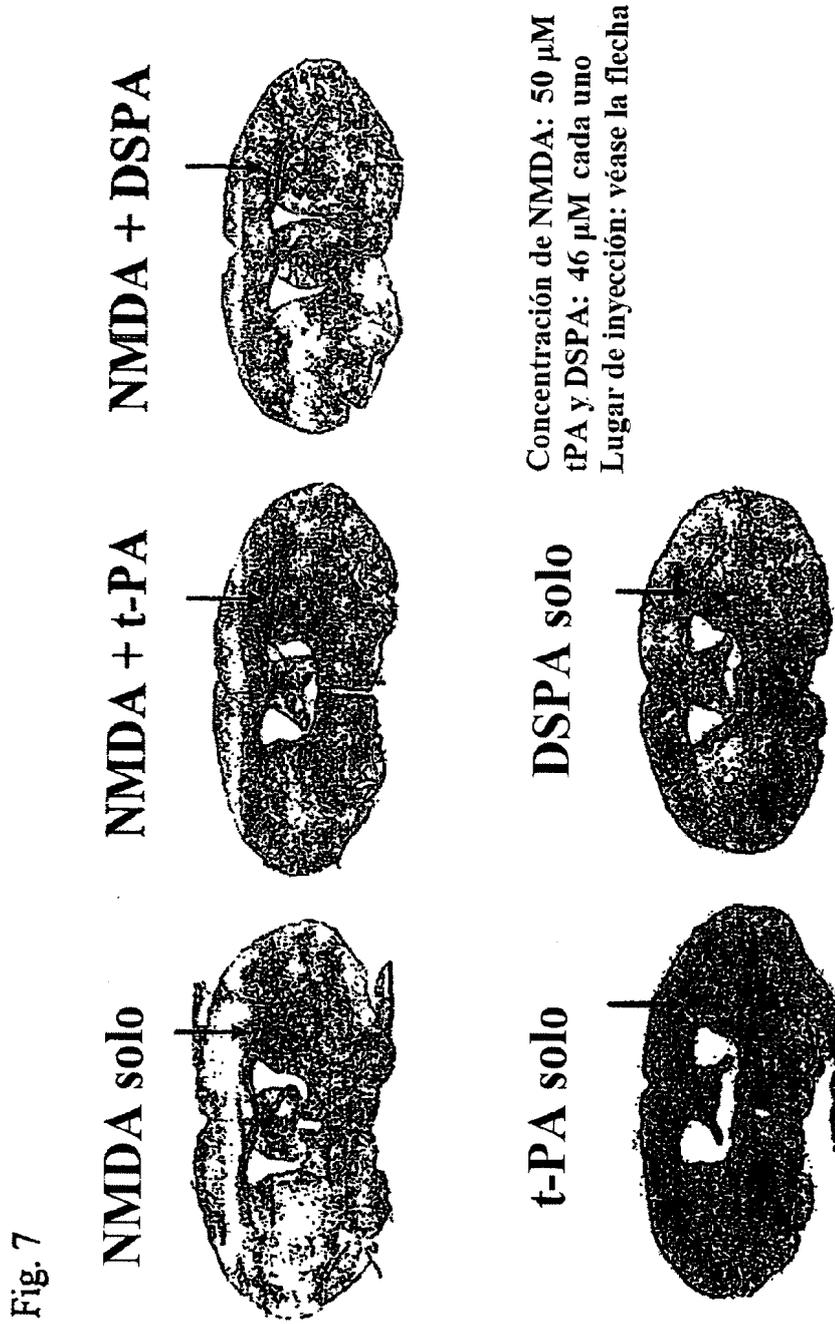


Fig. 4b

Ratones tPA $-/-$: Infusión de tPA seguida de inyección de ácido kaínico (\downarrow)





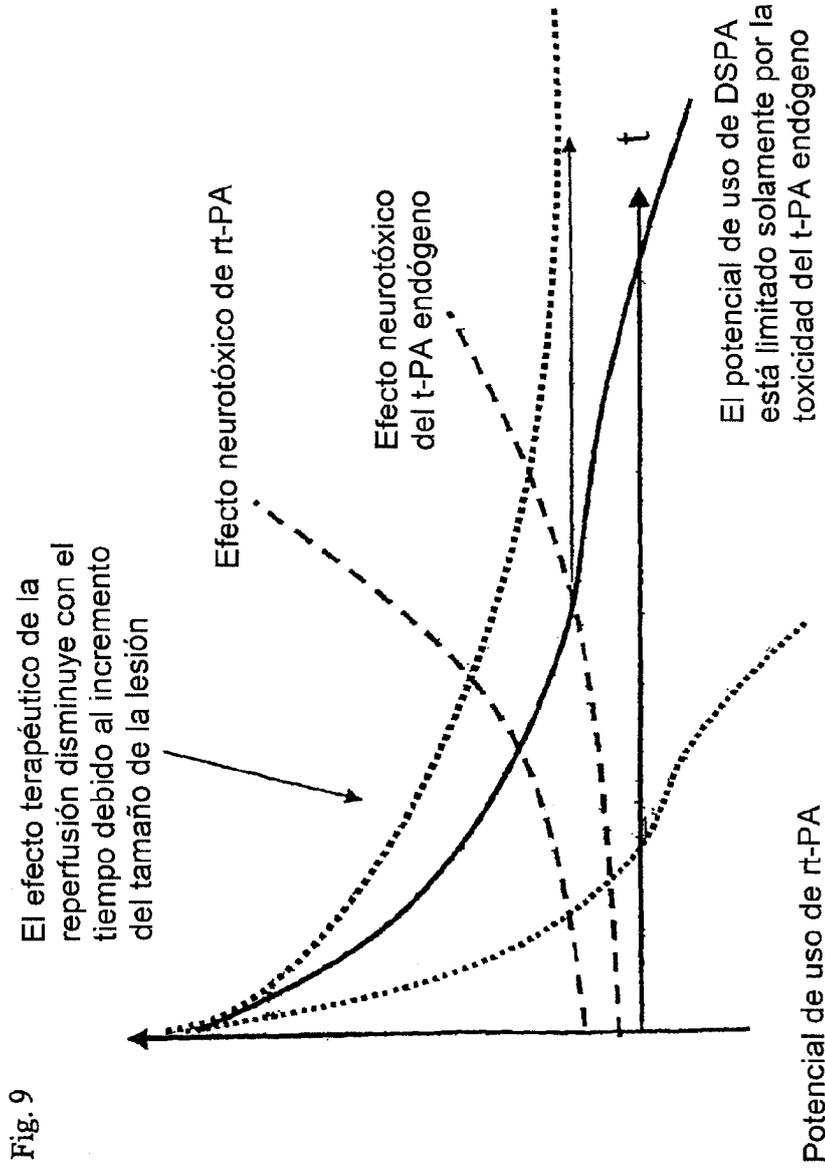
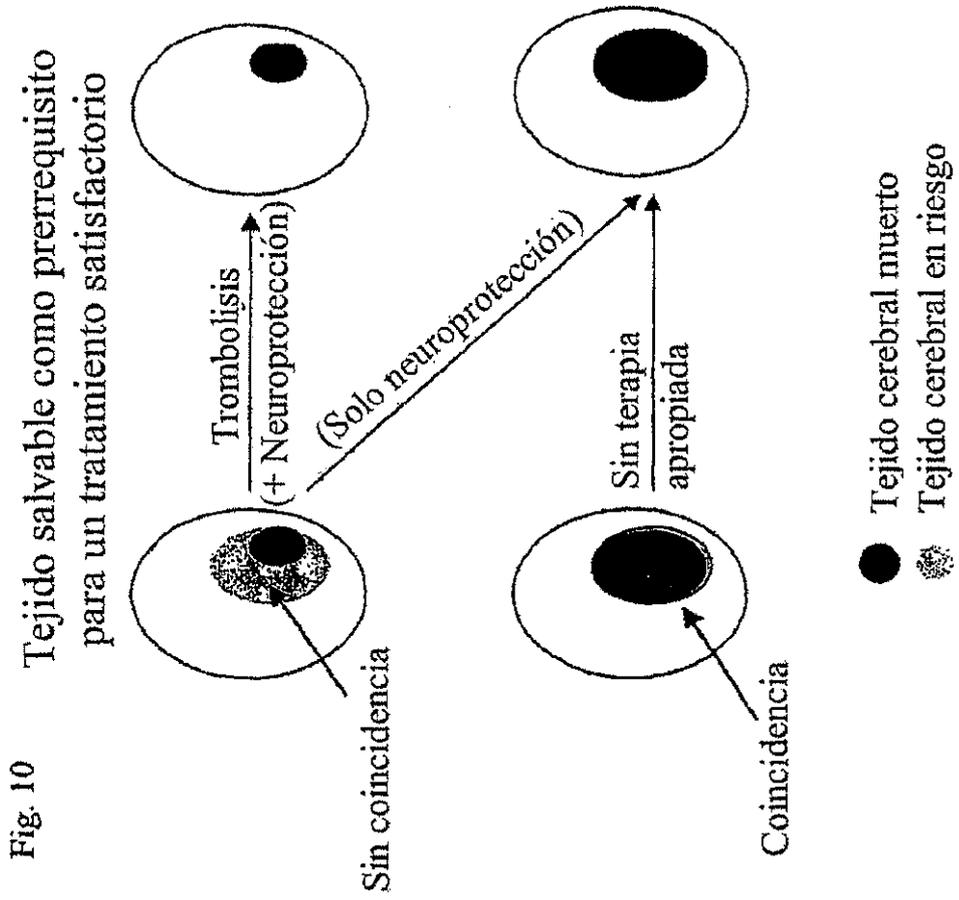


Fig. 9



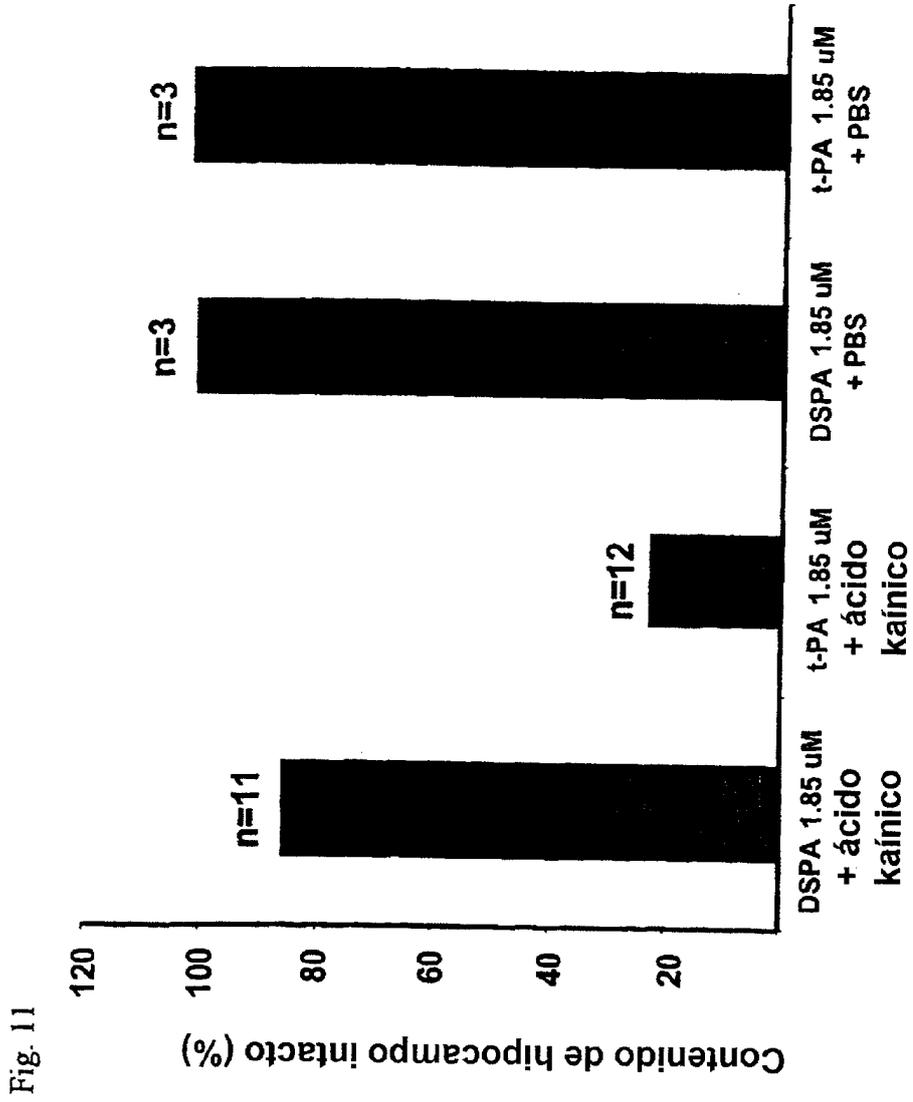


Fig. 11

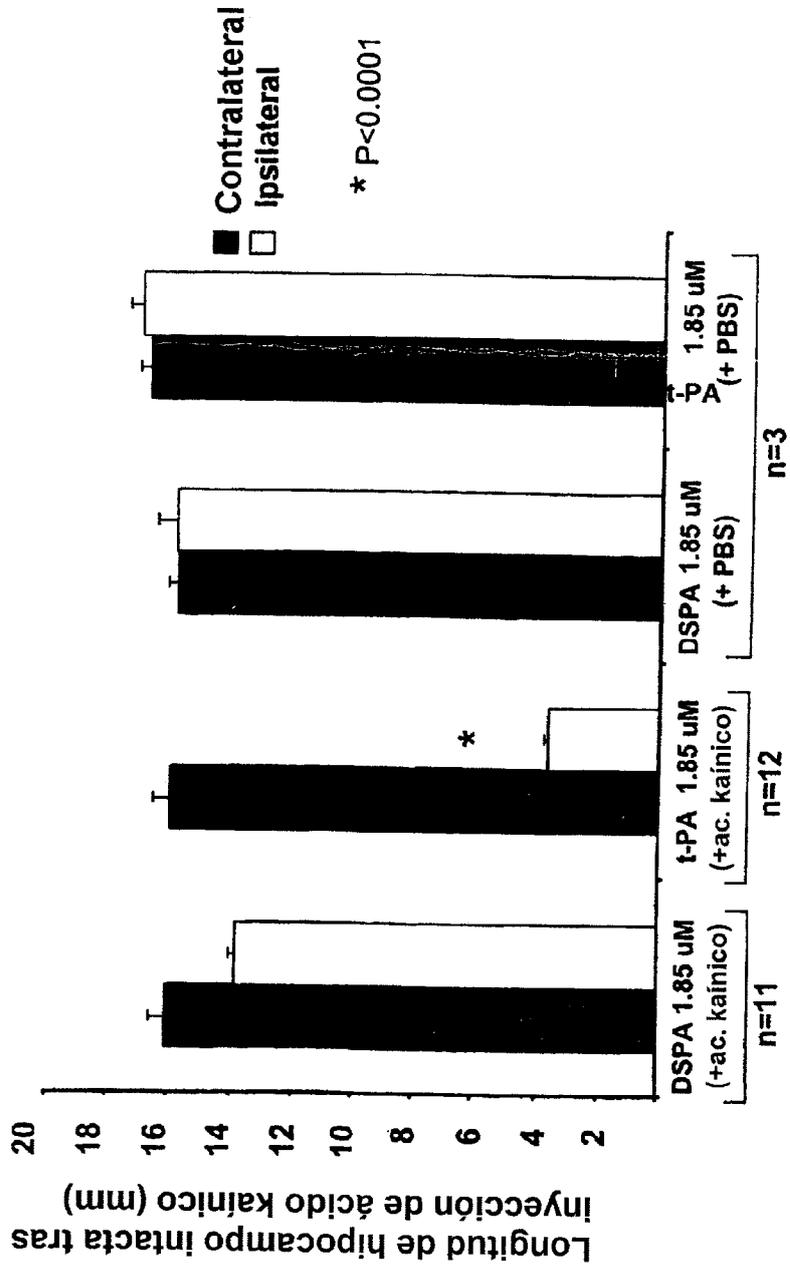


Fig. 12

SEQ. ID No. 2

1 MVNMTMKTLL CVLLLCGAVF SLPRQETYRQ LARGSRAYGV ACKDEITQMT
 51 YRRQESWLRP EVRSKRVEHC QCDRGSNELH QVPSNSCDEP RCLNGGTCVS
 101 NKYFSIHWCN CPKKFGGQHC EIDKSKTCYE GNGHFYRGKA STDTMGRPCL
 151 PWSATVLLQQ TYHAHRSDAL QLGLGKHNVC RNPDRRRRPW CYVQVGLKPL
 201 VQECMVHDCA DFQCGQKTLR EPRPHSTGGE FTTIENQPFW AAIYRRHRGG
 251 SGVTYVCGGS LMSPCWVISA THCFIDYPPK EDYIVYLGRS RLNSNTQGEM
 301 KFEVENLILH KDYSADTHHN DIALLKIRSK EGRCAQPSRT IQTICLPSMY
 351 NDPQFGTSCE ITGFGKENST DYLYPEQLKM TVVKLISHRE CQPHYYGSE
 401 VTTKMLCAAD POWKEIYPNV TDSCQDSSGG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGR
 451 GCALKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKL

Fig. 14

SEQ. ID No. 1

1 MVNMTMKTLL CVLLLCGAVF SLPRQETYRQ LARGSRAYGV ACKDEITQMT
 51 YRRQESWLRP EVRSKRVEHC QCDRGOARCH TVPVKSCSEP RCFNGGTCQQ
 101 ALYFSDFVCC CPEGFAGKCC BIDTRATCYE DQGISYRGTW STAESGAECT
 151 NWNSSALAAK PYSGRRPDAI RLGLGNHNVC RNPDRDSKPW CYVFKAGKYS
 201 SEFCSTPACS STCGLRQYSQ PQFHSTGGLF ADIASHPWQA AIFAKHRRSP
 251 GERFLCGGIL ISSCWILSAA HCFQERFPPH HLTVILGRTY RVPVFGEEEOK
 301 FEVEKYIVHK EFDODTYDND IALLQLKSDS SRCAQESSVV RTVCLPPADL
 351 QLPDWTECEL SGYKHEALS PFYSERLKRA HVRLYPSRC TSQHLLNRTV
 401 TDNMLCAGDT RSGGPQANLH DACQGDSSGP LVCLNDGRMT LVGIISWGLG
 451 CGQKDVPGVY TKVTNYLDWI RDNMRP