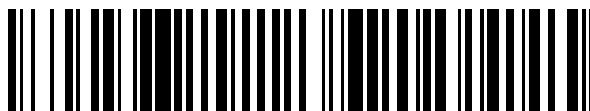


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 782**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/49** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2004 E 04730516 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1622639**

54 Título: **Inyección intravenosa de activadores del plasminógeno no neurotóxico para el tratamiento de accidente cerebrovascular**

30 Prioridad:

**02.05.2003 WO PCT/EP03/04608**

**06.05.2003 WO PCT/EP03/04729**

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

**24.04.2013**

73 Titular/es:

**LUNDBECK, H., A/S (100.0%)**

**Ottiliavej 9**

**2500 Copenhagen-Valby , DK**

72 Inventor/es:

**SÖHNGEN, MARIOLA;**

**SÖHNGEN, WOLFGANG;**

**SCHLEUNING, WOLF-DIETER y**

**MEDCALF, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 401 782 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**

Inyección intravenosa de activadores del plasminógeno no neurotóxico para el tratamiento de accidente cerebrovascular.

5 La invención se refiere a la aplicación intravenosa de activadores del plasminógeno no neurotóxicos, especialmente activadores del plasminógeno modificados genéticamente y activadores del plasminógeno de la saliva de *Desmodus rotundus* (DSPA) para el tratamiento del accidente cerebrovascular en el ser humano. El tratamiento del accidente cerebrovascular con estos activadores del plasminógeno se conoce de la solicitud de patente internacional PCT/EP02/12204, a cuya divulgación se hace referencia en su totalidad.

**Clínica y bioquímica del accidente cerebrovascular**

10 El concepto "accidente cerebrovascular" comprende diversos cuadros clínicos, que se asemejan en sus síntomas clínicos. Se puede hacer una primera diferenciación de estos cuadros clínicos en los así llamados insultos isquémicos e insultos hemorrágicos a partir de la patogénesis correspondiente.

15 En el caso de los insultos isquémicos (isquemia) se trata de una disminución o interrupción de la irrigación del cerebro como consecuencia de un suministro insuficiente de sangre arterial. Ésta es causada frecuentemente por una trombosis de un vaso arterioesclerótico estenosado, pero también por embolias arterio-arteriales o cardíacas.

Los insultos hemorrágicos en cambio son causados por una perforación de las arterias que irrigan el cerebro dañadas por hipertensión arterial. Pero de todos los insultos cerebrales sólo alrededor del 20% son causados por esta forma de hemorragias, de modo que los accidentes cerebrovasculares causados por trombosis son los que tienen mayor importancia

20 La isquemia de los tejidos neuronales - en comparación con otras isquemias de tejidos - va acompañada en gran medida con necrosis de las células afectadas. La mayor incidencia de necrosis puede ser explicada, según nuevos conocimientos, por el fenómeno de la así llamada excitotoxicidad, en donde se produce una compleja cascada de una multiplicidad de pasos de reacción. Según esto, ésta se produce porque las neuronas isquémicas que sufren la falta de oxígeno pierden rápidamente ATP y se despolarizan. Esto lleva a una mayor liberación postsináptica del neurotransmisor glutamato, el que a su vez activa los receptores de glutamato neuronales ligados a la membrana, los que regulan los canales de cationes. Como consecuencia de la mayor liberación de glutamato, los receptores de glutamato son *sobreactivados*.

25 Los receptores de glutamato regulan a su vez los canales de cationes dependientes del voltaje, los que - al unirse el glutamato a su receptor - se abren. De esta manera se produce una corriente de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> hacia la célula, que lleva a un trastorno masivo del metabolismo celular dependiente del Ca<sup>2+</sup> - inclusive del metabolismo energético -. La muerte celular que se produce a continuación podría ser responsabilidad especialmente de la activación de enzimas catabólicas dependientes del Ca<sup>2+</sup> (Lee, Jin-Mo et al., "The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms"; Dennis W. Zhol "Glutamat neurotoxicity and diseases of the nervous system").

30 Aún cuando el mecanismo de la neurotoxicidad mediada por glutamato todavía no se entiende en sus detalles, parece existir sin embargo uniformidad de criterio con respecto a que este fenómeno aporta en gran medida a la muerte celular neuronal después de una isquemia cerebral (Jin-Mo Lee et. al.).

**Terapia del accidente cerebrovascular**

En la terapia de la isquemia cerebral aguda, aparte del aseguramiento de las funciones vitales y la estabilización de los parámetros fisiológicos se debe tratar de abrir nuevamente el vaso estenosado.

40 Este objetivo se busca alcanzar con diversas propuestas. La nueva apertura mecánica no ha logrado hasta ahora resultados satisfactorios, como por ejemplo, la PTCA en el caso del infarto cardíaco. Solamente con una fibrinólisis exitosa se puede lograr hasta ahora una mejoría suficiente del estado de los pacientes.

45 La fibrinólisis propia del cuerpo se basa en la actividad proteolítica de la serina proteasa plasmina, la que resulta por una catálisis (activación) a partir de la etapa previa inactiva del plasminógeno. La activación natural del plasminógeno se produce por los activadores del plasminógeno propios del cuerpo u-PA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa) y t-PA (*Tissue Plasminogen Activator*). Este último forma - a diferencia del u-PA - junto con la fibrina y el plasminógeno un así llamado complejo activador. La actividad catalítica del t-PA es por lo tanto dependiente de la fibrina y experimenta en presencia de fibrina un aumento de aproximadamente 550 veces. Aparte de la fibrina, también el fibrinógeno puede estimular la catálisis mediada por t-PA de plasmina a plasminógeno - si bien en una medida mucho menor. Así la actividad de t-PA experimenta en presencia de fibrinógeno solamente un aumento de 25 veces. Los productos de degradación de la fibrina (*fibrin degradation products* (FDP)) estimulan a su vez igualmente la actividad de t-PA.

**Propuestas terapéuticas conocidas**

a) Estreptoquinasa

Propuestas tempranas para el tratamiento trombolítico del accidente cerebrovascular agudo se remontan a los años 50. Pero recién desde 1995 se realizaron amplios ensayos clínicos con estreptoquinasa, un fibrinolítico de los estreptococos beta-hemolíticos. La estreptoquinasa forma un complejo con el plasminógeno, el cual puede transformar otras moléculas de plasminógeno en plasmina

5 La terapia con estreptoquinasa está asociada sin embargo con importantes desventajas, ya que la estreptoquinasa, como proteasa bacteriana, puede provocar en el cuerpo reacciones alérgicas. También puede existir una así llamada resistencia a la estreptoquinasa en caso de una infección anterior con estreptococos con la correspondiente formación de anticuerpos, lo que dificulta una terapia. Además, estudios clínicos realizados en Europa (*Multicenter Acute Stroke Trial of Europe* (MAST-E), *Multicenter Acute Stroke Trial of Italy* (MAST-I)) y Australia (*Australien Estreptoquinasa Trial* (AST)) señalaron un riesgo de mortalidad muy grande y un gran riesgo de hemorragias intracerebrales (*intracerebral hemorrhage*, ICH) después del tratamiento de los pacientes con estreptoquinasa, de modo que se tuvieron que interrumpir estos estudios tempranamente.

b) Uroquinasa

15 En una propuesta de terapia alternativa se aplica uroquinasa - también un fibrinolítico "clásico" -, la que a diferencia de la estreptoquinasa no tiene propiedades antigénicas, ya que se trata de una enzima propia del cuerpo que se encuentra en numerosos tejidos. Representa un activador del plasminógeno independiente de cofactores. La uroquinasa se produce en cultivos de células renales.

c) t-PA recombinante (rt-PA)

20 Existen amplias experiencias en el campo de la trombólisis terapéutica con el activador del plasminógeno del tipo tisular - el así llamado rt-PA - (ver EP 0 093 619, patente US 4.766.075), el que se produce en células de hámster recombinantes. Con el t-PA se realizaron - aparte de la indicación principal en el infarto agudo de miocardio - en los años 90 en todo el mundo una serie de estudios clínicos con resultados en parte aún no comprendidos y contradictorios. En el así llamado *European Acute Stroke Trial* (ECASS) se trataron pacientes dentro de un período de tiempo de seis horas después de la aparición de los síntomas del accidente cerebrovascular en forma intravenosa con rt-PA y después de 90 días se investigó la tasa de mortalidad así como también el índice de Barthel como medida de la invalidez o la capacidad vital independiente de los pacientes. Se obtuvo como resultado una mejora significativa de la capacidad vital, pero un aumento de la mortalidad -si bien no significativo-. Esto permitió la conclusión de que un tratamiento trombolítico con rt-PA de pacientes seleccionados individualmente de acuerdo con su historia clínica, inmediatamente después del comienzo del accidente cerebrovascular podría ser probablemente ventajoso. En base al mayor riesgo observado de una hemorragia intracerebral (ICH) sólo unas pocas horas después del comienzo del accidente cerebrovascular, se llegó a la conclusión de no aconsejar una administración *general* de rt-PA dentro del período de tiempo examinado de seis horas después del comienzo del accidente cerebrovascular (según C. Lewyowski C y William Barsan, 2001: Treatment of Acute Stroke; en: *Annals of Emergency Medicine* 37:2; pág. 202 y ss.).

35 El tratamiento trombolítico del accidente cerebrovascular fue posteriormente objeto de un estudio clínico del *National Institute of Neurologic Disorder and Stroke* (el así llamado *NINDS rtPA Stroke Trial*) en los EE.UU. En primer término, sin embargo, se encontraba el estudio del efecto de un tratamiento intravenoso con rt-PA dentro de un período de tiempo de sólo tres horas después del comienzo de los síntomas, sobre el estado de salud del paciente después de tres meses. Si bien los autores determinaron también aquí un riesgo aumentado de ICH, se recomienda sin embargo el tratamiento con rt-PA dentro de este período de tiempo limitado de tres horas en base a los efectos positivos de este tratamiento, reconocidos igualmente en el estudio, sobre la capacidad vital de los pacientes.

45 En otros dos estudios (ECASS II Trial; *Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke* (ATLANTIS)) se investigó si esta determinación positiva sobre el efecto del tratamiento con rt-PA dentro de las tres horas del comienzo del accidente cerebrovascular también se podían confirmar para un tratamiento en un período de tiempo de seis horas. Esta cuestión no se pudo responder positivamente, sin embargo, ya que en este período de tiempo con este tratamiento, aparte del riesgo aumentado de ICH no se pudo observar una mejora de los síntomas clínicos o una reducción de la mortalidad.

50 De acuerdo con una síntesis que se publicó por primera vez en 1997 y se actualizó en marzo de 2001, de todos los ensayos sobre accidente cerebrovascular ("Stroke Trials") todos los tratamientos con trombolíticos (uroquinasa, estreptoquinasa, rt-PA o uroquinasa recombinante), especialmente debido a ICH, llevaban a un aumento significativo de la mortalidad dentro de los primeros diez días después del accidente cerebrovascular, mientras que con el tratamiento dentro del período de tiempo de las 6 horas, se reducía el número total de los pacientes muertos o incapacitados. No se aconseja por lo tanto una utilización amplia de trombolíticos para el tratamiento del accidente cerebrovascular.

55 Estos resultados llevaron ya antes a otros autores a realizar una expresión sarcástica de que todos los pacientes con accidente cerebrovascular tenían la elección de morir o sobrevivir incapacitados (SCRIP 1997: 2265, 26).

Igualmente la terapia con rt-PA es actualmente el único método de tratamiento aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en los EE. UU. para la isquemia cerebral aguda. Ésta está limitada sin embargo a una

aplicación del rt-PA dentro de las tres horas siguientes al comienzo del accidente cerebrovascular.

El activador de plasminógeno recombinante se encuentra actualmente en el mercado bajo la denominación *Alteplase* así como también como preparado análogo *Retepase*. Este último se trata de un fragmento de t-PA terapéuticamente activo con menor tiempo de vida media. La dosis terapéutica se encuentra para *Alteplase* en aprox. 70100 mg, para *Retepase* en dos veces 560 mg, administrándose *Alteplase* substancialmente a través de una infusión por goteo, *Retepase* en cambio a través de una inyección de bolo dos veces con una separación de aprox. 30 min. (Mutschler: "Arzneimittelwirkungen", 8.ª edición, págs. 512-513).

### Efectos colaterales del t-PA

#### Neurotoxicidad y excitotoxicidad

La aprobación del rt-PA se realizó en 1996. Poco antes, a saber, en el año 1995, se conocieron primeros indicios de la causa de los efectos neurotóxicos y/o excitotóxicos del t-PA, que suministraron una propuesta de explicación para los efectos dramáticos del t-PA en el tratamiento del accidente cerebrovascular fuera del período de tratamiento de 3 horas. Según éste las células microglías y las células neuronales del hipocampo producen t-PA propio del cuerpo, el que está involucrado en la excitotoxicidad producida por el glutamato. A esta conclusión se llegó por una comparación de ratones con deficiencia de t-PA y ratones de tipo salvaje, a los cuales se les inyectaron en cada caso agonistas de glutamato en el hipocampo. Los ratones con deficiencia de t-PA mostraron una resistencia claramente mayor contra el glutamato aplicado externamente (intratecal) (Tsirka SE et al., Nature, Vol. 377, 1995, "Exzitoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator"). Estos resultados fueron confirmados en el año 1998, cuando Wang et al. en ratones con deficiencia de t-PA pudo demostrar por medio de la inyección intravenosa de t-PA una casi duplicación del tejido neuronal necrótico. Este efecto negativo del t-PA externo en los ratones salvajes era en cambio de aprox. 33% (Wang et al., 1998, Nature, "Tissue plasminogen activator (t-PA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild type and t-PA deficient mice").

Resultados ulteriores sobre la estimulación de la excitotoxicidad por tPA fueron publicados por Nicole et al. al comienzo del año 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). Pudieron demostrar que el t-PA liberado por las neuronas corticales despolarizadas interactúa con la así llamada subunidad NR1 del receptor de glutamato del tipo NMDA y la divide. Esta modificación lleva a un aumento de la actividad del receptor, el que a su vez es responsable de un mayor daño tisular después de la aplicación del agonista de glutamato NMDA por una excitotoxicidad inducida. El t-PA actúa de este modo por la activación del receptor de glutamato del tipo de NMDA en forma neurotóxica. Como la barrera hematoencefálica se rompe en el accidente cerebrovascular en la zona tisular afectada, las proteínas plasmáticas solubles, tales como el fibrinógeno, así como el t-PA aplicado terapéuticamente se ponen en contacto con el tejido neuronal, en donde el t-PA estimulado por el fibrinógeno, desarrolla su efecto excitotóxico por la activación del receptor de glutamato.

Que a pesar de estos indicios sobre los efectos colaterales neurotóxicos del t-PA y a pesar del aumento de la mortalidad por t-PA demostrado, la FDA haya autorizado sin embargo el medicamento, puede explicarse solamente por la falta de alternativas inocuas y efectivas -y un análisis de costos-beneficios muy pragmático-. Existe aún la necesidad de terapias más seguras, debiendo considerarse en el desarrollo de nuevos trombolíticos -en tanto no deba incluso tomarse distancia de la trombólisis- el problema de la neurotoxicidad (así, por ejemplo, Wang et al, en el sitio indicado; Lewyowski y Barsan 2001, en el sitio indicado).

Por este motivo no se realizaron investigaciones ulteriores de trombolíticos conocidos, inclusive del DSPA (activador del plasminógeno *Desmodus rotundus*) para el desarrollo de un nuevo producto terapéutico para el accidente cerebrovascular, aunque en principio todos los trombolíticos podrían ser adecuados y por ejemplo, en el caso del DSPA ya en una primera publicación se señaló su posible adecuación para este campo de indicaciones. (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 (4<sup>th</sup> International Symposium on Thrombotic Therapy in Acute Ischemic Stroke)). Precisamente en el DSPA se trata de un activador del plasminógeno con alta homología (similitud) con el t-PA, de modo que - al mismo tiempo que con la decepción sobre los efectos neurotóxicos del t-PA - tampoco se tuvieron esperanzas con respecto al DSPA.

#### Propuestas de terapias alternativas

La investigación de propuestas de terapias alternativas se dirige actualmente, por ejemplo, a los anticoagulantes como heparina, aspirina o Ancrod, el principio activo del veneno de la yarará de Malasia. Dos estudios clínicos, dirigidos, entre otros a la investigación de los efectos de la heparina (*International Stroke Trial (IST)* y *Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST)*) no indican sin embargo, una mejora significativa de la mortalidad y una prevención de un nuevo accidente cerebrovascular.

Otro método de tratamiento novedoso no se dirige al trombo ni a la fluidificación de la sangre o a la anticoagulación, sino que trata de aumentar la vitalidad de las células dañadas por la interrupción del suministro de sangre (WO 01/51613 Al y WO 01/51614 Al). Para ello se aplican antibióticos del grupo de las quinonas, los aminoglicósidos o el

cloranfenicol. Por un motivo similar se propuso, comenzar con la administración de citicolina inmediatamente después del accidente cerebrovascular, la que es escindida en el cuerpo a citidina y colina. Estos productos de degradación son componentes de la membrana celular neuronal y pueden apoyar así la regeneración del tejido dañado (patente US 5.827.832):

5 Tendencias más nuevas en la búsqueda de métodos de tratamiento más seguros se basan en los nuevos conocimientos de que una parte de las consecuencias fatales del accidente cerebrovascular sólo se debe en forma mediata a la interrupción de la irrigación sanguínea, pero en forma inmediata se deben a la excito- o neurotoxicidad con participación del receptor glutamato sobreexcitado, el cual a su vez es reforzado especialmente por el t-PA (ver más arriba). Una propuesta para la disminución de esta excitotoxicidad es por lo tanto la aplicación de los así  
10 llamados neuroprotectores. Estos se pueden usar solos o en combinación con fibrinolíticos, para minimizar así su efecto neurotóxico. Estos pueden llevar o bien en forma directa, por ejemplo como antagonistas del receptor de glutamato o en forma indirecta a través del bloqueo de los canales de sodio o calcio dependientes del voltaje, a una debilitación de la excitotoxicidad (Jin-Mo Lee et. al., en el sitio citado).

15 Una inhibición competitiva (antagonización) del receptor de glutamato del tipo NMDA es posible, por ejemplo, con el 2-amino-5-fosfonovalerato (APV) o el 2-amino-5-fosfonoheptanoato (APH). Una inhibición no competitiva se puede lograr, por ejemplo, por substancias que se unen al lado de fenciclidina de los canales, como fenciclidina, MK-801, dextrorfanano o cetamina.

Hasta ahora los tratamientos con neuroprotectores no han tenido sin embargo el éxito deseado, posiblemente porque se tuvieron que combinar con trombolíticos para desarrollar su efecto protector. Esto vale en la misma  
20 medida para sus principios activos (ver Fig. 10).

Aún una combinación de t-PA y un neuroprotector posibilita, sin embargo, a lo sumo sólo un éxito en el sentido de limitar el daño. Las desventajas de la neurotoxicidad del fibrinolítico usado, sin embargo, no se pueden evitar.

Activadores del plasminógeno no neurotóxicos

25 De la solicitud de patente internacional WO 03/037363, a cuya divulgación se hace referencia en su totalidad, se conocen activadores del plasminógeno para el tratamiento del accidente cerebrovascular, cuya actividad enzimática es aumentada en forma altamente selectiva por la fibrina muchas veces, a saber, más de 650 veces.

La composición y el uso de estos activadores del plasminógeno se basan en el conocimiento de que la neurotoxicidad del activador del plasminógeno tisular (t-PA) se debe a que como consecuencia del daño tisular en el cerebro causado por el accidente cerebrovascular se daña la barrera hematoencefálica o es destruida y el  
30 fibrinógeno que circula en la sangre puede ingresar de este modo en el tejido neuronal del cerebro. Allí activa el t-PA, el que -por medio de la activación del receptor de glutamato o por la activación del plasminógeno- lleva a daños tisulares adicionales (ver más arriba).

Para evitar este efecto, se usa el activador de plasminógeno, que presenta una mayor selectividad por fibrina y -a la inversa- una reducida capacidad de activación por el fibrinógeno. De aquí se deduce que estos activadores del  
35 plasminógeno- al pasar el fibrinógeno de la sangre al tejido neuronal como consecuencia de la barrera hematoencefálica dañada -no son activados o, en comparación con el t-PA son activados en una medida mucho más reducida-, ya que su activador fibrina debido a su tamaño e insolubilidad, no puede ingresar en el tejido neuronal. Estos activadores del plasminógeno no son por lo tanto neurotóxicos.

a) Activadores del plasminógeno modificados genéticamente

40 Para ello, se usan, por ejemplo, activadores del plasminógeno no tóxicos, los que por lo menos presentan un elemento de una así llamada tríada de zimógeno. Una tríada comparable se conoce del centro catalítico de las serinaproteasas de la familia de la quimotripsina, la que está compuesta por los tres aminoácidos que interactúan aspartato 194, histidina 40 y serina 32. Esta tríada no está presente, sin embargo en el t-PA perteneciente a las serinaproteasas de la familia de la quimotripsina. Se conoce, sin embargo, que la mutagénesis dirigida del t-PA  
45 nativo para la introducción de por lo menos uno de estos aminoácidos en posiciones adecuadas lleva a una reducción de la actividad de la pro-enzima (t-PA de cadena simple) y un aumento de la actividad de la enzima madura (t-PA de doble cadena) en presencia de fibrina. De este modo la introducción de por lo menos un aminoácido de la tríada - o de los aminoácidos que asumen la función correspondiente en la tríada - lleva a un aumento de la zimogeneidad del t-PA (relación entre la actividad de la enzima madura y la actividad de la pro-enzima) con un aumento claro de la especificidad por la fibrina, por interacción conformativa entre los restos de  
50 aminoácidos introducidos y/o los restos de aminoácidos de la secuencia de tipo salvaje.

Así se conoce que la mutagénesis del t-PA nativo lleva a la sustitución del Phe305 a His (F305H) así como de Ala 292 a Ser (A292S) a un aumento de 20 veces de la zimogeneidad, mientras que ya con la variante F305H sola se logra un aumento de 5 veces (EL Madison, Kobe A, Gething M-J, Sambrook JF, Goldsmith EJ 1993: Converting  
55 Tissue Plasminogen Activator to a Zymogen: A regulatory Triad of Asp-HisSer; Science: 262, 419-421). Estos mutantes de t-PA muestran, en presencia de fibrina un aumento de la actividad de 30.000 veces (F305H) o de 130.000 veces (F305H, A292S). Ambos mutantes presentan adicionalmente una sustitución de Arg275 a R275E,

para evitar una separación del t-PA de una sola cadena a la forma de doble cadena en el sitio de corte y empalme Arg275-I1e276 por plasmina. Sólo este mutante R275E aumenta la especificidad por fibrina del t-PA 6.900 veces (K Tachias, Madison EL 1995: Variants of Tissue-type Plasminógeno Activator Which Display Substantially Enhanced Stimulation by Fibrin, en: Journal of Biological Chemistry 270, 31: 1831918322).

- 5 Las posiciones 305 y 292 del t-PA son homólogas a las posiciones His40 y Ser32 de la tríada conocida de las serinaproteasas quimotripticas. Por medio de la sustitución correspondiente con histidina o serina estos aminoácidos pueden interactuar con el aspartato477 del t-PA, de modo que la tríada conocida puede ser formada funcionalmente en los mutantes de t-PA (Madison et al 1993).

- 10 Estos mutantes de t-PA pueden ser usados para el tratamiento del accidente cerebrovascular, ya que en base a su mayor especificidad por fibrina no presentan neurotoxicidad -o en comparación con el t-PA de tipo salvaje- sólo presentan una reducida neurotoxicidad. A los fines de la divulgación de los mutantes t-PA mencionados F305H; F305H, A292S solos o en combinación con R275E se hace referencia a su totalidad a las publicaciones de Madison et al. 1993 y Tachias y Madison 1995.

- 15 El aumento de la especificidad por fibrina de los activadores del plasminógeno es alternativamente igualmente posible por una mutación puntual del Asp194 (o un aspartato en una posición homóloga). Los activadores del plasminógeno pertenecen al grupo de las serinaproteasas de la familia de la quimotripsina y presentan, en forma concordante, el aminoácido Asp194 conservado, el que es responsable de la estabilidad de la conformación catalíticamente activa de las proteasas maduras. Es conocido que el Asp194 interactúa en los zimógenos de las serinaproteasas con el His40. Por una separación activadora del zimógeno se hacen imposibles estas interacciones, y la cadena lateral del Asp194 rota aprox. 170°, para formar a continuación un nuevo puente de sal con el I1e16. Este puente de sal participa de la estabilidad de la bolsa de oxianiones de la tríada catalítica de la serinaproteasa madura. También se encuentra en el t-PA.

- 25 Una mutación puntual del Asp194 hace imposible en primer lugar la formación o la estabilidad de la conformación catalítica de las serinaproteasas. Igualmente los activadores del plasminógeno mutados, en presencia de su co-factor fibrina -justo también en comparación con la forma de tipo salvaje madura- posibilitan un aumento claro de la actividad, el que sólo se puede explicar porque las interacciones con fibrina permiten una modificación de la conformación que posibilita la actividad catalítica (L Strandberg, Madison EL, 1995: Variants of Tissue-type Plasminógeno Activator with Substantially Enhanced Response and Selectivity towards Fibrin Co-factors. en: Journal of Biological Chemistry 270, 40: 2344-23449). De este modo los mutantes de Asp194 de los activadores del plasminógeno muestran un gran aumento de la actividad en presencia de fibrina, el que posibilita su uso como activador del plasminógeno no neurotóxico.

- 30 Un ejemplo preferido para un activador del plasminógeno no neurotóxico de este tipo representa el t-PA, cuyo Asp194 está sustituido por glutamato (D1 94E) o asparagina (D194N). De este modo se reduce, en presencia de fibrina, la actividad de t-PA por un factor de 1-2000, mientras que en cambio en presencia de fibrina se puede alcanzar un aumento de la actividad por el factor de 498.000 a 1.050.000. Estos mutantes pueden contener además una sustitución de Arg15 a R1 5E, que evita la separación del t-PA de una sola cadena al t-PA de cadena doble en la unión de péptidos Arg15-I1e16 por plasmina. Por esta mutación solamente se aumenta la activación del t-PA por fibrina ya por el factor 12.000. A los fines de la divulgación de las mutaciones en las posiciones 194 y 15 del t-PA se hace referencia a la publicación de von Strandberg y Madison 1995 en su totalidad.

- 35 Un aumento de la dependencia de fibrina de los activadores del plasminógeno se puede alcanzar además a través de la introducción de las mutaciones puntuales en el así llamado "bucle de autólisis". Este tramo de aminoácido es conocido de la tripsina; pero también se encuentra como tramo homólogo en la las serina proteasas y está caracterizado especialmente por tres aminoácidos hidrófobos (Leu, Pro y Phe). El bucle de autólisis en los activadores del plasminógeno es responsable de la interacción con el plasminógeno. Las mutaciones puntuales en este campo pueden llevar a que las interacciones proteína/proteína entre plasminógeno y activador del plasminógeno ya no puedan ser formadas más funcionalmente. Estas mutaciones sólo son relevantes funcionalmente en ausencia de fibrina. En presencia de fibrina en cambio son responsables del aumento de la actividad de los activadores del plasminógeno (K Song-Hua, Tachias K, Lamba D, Bode W, madison EL, 1997: Identification of a Hydrophobic exocite on Tissue Type Plasminogen Activator That Modulates Specificity for Plasminogen. En: Journal of Biological Chemistry 272; 3, 181-1816).

- 40 En una forma preferida, se usa un t-PA con mutaciones puntuales en las posiciones 420-423. Si estos restos son substituidos por mutaciones puntuales, aumenta la dependencia de fibrina del t-PA por un factor de hasta 61.000 (K Song-Hua et al.). Song-Hua et al. investigaron las mutaciones puntuales L420A, L420E, S421 G, S421 E, P422A, P422G, P422E, F423A y F423E. Se hace referencia aquí a la publicación en su totalidad para el uso de acuerdo con la invención.

- 55 En otra forma de realización ventajosa se usa activador del plasminógeno tisular modificado con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 (Fig. 13), el que se diferencia del t-PA de tipo salvaje porque se realiza un intercambio de los aminoácidos hidrófobos en las posiciones 420 - 423 en el bucle de autólisis, las que están ocupadas como sigue: His420, Asp421, A1a422 y Cys423. Este t-PA presenta preferentemente una fenilalanina en

la posición 194. Además la posición 275 puede estar ocupada por un glutamato. Ventajosamente, la posición 194 está ocupada por fenilalanina.

Además se puede usar una uroquinasa modificada. Esta uroquinasa puede presentar la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID No. 2 (Fig. 14), en la cual los aminoácidos hidrófobos del bucle de autólisis están substituidos por Va1420, Thr421, Asp422 y Ser423. Ventajosamente, esta uroquinasa aporta un Ile275 así como un Glu194. Esta mutante muestra, en comparación con la uroquinasa de tipo salvaje, una especificidad por fibrina aumentada 500 veces.

Ambos mutantes -tanto la uroquinasa como también el t-PA- se investigaron en tests semicuantitativos y dieron por resultado una especificidad por fibrina aumentada en comparación con el t-PA de tipo salvaje.

b) Activador del plasminógeno de *Desmodus rotundus* (DSPA)

Un gran aumento de la actividad en presencia de fibrina -a saber, un aumento de 100.000 veces- muestra además también el activador del plasminógeno (DSPA) de la saliva del vampiro común (*Desmodus rotundus*), el que se puede usar por lo tanto como activador del plasminógeno no neurotóxico. Bajo el concepto DSPA están comprendidas cuatro proteasas diferentes, las que satisfacen la necesidad básica del vampiro común, a saber, la duración prolongada del sangrado de las heridas provocadas por estos animales en sus presas (Cartwright, 1974). Estas cuatro proteasas (DSPA $\alpha_1$ , DSPA $\alpha_2$ , DSPA $\beta$ , DSPA $\gamma$ ) presentan de manera concordante una alta similitud (homología) con el t-PA humano. Igualmente presentan actividades fisiológicas similares o concordantes, que justifican que estén comprendidas en el concepto superior DSPA. El DSPA es el objeto de la EP 0 352 119 A1 así como de la patente US 6 008 019 y 5 830 849 a la que de este modo se hace referencia en su totalidad a los fines de la divulgación.

DSPA $\alpha_1$  es la proteasa más investigada de este grupo. Presenta una secuencia de aminoácidos con una homología de más de 72% con respecto a la secuencia de aminoácidos del t-PA humano conocido (Kratzschmar et al., 1991). No obstante existen entre t-PA y DSPA dos diferencias substanciales. En primer lugar, el DSPA como cadena simple representa a diferencia de los substratos peptídicos, una molécula completamente activa, la que no puede ser convertida en una forma de doble cadena -como el t-PA- (Gardell et al, 1989; Kratzschmar et al., 1991). En segundo lugar, la actividad catalítica del DSPA muestra una diferencia casi absoluta de la fibrina (Gardell et al., 1989; Bringmann et al., 1995; Toschi et al., 1998). Así, por ejemplo, se aumenta la actividad de la DSPA $\alpha_1$  en presencia de fibrina en 100.000 veces, mientras que la actividad de t-PA sólo aumenta aprox. 550 veces. La actividad de DSPA en cambio es substancialmente mucho menos reducida por el fibrinógeno; experimenta sólo un aumento de 7 a 9 veces (Bringmann et al., 1995). DSPA es por lo tanto mucho más dependiente de la fibrina y específico de la fibrina que el t-PA de tipo salvaje, que sólo es activado aprox. 550 veces por la fibrina.

Debido a sus propiedades fibrinolíticas y a la gran similitud con el t-PA, el DSPA representa un candidato interesante para el desarrollo de un trombolítico. En base a la participación del t-PA en la neurotoxicidad dependiente del glutamato existen por lo tanto esperanzas fundadas de usar un activador del plasminógeno estrechamente emparentado con el t-PA en forma exitosa para el tratamiento del accidente cerebrovascular agudo.

Pero se ha mostrado ahora sorprendentemente, que el DSPA, a pesar de su gran similitud (homología) con el t-PA y a pesar de la amplia concordancia de su efecto fisiológico con respecto al t-PA, a diferencia de éste no presenta efectos neurotóxicos. Con esta determinación se obtiene inmediatamente el conocimiento de que el DSPA se puede hacer entonces como trombolítico para la terapia del accidente cerebrovascular, sin que con ello esté asociado un riesgo adicional de daño del tejido neuronal. Esto significa especialmente que el DSPA se puede usar también después de tres horas del comienzo de los síntomas en el accidente cerebrovascular.

Demostración experimental de la ausencia de neurotoxicidad de DSPA

Los hallazgos con respecto a la ausencia de neurotoxicidad de estos activadores del plasminógeno se basa substancialmente en investigaciones comparativas *in vivo* de la acción neurodegenerativa del t-PA por un lado y del DSPA por otro lado, los que se realizaron con ayuda del así llamado "modelo del ácido kaínico" así como de un modelo para la investigación de la lesión inducida por NMDA del cuerpo estriado.

El modelo del ácido kaínico (también denominado modelo de lesión del ácido kaínico) se basa en que se estimula la cascada neurotóxica del glutamato por la aplicación de ácido kaínico (KA) externo como agonista del receptor de glutamato del tipo de ácido kaínico (tipo KA) así como de los receptores de glutamato NMDA y AMPA. Por la utilización de una cepa de ratones con deficiencia de t-PA como modelo experimental se pudo demostrar que la sensibilidad de los animales de ensayo con respecto al ácido kaínico sólo alcanzaba el nivel del ratón de tipo salvaje con una administración adicional de t-PA externo. En cambio, una infusión de una concentración equimolar de DSPA bajo las mismas condiciones experimentales no podía restablecer la sensibilidad con respecto al ácido kaínico (KA). Los efectos del t-PA no podían ser substituidos por lo tanto por el DSPA. Una síntesis de estos resultados se representa en la Fig. 15 (Tabla 1).

Las investigaciones cuantitativas en este modelo mostraron que aún un aumento de 10 veces de la concentración de DSPA no podía restablecer la sensibilidad de los ratones con deficiencia de t-PA contra el tratamiento de KA,

mientras que ya una concentración de t-PA 10 veces menor producía daños tisulares inducidos por KA. De aquí se deduce que el DSPA en la estimulación de la neurodegeneración después del tratamiento con KA presenta una actividad por lo menos 100 veces menor que el t-PA (ver también Figs. 11 y 12).

5 En el segundo modelo de neurodegeneración se compararon los posibles efectos del t-PA así como del DSPA sobre la estimulación de la neurodegeneración dependiente de NMDA en ratones de tipo salvaje. Para ello se inyectó a ratones de tipo salvaje NMDA (como agonista del receptor de glutamato del tipo NMDA) solo o en combinación con t-PA o DSPA. Este modelo permite la investigación del efecto de estas proteasas bajo condiciones, bajo las cuales se produce desde ya una neurodegeneración y en base a la destrucción de la barrera hematoencefálica causa un ingreso de proteínas plasmáticas (Chen et al., 1999).

10 En trabajos realizados con este modelo, la inyección de NMDA llevó a lesiones reproducibles en el cuerpo estriado de los ratones. El volumen de estas lesiones fue aumentado por una inyección común de t-PA y NMDA en por lo menos el 50%. En cambio una coinyección con DSPA $\alpha$ 1 no llevó a un aumento del tamaño de las lesiones causadas por la inyección de NMDA. Incluso en presencia de proteínas plasmáticas, las que como consecuencia de la neurodegeneración dependiente de NMDA se podían difundir en la zona de la lesión, el DSPA no llevó a un  
15 aumento de la neurodegeneración. Un resumen de estos resultados se representa en la Fig. 16 (Tabla 2).

Primeros resultados de estudios clínicos muestran la transmisibilidad de esos resultados también al tratamiento del accidente cerebrovascular en el ser humano. Así en pacientes después de una perfusión exitosa se puede determinar una clara mejoría de 8 puntos NIHSS o HHS resultados 0 - 1). Esto se puede observar en la Fig. 17 (Tabla 3).

20 En otro experimento se examinó si el t-PA y el DSPA en aplicación intravenosa podían traspasar la barrera hematoencefálica dañada y aumentar las lesiones tisulares en el cerebro. Para ello se inyectó a ratones para provocar lesiones tisulares en el cuerpo estriado estereotácticamente NMDA y 6 y 24 horas después de la inyección se aplicó el NMDA t-PA o el DSPA en forma intravenosa. En comparación con un control negativo los animales del ensayo mostraron con una infusión de t-PA 24 horas después de la inyección de NMDA un aumento de aprox. 30%  
25 de la zona de tejido dañada por la inyección de NMDA, mientras que DSPA no causó un aumento similar del daño tisular, aunque su ingreso en la zona de tejido dañada pudo ser demostrada por medio de una coloración de anticuerpos (ver Figs. 18, 19). Con una aplicación intravenosa correspondiente de t-PA o DSPA 6 hs después de la inyección de NMDA aún no se pudo determinar un aumento de la zona de tejido dañada. Esto se debe probablemente a que la barrera hematoencefálica en este momento de la aplicación de t-PA o DSPA aún no tenía una función barrera suficiente.  
30

Estos resultados muestran que el DSPA en el sistema nervioso central de un mamífero -es decir, también del ser humano- representa una proteasa substancialmente inerte y -a diferencia de t-PA- no causa un aumento de la neurotoxicidad inducida por KA o NMDA. Esta falta de neurotoxicidad hace que el DSPA contra las expectativas, sea un trombolítico adecuado para el tratamiento del accidente cerebrovascular agudo.

35 **Potencial terapéutico de los activadores del plasminógeno no neurotóxicos**

Debido a la falta de neurotoxicidad del DSPA así como de los otros activadores del plasminógeno no neurotóxicos (ver más arriba) resulta como una ventaja especial para el tratamiento del accidente cerebrovascular el hecho de que el uso de estos activadores del plasminógeno -a diferencia del t-PA de tipo salvaje- no está limitado solamente a la estrecha ventana de tiempo de hasta tres horas después del comienzo del accidente cerebrovascular. Más bien,  
40 el tratamiento también puede ser realizado en un momento posterior -es decir, también después de seis horas o más tarde aún-, sin que exista -como con el t-PA- un riesgo de estimulación de la excitotoxicidad. Primeras investigaciones clínicas con el DSPA sostienen incluso el tratamiento sin inconvenientes de pacientes en un período de tiempo de más de seis hasta nueve horas después del comienzo de los síntomas.

45 Esta opción de tratamiento temporalmente ilimitada con activadores del plasminógeno no neurotóxicos es tan importante porque por primera vez es posible un tratamiento de los pacientes con accidente cerebrovascular agudo sin inconvenientes, en los cuales no podía determinar con suficiente seguridad el comienzo del accidente cerebrovascular. Este grupo de pacientes se había excluido hasta ahora por prevención y evaluación del riesgo de trombólisis con los activadores del plasminógeno. De este modo desaparece una contraindicación substancial para el uso admisible de un trombolítico en el caso de un accidente cerebrovascular.

50 **Aplicación de activadores del plasminógeno**

A diferencia del producto terapéutico rt-PA ya establecido para el accidente cerebrovascular no se encuentran aún hallazgos seguros sobre una posible forma de administración para el tratamiento del accidente cerebrovascular con los activadores del plasminógeno no neurotóxicos.

55 El objeto de la invención es por lo tanto proveer una forma de administración ventajosa para estos activadores del plasminógeno no neurotóxicos.

De acuerdo con la invención, los activadores del plasminógeno, cuya actividad se aumenta en presencia de fibrina



en más de 650 veces, se aplica para el tratamiento del accidente cerebrovascular en forma intravenosa.

5 La administración intravenosa de estos activadores del plasminógeno no neurotóxicos para el tratamiento del accidente cerebrovascular ya ha sido confirmada en ensayos clínicos, en los cuales el DSPA -como ejemplo para este grupo de fibrinolíticos- se administró a los pacientes en forma intravenosa y sólo causó pocos efectos colaterales.

Estos resultados de los estudios clínicos eran inesperados, ya que se conocía que la aplicación intravenosa de t-PA y otros fibrinolíticos usuales está asociada con un alto riesgo de hemorragia cerebral (ver más arriba).

10 Para disminuir la hemorragia intracerebral se desarrollaron hace poco estrategias para aplicar estas sustancias no en forma intravenosa, sino en forma intraarterial a través de un catéter directamente cerca del trombo intravascular. Existen experiencias al respecto con la uroquinasa producida en forma recombinante (PROCAT como estudio con pro-uroquinasa). Como esta forma de administración permite una clara reducción de la dosis total, se obtiene de esta manera una disminución de los efectos colaterales dependientes de la dosis -es decir, también de las hemorragias cerebrales-.

15 A las importantes ventajas de la aplicación intraarterial se les contraponen sin embargo dos posibles desventajas. Por un lado presupone una preparación del paciente que insume mucho tiempo, la que para el tratamiento del accidente cerebrovascular dentro de la ventana de tiempo disponible de sólo 3 horas no es posible. Por otro lado se puede lograr con ésta una dosis total más baja. Localmente llega sin embargo una concentración más alta del producto terapéutico en los vasos terminales arteriales. Debido a que la función de barrera del endotelio vascular está dañada por causa de un accidente cerebrovascular, el producto terapéutico llega por lo tanto también localmente en altas concentraciones a los tejidos circundantes. Allí puede causar entonces efectos colaterales indeseados.

20 En la aplicación intravenosa, en cambio, la concentración del producto terapéutico es diluida por la corriente de sangre venosa. De este modo la inyección intraarterial con productos terapéuticos que dañan los tejidos, como el t-PA, es problemática (Forth, Henschler, Rummel, Starke: "Pharmakologie und Toxikologie", 6ta. Edición, 1992, pág. 29).

25 Las limitaciones que dificultan la aplicación intraarterial debido a la estrecha ventana de tiempo y el efecto colateral de daño a los tejidos no se presentan con los activadores del plasminógeno usados de acuerdo con la invención. De este modo, la aplicación intraarterial, debido a sus indiscutibles ventajas (ver más arriba) representa básicamente una forma de administración muy prometedora para los activadores del plasminógeno no neurotóxicos. Se consideraba por lo tanto seguir este camino en la búsqueda de una forma de administración ventajosa de estos productos terapéuticos.

Igualmente, la solicitante utilizó la aplicación intravenosa más bien problemática para los activadores del plasminógeno no neurotóxicos, la que demostró ser sorprendentemente ventajosa.

35 Con la forma de administración de acuerdo con la invención se aparta además de una práctica terapéutica usual, en la cual las proteínas con un elevado potencial inmunogénico en general son aplicadas en forma intramuscular o a través de una inyección por goteo intravenosa. De esta manera se posibilita reducir el riesgo de un shock alérgico (Mebs: "Gifftiere", 2da. Edición, 2000).

40 Los activadores del plasminógeno usados de acuerdo con la invención son -a diferencia del t-PA propio del cuerpo o bien proteínas extrañas de origen animal (ver, por ejemplo, DSPA) o proteínas propias del cuerpo modificadas genéticamente, las que presentan epitopos novedosos debido a sus modificaciones estructurales. La problemática de reacciones alérgicas asociada con esto -especialmente con la administración de altas dosis terapéuticas, como se requieren usualmente para la aplicación intravenosa- se presenta también con otros fibrinolíticos compuestos por proteínas extrañas, como por ejemplo, estreptoquinasa.

45 En una forma de realización especialmente ventajosa se administran los activadores del plasminógeno usados de acuerdo con la invención a través de una inyección de un bolo (inyección rápida intravenosa), la que también se puede administrar como inyección rápida intravenosa con toda la dosis terapéutica.

50 En el marco de estudios clínicos se determinó que también la administración intravenosa de dosis terapéuticas sorprendentemente bajas producen resultados ventajosos. Los resultados terapéuticos preferidos se obtuvieron para ello, por ejemplo, con dosificaciones entre 90 pg/kg y 230 pg/kg. Las dosis terapéuticas especialmente ventajosas se encontraban en el rango de 62,5 a 90 pg/kg. En los pacientes estudiados, el período de tiempo entre el accidente cerebrovascular y la administración del producto terapéutico se encontraba entre 3 y 9 horas. Por medio de métodos de estudio adecuados se pudo calcular la aparición del efecto terapéutico (ver Figuras 20 a 29).

55 El DSPA así como los otros activadores del plasminógeno no neurotóxicos no presentan efectos colaterales neurotóxicos. Igualmente puede ser ventajoso administrarlos para el tratamiento del accidente cerebrovascular en combinación con un neuroprotector, para limitar así en lo posible el daño tisular causado por el glutamato propio del cuerpo. Para ello pueden servir los neuroprotectores inhibidores en forma competitiva o no competitiva del receptor

de glutamato. Combinaciones razonables son posibles, por ejemplo, con los conocidos inhibidores de los receptores de glutamato del tipo NMDA, del tipo de ácido kaínico o del tipo Quisqualat, así por ejemplo, con APV, APH, fenciclidina, MK-801, dextrorfanano o cetamina.

5 Igualmente puede ser ventajosa una combinación con cationes, ya que los cationes, especialmente los iones de Zn, bloquean el canal de cationes regulado por el receptor de glutamato y así pueden reducir los efectos neurotóxicos.

10 En otra forma de realización ventajosa, los activadores del plasminógeno no neurotóxicos pueden ser combinados con por lo menos otro producto terapéutico o con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Es especialmente ventajosa la combinación con un producto terapéutico, el que mediante la vitalización de las células ayuda a evitar el daño tisular, aporta a una regeneración del tejido ya dañado o sirve para evitar otros accidentes cerebrovasculares. Pueden ser ventajosas, por ejemplo, las combinaciones con antibióticos como quinonas, anticoagulantes como heparina o hirudina, así como con citicolina o aspirina.

También puede ser ventajosa una combinación con por lo menos un inhibidor de trombina. Ventajosamente pueden usarse, trombomodulina, análogos de trombomodulina, como por ejemplo, solulina, triabina o pallidipina. También son ventajosas las combinaciones con sustancias antiinflamatorias que influyen sobre la infiltración de leucocitos.

15 A continuación se explicará el tipo de aplicación o forma de administración de acuerdo con la invención en base a ejemplos terapéuticos concretos.

### Ejemplos terapéuticos

Estudios comparativos de T-PA y DSPA

#### A. Métodos

#### 20 1. Animales

Ratones de tipo salvaje (c57/Black 6) y ratones con deficiencia de t-PA (ratones t-PA -/-) (c57/ Black 6) (Carmeliet et al., 1994) fueron puestos a disposición por el Dr. Peter Carmeliet, Leuven, Bélgica.

#### 2. Extracción de proteínas del tejido cerebral

25 La determinación de la actividad proteolítica en el tejido cerebral después de la infusión de t-PA o DSPA $\alpha$ 1 se realizó por medio de un análisis zimográfico (Granelli-Piperno y Reich, 1974). Después de una duración de infusión de 7 días en el hipocampo, se anestesiaron los ratones, a continuación se perfundieron transcardíacamente con PBS y se extirparon los cerebros. Se retiró la región del hipocampo, se colocaron en recipientes de Eppendorf y se incubaron con volúmenes iguales (p/v) (aprox. 30-50  $\mu$ l) con 0,5% NP-40 tampón de lisis sin inhibidores de proteasa (0,5% NP-40, 10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 10 mM de NaCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EDTA). Los extractos de cerebro fueron homogeneizados por medio de un homogeneizador de vidrio manual y se dejaron 30 min sobre hielo. Las muestras se centrifugaron luego y se retiró el sobrenadante. Se determinó la cantidad de proteína presente (reactivo Bio-Rad).

#### 3. Análisis zimográfico de las proteasas

35 La actividad proteolítica en las muestras o los extractos del tejido cerebral se determinó por análisis zimográfico según el procedimiento de Granelli-Piperno y Reich (1974). Las muestras de la proteína recombinante (hasta 100 nmoles) o del extracto del tejido cerebral (20  $\mu$ g) se sometieron a un SDS-PAGE al 10% bajo condiciones no reductoras. Los geles se retiraron de las placas, se lavaron durante dos horas en 1% Triton X100 y a continuación se colocaron en un gel de agarosa con fibrinógeno polimerizado y plasminógeno (Granelli-Piperno y Reich, 1974). Los geles se incubaron a 37°C en una cámara húmeda hasta que se pudieron reconocer zonas proteolizadas.

#### 40 4. Infusión intra-hipocampo de t-PA, DSPA e inyección subsiguiente de ácido kaínico

El modelo de lesiones por ácido kaínico se basa en la propuesta de Tsirka et al. (1995). Se inyectó a los animales en forma intraperitoneal (i.p.) atropina (4 mg/kg), luego se anestesiaron con una inyección i.p. de pentobarbital sódico (70 mg/kg). A continuación se colocaron en un marco estereotáctico, de modo que se podía implantar una bomba microosmótica (modelo Alzet 1007D, Alzet CA. USA) con 100  $\mu$ l de PBS o t-PA humano recombinante (0,12 mg/ml; 1,85  $\mu$ M) o DSPA $\alpha$ 1 (1,85  $\mu$ M) en forma subcutánea entre los omóplatos. Las bombas se unieron a través de tubitos estériles con una cánula del cerebro - y a través de una abertura del cráneo se colocaron en las coordenadas bregma -2,5 mm, midolateral 0,5 mm y dorsoventral 1,6 mm, para poder introducir el líquido cerca de la línea media. Las cánulas se pegaron a continuación en la posición deseada y se abrieron las bombas, para infundir las soluciones correspondientes a un caudal de 0,5  $\mu$ l por hora durante siete días.

50 Dos días después de la infusión de las proteasas se anestesiaron nuevamente los ratones y se introdujeron en el marco estereotáctico. Se inyectaron luego 1,5 nmoles de ácido kaínico en 0,3 gl de PBS en forma unilateral en el hipocampo. Las coordenadas eran: bregma 2,5 mm, medial-lateral 1,7 mm y dorsoventral 1,6 mm. La excitotoxina (KA) se suministró durante 30 seg. Después del tratamiento con ácido kaínico quedó la aguja otros 2 min en estas

coordenadas, para evitar un reflujo del líquido.

5. Examen del cerebro

5 Cinco días después de la inyección de KA se anestesiaron los animales y se les perfundieron transcardíacamente 30 ml de PBS, seguido por 70 ml de una solución de paraformaldehído al 4%, se fijaron durante 24 horas en el mismo fijador, seguido por una incubación en sacarosa al 30% durante otras 24 horas. Los cortes coronales (40 µm) del cerebro se cortaron a continuación en un micrótopo de congelación, se colorearon o bien con tionina (BDH, Australia) o se prepararon para el examen inmunohistoquímico.

6. Cuantificación de la tasa de pérdida neuronal dentro del hipocampo

10 La cuantificación de la pérdida neuronal en los subcampos del hipocampo CA1-CA3 se realizó como se describió más arriba (Tsirka et al. 1995; Tsirka et al. 1996). Se prepararon cinco secciones subsiguientes del hipocampo dorsal de todos los grupos tratados, en donde las secciones comprendían realmente el sitio de la inyección de KA y la zona de la lesión. Los subcampos del hipocampo (CA1-CA3) de estas secciones se siguieron por medio de dibujos de cámara lúcida del hipocampo. La longitud total de estos subcampos se midió en comparación con estándares de 1 mm, los que se siguieron con igual ampliación. Se calculó la longitud de las secciones de tejido con neuronas piramidales vitales (con morfología normal) y la longitud de las secciones de tejido sin neuronas (ninguna célula presente, ninguna coloración de tionina). Las longitudes que representaban las neuronas intactas y las pérdidas neuronales en la zona de cada subcampo del hipocampo, se promediaron entre las secciones y se determinó la desviación estándar.

7. Lesiones de excitotoxicidad de NMDA intraestriatal con o sin t-PA o DSPA

20 Se anestesiaron ratones de tipo salvaje (c57/Black6) y se colocaron en marcos estereotácticos (ver más arriba). Se administró luego a los ratones una inyección unilateral en el Stratum izquierdo con 50 nmoles de NMDA solo o en combinación con 46 µM rt-PA o 46 µM DSPAα1. Como control se inyectaron además t-PA y DSPAα1 solos en una concentración de 46 µM como controles. Las coordenadas de la inyección eran: bregma -0,4 mm, midolateral 2,0 mm y dorsoventral 2,5 mm. Las soluciones (1 µl de volumen total para todos los tratamientos) fueron transmitidas en un período de tiempo de 5 minutos a 0,2 µl/min, en donde la aguja permaneció otros 2 min después de la inyección en el sitio de la inyección, para minimizar el reflujo del líquido. Después de 24 horas se anestesiaron los ratones y se perfundieron transcardíacamente con 30 ml de PBS, seguido por 70 ml de una solución de paraformaldehído al 4%, una post-fijación durante 24 horas en el mismo fijador, seguido por una incubación en sacarosa al 30% durante otras 24 horas. Se cortaron cortes coronales (40 µm) en un micrótopo de congelación y se colocaron sobre portaobjetos recubiertos con gelatina.

8. Cuantificación del volumen de las lesiones después de la inyección de NMDA

35 La cuantificación del volumen de las lesiones estriatales se realizó en base al método descrito por Callaway et al. (2000). Para ello se prepararon 10 secciones coronales subsiguientes, que comprendían la zona del daño. La región dañada se visualizó en base al método de Callaway y se cuantificó el volumen de la lesión usando un dispositivo Micro Computer Imaging Device (MCID, Imaging Research Inc., Brock University, Ontario, Canadá).

9. Inmunohistoquímica

40 La inmunohistoquímica se realizó según métodos estándar. Secciones coronales fueron sumergidas en una solución de 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/10% de metanol durante 5 min, seguido por una incubación con 5% de suero de cabra normal durante 60 min. Los cortes se incubaron durante la noche o bien con un anticuerpo anti-GFAP (1:1.000; Dako, Carpinteria, Ca, USA) para la determinación de astrocitos, con un anticuerpo anti-MAC-1 (1:1.000; Serotec, Raleigh, NC, USA) para la determinación de microglías o anticuerpos policlonales antiDSPA (Schering AG, Berlín). Después del lavado se incubaron los cortes con los anticuerpos secundarios biotinilados correspondientes (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). A continuación se realizó una incubación en un complejo de avidina/biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 60 min antes de la coloración final con 3,3'-diaminobencidina/0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

45 Los cortes se pasaron luego a un portaobjetos recubierto con gelatina, se secaron, se deshidrataron y se taparon con permount.

10. Test con respecto al aumento de los daños tisulares inducidos por la inyección de NMDA por la aplicación intravenosa de t-PA y DSPA

50 Para la inducción de daños tisulares en el cuerpo estriado se inyectó a los ratones estereotácticamente NMDA. Seis horas después de la inyección de NMDA se aplicaron t-PA o DSPA (100 µl; 10 mg/kg) por una inyección en la vena de la cola. Como control negativo se inyectaron 100 µl de 0,9% NaCl y a continuación se infundió PBS. Después de otras 24 hs se sacrificaron los animales y se determinó la extensión del daño tisular neuronal. En un segundo ensayo se inyectó NMDA a grupos de prueba de hasta 15 ratones correspondientemente, se les infundió t-PA o DSPA 24 hs después de la inyección de NMDA i.V., y se determinó el aumento del daño tisular correspondientemente. Para la determinación del DSPA en el tejido cerebral se tiñeron los cortes coronales por medio de un anticuerpo Anti-DSPA según métodos estándar.

55

B. Resultados

1. La infusión de t-PA o DSPA se distribuye a través del hipocampo de ratones t-PA *-/-* y mantiene su actividad proteolítica

5 Los primeros ensayos fueron concebidos para confirmar que tanto el DSPA como el t-PA mantienen su actividad proteolítica durante los 7 días de la infusión. Para tal fin se incubaron alícuotas de t-PA y DSPA (100 nmoles) tanto a 37°C como también a 30°C durante siete días en un baño de agua. Para determinar la actividad proteolítica, se sometieron diluciones de las muestras de 5 veces seriadas a un SDS-PAGE con condiciones no reductoras y se midió la actividad proteolítica por análisis zimográficos. Se tomó como control en cada caso una alícuota de t-PA y DSPA, que había quedado congelada durante esos siete días. Como se puede ver de la **Figura 1**, hubo sólo poca pérdida de la actividad de DSPA o t-PA, tanto en la incubación a 25°C como también a 37°C durante este período de tiempo.

2. La actividad de t-PA y DSPA también se puede encontrar en los extractos de hipocampo de ratones t-PA *-/-* después de la infusión

15 Primero debe determinarse si las proteasas administradas con la infusión se encontraban presentes en el cerebro de los animales tratados y si mantenía allí su actividad proteolítica. Para ello ratones t-PA *-/-* recibieron durante siete días infusiones con t-PA o DSPA (ver más arriba). Los ratones fueron sacrificados a continuación por perfusión transcardíaca con PBS, y se extrajeron los cerebros. Las regiones ipsilaterales y contralaterales del hipocampo fueron aisladas, igualmente una región del cerebelo (como control negativo). Muestras de tejido (20 µg) fueron sometidas a un SDS-PAGE y un análisis zimográfico según la descripción en la parte de métodos. Como se puede ver de la Figura 2, se midieron tanto actividades t-PA como también DSPA en la zona ipsilateral del hipocampo, en donde además se midió un poco de actividad en el lado contralateral. Esto demostró que las proteasas infundidas no sólo mantienen su actividad en el cerebro, sino que además se habían ampliado en la región del hipocampo. En el control no se determinó ninguna actividad en el extracto preparado del cerebelo.

3. Determinación inmunohistoquímica de DSPA

25 Para determinar que el DSPA se había extendido realmente sobre la región del hipocampo, se analizaron inmunohistoquímicamente secciones de cerebro coronales de ratones t-PA *-/-*, después de la infusión con DSPA. Se determinó así un antígeno de DSPA en la región del hipocampo, en donde la región circundante del sitio de la infusión presentaba la mayor coloración. Este resultado confirma que el DSPA infundido es soluble y realmente se encuentra en el hipocampo.

30 4. La infusión de DSPA no restaura la sensibilidad con respecto a la neurodegeneración dependiente del ácido kaínico *in vivo*

35 Los ratones t-PA *-/-* son resistentes con respecto a la neurodegeneración dependiente del ácido kaínico. En cambio una infusión de t-PA en el hipocampo lleva a una restauración completa de la sensibilidad con respecto al daño dependiente del ácido kaínico. Para responder a la pregunta, si el DSPA puede reemplazar al t-PA en este efecto, se administraron a los ratones t-PA *-/-* por medio de una bomba miniosmótica infusiones con t-PA o DSPA en el hipocampo. Para ambos grupos se usaron 12 ratones. Dos días después los animales recibieron inyecciones de ácido kaínico en una fase de descanso subsiguiente. Cinco días después se sacrificaron los animales. Se extrajeron los cerebros y se procesaron (ver más arriba). Como controles se infundió a los ratones t-PA *-/-* PBS antes del tratamiento con KA (n = 3).

40 Se prepararon cortes de cerebro coronales y se detectaron las neuronas por la coloración según Nissl. Resultó evidente que los ratones t-PA *-/-* después de la infusión de PBS eran resistentes con respecto a KA. Las infusiones con t-PA recombinante llevaron en cambio a una restauración de la sensibilidad con respecto al tratamiento con KA. En cambio la infusión de la misma concentración de DSPA en la región del hipocampo no modificó la sensibilidad de estos animales con respecto a KA (ver Figs. 4a y 4b).

45 Se realizó una cuantificación de estos resultados usando 12 ratones en cada grupo. En 2 de los 12 ratones a los que se infundió DSPA observamos algunas neurodegeneraciones reducidas. El motivo de esto aún no está claro y posiblemente es independiente de la presencia de DSPA. Los datos combinados consideran el reducido efecto que se observó en estos dos animales. Los 12 ratones tratados con t-PA eran sensibles con respecto al tratamiento con KA. Estos resultados muestran que con una infusión de t-PA o DSPAa1 en concentraciones equimolares sólo la administración de t-PA lleva a una restauración de la sensibilidad con respecto a la neurodegeneración inducida por KA.

5. La infusión de DSPA no causa activación de las microglías

55 La restauración de la sensibilidad a KA de ratones t-PA *-/-* después de la infusión de t-PA da por resultado una activación de las microglías (Rogove et al., 1999). Para determinar la medida de la activación de las microglías después de la infusión de t-PA- o DSPA y el tratamiento subsiguiente con KA, se sometieron cortes coronales de los ratones a una coloración inmunohistoquímica para células microglías activadas usando el anticuerpo Mac-1. La

restauración de la sensibilidad a KA después de la infusión de t-PA dio por resultado un claro aumento de las células positivas a Mac-1. Esto no se observó en los ratones que habían recibido infusiones con DSPA. De este modo la presencia de DSPA no lleva a una activación de las células microglías después del tratamiento con KA.

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

5 La concentración de t-PA, que se usó para la infusión, se basaba en la concentración descrita por Tsirka et al (1995) (100  $\mu$ l de 0,12 mg/ml [1,85  $\mu$ M]. Repetimos los experimentos con carga de KA usando una cantidad de t-PA 10 veces más baja (0,185  $\mu$ M) y una cantidad mayor de DSPA (18,5  $\mu$ M). La concentración más baja de t-PA aún podía restaurar la sensibilidad con respecto al tratamiento con KA (n=3). Era especialmente interesante que la infusión de la concentración de DSPA 10 veces mayor sólo causó una pérdida neuronal reducida después del tratamiento con KA. Estos datos indican claramente que el DSPA no aumenta la sensibilidad con respecto a KA.

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

Los efectos de t-PA y DSPA se estudiaron además en un modelo de la neurodegeneración en ratones de tipo salvaje. La inyección de t-PA en el cuerpo estriado de estos ratones lleva a un aumento de los efectos neurodegenerativos provocados por el NMDA análogo del glutamato (Nicole et al., 2001).

15 Para ello se administraron inyecciones de NMDA con un volumen total de 1  $\mu$ l en la región del cuerpo estriado de ratones de tipo salvaje en presencia de t-PA o DSPA (46 gM en cada caso). Después de 24 horas se extrajeron los cerebros y se cuantificó el tamaño de las lesiones según el método de Callaway (Callaway et al., 2000) (ver más arriba). Como se puede ver en la Figura 7, la inyección de NMDA sola provocó una lesión reproducible en todos los ratones tratados (n=4). Si se inyectaban en cambio t-PA y NMDA juntos, entonces aumentaba el tamaño de las lesiones alrededor de 50% (P<0,01, n=4). Por el contrario, la coinyección de NMDA y la misma concentración de DSPA, no provocó ningún aumento del tamaño de la lesión, a diferencia de NMDA sola.

20 Las inyecciones de t-PA o DSPA solas no llevaron a una neurodegeneración detectable. La falta de efecto de t-PA en el caso de una administración individual es consistente con los resultados de Nicole et al. (2001). Estos datos muestran que la presencia de DSPA, no aumenta adicionalmente la neurodegeneración incluso durante un proceso neurodegenerativo.

25 Para confirmar que la inyección de DSPA realmente se extendió en la región del hipocampo, se realizaron estudios inmunohistoquímicos en secciones coronales usando el anticuerpo de DSPA. Los estudios muestran que el DSPA realmente había ingresado en la región estriatal.

#### Análisis cinético de la activación del plasminógeno por el test del cromógeno indirecto

30 Los tests de cromógeno indirecto de la actividad t-PA utilizan los substratos LysPlasminogen (American Diagnostica) y Spectrozyme PL (American Diagnostics) y se realizaron según 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 así como Madison E.L., Goldsmith E.J., Gething M.J., Sambrook J.F. y Gerard R.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 21423-21426. Los tests se realizaron tanto en presencia como en ausencia del co-factor DESAFIB (American Diagnostica). DESAFIB, un preparado de monómeros de fibrina solubles, se obtuvo por medio de la escisión de fibrinógeno humano de alta pureza mediante la proteasa batroxobina. La batroxobina escinde la unión Arg<sup>16</sup>-Gly<sup>17</sup> en la cadena A $\alpha$  del fibrinógeno y libera entonces el fibrinopéptido A. El resultante del AA-fibrinógeno en forma de monómeros de fibrina I es soluble en presencia del péptido Gly-Pro-Arg-Pro. La concentración del Lys-Plasminógeno varió en presencia de DESAFIB de 0,0125 hasta 0,2  $\mu$ M, en ausencia del co-factor de 0,9 hasta 16 pM.

#### Tests de cromógeno Indirectos en presencia de diversos simuladores

45 Los tests estándar de cromógenos indirectos se realizaron como se menciona en las publicaciones citadas más arriba. Para ello se usaron mezclas de 100  $\mu$ l de volumen total con 0,25-1 ng de enzima, 0,2  $\mu$ M de Lys-plasminógeno y 0,62 mM de Spectrozym PL. Los tests se realizaron en presencia de o bien tampón, 25  $\mu$ g/ml de DESAFIB, 100  $\mu$ g/ml de fragmentos de bromuro de cianógeno de fibrinógeno (American Diagnostica) o 100  $\mu$ g/ml del péptido P368 de 13 aminoácidos estimulador. Los análisis se realizaron en placas de microtitulación y se midió la densidad óptica a 405 nm de longitud de onda durante 1 h cada 30 seg en un "Molecular Devices Thermomax". La temperatura de reacción era de 37 °C.

#### 8. DSPA no provoca tampoco con la aplicación intravenosa un aumento del daño tisular neuronal

50 Por la inyección de NMDA se indujeron daños tisulares en el cuerpo estriado de ratones y 6 y 24 horas después se aplicó t-PA o DSPA en forma intravenosa. En comparación con un control negativo los animales de ensayo mostraron con una infusión i.v. de t-PA, 24 horas después de la inyección de NMDA un aumento de aprox. 30% de la zona del tejido dañada por la inyección de NMDA, mientras que el DSPA no causó un aumento del daño tisular de este tipo (ver Fig. 18). Por medio de la coloración de las secciones coronales con un anticuerpo anti-DSPA se pudo determinar que el DSPA aplicado en forma intravenosa 24 horas después de la inyección de NMDA había ingresado

en las zonas del tejido dañadas (ver Fig. 19). Con una aplicación intravenosa correspondiente de t-PA o DSPA, 6 hs después de la inyección de NMDA aún no se había determinado un aumento de la zona de tejido dañada: esto se debe probablemente a que la barrera hematoencefálica en este momento de la aplicación de t-PA o DSPA aún tenía una función de barrera suficiente. El DSPA no presenta por lo tanto, aún con la aplicación intravenosa, ningún efecto colateral neurotóxico.

### Referencias

- Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kyel ER. 1998. El activador del plasminógeno tisular contribuye a la fase tardía de LTP y al crecimiento sináptico en la vía de las fibras musgosas del hipocampo. *Neuron* 21:813-25.
- Bringmann P, Gruber D, Liese A, Toschi L, Kratzchmar J, Schleuning WD, Donner P. 1995. Características estructurales que median la selectividad de fibrina de activadores del plasminógeno del vampiro común. *J. Biol Chem* 270:25596-25603.
- Callaway JK, Knight MJ, Watkins DJ, Beart PM, Jarrott B, Delaney PM. 2000. Un nuevo método computarizado, rápido, para la cuantificación del daño neuronal en un modelo de rata de accidente cerebrovascular. *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. Consecuencias fisiológicas de pérdida de la función del gen activador del plasminógeno en ratones. *Nature* 368: 419-424.
- Cartwright T. 1974. El activador de plasminógeno de la saliva del vampiro común. *Blood* 43:317-326.
- Chen ZL, Strickland S. 1997. Muerte neuronal en el hipocampo es promovida por la degradación catalizada por plasmina de laminina. *Cell* 91:917-925.
- Chen, Z-L, Indyk, J.A., Bugge, T.H., Kombrinck, K.W., y Strickland S. 1999. Muerte neuronal y degradación de la barrera hematoencefálica después de una lesión excitotóxica son procesos independientes. *J. Neuroscience* 19:9813-9820.
- Frey U, Muller M, Kuhl D. 1996. Una forma diferente de potenciación de duración prolongada revelada en ratones con mutante de activador de plasminógeno tisular. *J Neurosci* 16:2057-2063.
- Gardell SJ, Duong LT, Diehl RE, York JD, Hare TR, Register RB, Jacobs JW, Dixon RA, Friedman PA. 1989. Aislamiento, caracterización y clonación de cADN de un activador del plasminógeno de la saliva del vampiro común. *J Biol Chem* 264:17947-17952.
- Gardell SJ, Ramjit DR, Stabilito II, Fujita T, Lynch JJ, Cuca GC, Jain D, Wang SP, Tung JS, Mark GE, et al. 1991. Trombólisis efectiva sin plasminemia marcada después de la administración intravenosa de activador de plasminógeno de la saliva del vampiro común en conejos. *Circulation* 84:244-253.
- Granelli-Piperno, A y Reich, E. 1974. Un estudio de proteasas y complejos inhibidores de proteasas en fluidos biológicos. *J. Exp. Med.* 148: 223-234.
- Huang W, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kyel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P. 1996. Ratones que no tienen el gen que codifica el activador del plasminógeno tipo tisular muestran una interferencia selectiva con la potenciación de largo plazo de la fase tardía en las vías colateral de Schaffer y de fibras musgosas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8699-8704.
- Kratzschmar J, Haendler B, Langer G, Boidol W, Bringmann P, Alagon A, Donner P, Schleuning WD. 1991. La familia del activador de plasminógeno de la glándula salival del vampiro común *Desmodus rotundus*: clonación y expresión. *Gene* 105:229-237.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD. (1999). Potenciación aumentada de largo plazo del hipocampo y aprendizaje por expresión neuronal aumentada del activador del plasminógeno tipo tisular en ratones transgénicos. *EMBO J.*18:3007-3012.
- Mellott MJ, Stabilito II, Holahan MA, Cuca GC, Wang S, Li P, Barrett JS, Lynch JJ, Gardell SJ. 1992. El activador del plasminógeno de la saliva del vampiro común promueve una reperusión rápida y sostenida de la activación del plasminógeno sistémico en un modelo canino de trombosis arterial. *Arterioscler. Thromb.* 12:212-221.
- Muschick, P., Zeggert D., Donner, P., Witt, W. 1993. Propiedades trombolíticas del activador del plasminógeno de *Desmodus* (vampiro común) DSPA $\alpha$ 1, Alteplase y estreptoquinasa después de una inyección de bolo intravenosa en un modelo de conejo de trombólisis de la arteria carótida. *Fibrinolysis* 7: 284-290.
- Muller, C.M., Griesinger, C.B. 1998. El activador del plasminógeno tisular media en la plasticidad de oclusión inversa

- en la corteza visual. *Nature Neuroscience*. 1: 4753.
- National Institute of Neurological Disorders y stroke rt-PA study group. 1995. *New. Engl. J. Med.* 333:1581-1587
- 5 Nicole, O., Docagne, F., Ali, C., Margail, I., Carmeliet, P., MacKenzie, E.T., Vivien, D. & Buisson, A. (2001). La actividad proteolítica del activador del plasminógeno tisular aumenta la señalización mediada por el receptor de NMDA. *Nat Med* 7, 59-64.
- Rogove AD, Siao C, Keyt B, Strickland S, Tsirka SE. 1999. La activación de las microglías revela una función citoquina no proteolítica para el activador del plasminógeno tisular en el sistema nervioso central. *J Cell Sci* 112:4007-4016.
- 10 Schleuning WD, Alagon A, Boidol W, Bringmann P, Petri T, Kratzschmar J, Haendler B, Langer G, Baldus B, Witt W, et al. 1992. Activadores del plasminógeno de la saliva de *Desmodus rotundus* (vampiro común): especificidad por fibrina única. *Ann N Y Acad Sci* 667:395-403.
- Seeds, N.W., Williams, B.L., Bickford, P.C. 1995. Inducción del activador del plasminógeno tisular en neuronas de purkinje después del aprendizaje motor cerebelar. *Science*. 270:1992-1994.
- 15 Stewart RJ, Fredenburgh JC, Weitz JI. 1998. Caracterización de las interacciones del plasminógeno y el tejido y los activadores del plasminógeno del vampiro común con fibrinógeno, fibrina, y el complejo de D-dímero unido en forma no covalente con el fragmento E. *J Biol Chem* 273:18292-18299.
- Traynelis, SF, Lipton, SA. 2001. ¿El activador del plasminógeno tisular es un riesgo para las neuronas? *Nature Medicine*, 7:17-18.
- 20 Toschi L, Bringmann P, Petri T, Donner P, Schleuning WD. 1998. Selectividad por fibrina de los dominios de proteasa aislados de tipo tisular y activadores del plasminógeno de la glándula salival del vampiro común. *Eur J Biochem* 252:108-112.
- Tsirka SE, Gualyris A, Amaral DG, Strickland S. 1995. Degeneración neuronal inducida por excitotoxina y convulsiones son mediadas por el activador del plasminógeno tisular. *Nature*. 377:340-344.
- Tsirka, S., Rogove, A. D., y Strickland, S. 1996. Muerte celular neuronal y tPA. *Nature* 384: 123-124
- 25 Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. 1997. Una cascada proteolítica extracelular promueve la degeneración neuronal en el hipocampo del ratón. *J Neurosci* 17:543-552
- Tsirka SE, Bugge TH, Degen JL, Strickland S. 1997. Muerte neuronal en el sistema nervioso central demuestra un sustrato no de fibrina para plasmina. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9779-9781.
- 30 Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. 1998. El activador del plasminógeno tisular (tPA) aumenta el daño neuronal después de una isquemia cerebral focal en ratones de tipo salvaje y con deficiencia de tPA. *Nat Med*. 4:228231
- Walker JB, Nesheim ME. 2001. Un análisis cinético de las actividades del activador del plasminógeno tisular y del cofactor DSPAlfa1 de productos de degradación de fibrina no tratados y tratados con TAFIa de diverso tamaño. *J Biol Chem* 276:3138-3148.
- 35 Witt W, Maass B, Baldus B, Hildebrand M, Donner P, Schleuning WD. 1994. Trombólisis coronaria con activador del plasminógeno salival de *Desmodus* en perros. Recanalización rápida y persistente por administración por bolo intravenoso. *Circulation*. 90:421-426.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de DSPA $\alpha$ 1 para la preparación de un producto terapéutico para la aplicación intravenosa para el tratamiento del accidente cerebrovascular en el ser humano después de transcurridas tres horas desde el comienzo del accidente cerebrovascular, **caracterizado por** una dosificación entre 62,5 y 230 pg/kg.
- 5 2. Uso de DSPA $\alpha$ 1 de acuerdo con la reivindicación 1, para el tratamiento terapéutico del accidente cerebrovascular en el ser humano después de transcurridas seis horas desde el comienzo del accidente cerebrovascular.
3. Uso de DSPA $\alpha$ 1 de acuerdo con la reivindicación 1, para el tratamiento terapéutico del accidente cerebrovascular en el ser humano después de transcurridas nueve horas desde el comienzo del accidente cerebrovascular.
- 10 4. Uso de DSPA $\alpha$ 1 de acuerdo con la reivindicación 1, para el tratamiento terapéutico del accidente cerebrovascular en el ser humano entre tres horas y nueve horas desde el comienzo del accidente cerebrovascular.
5. Uso de DSPA $\alpha$ 1 de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por** una infusión por goteo.
6. Uso de DSPA $\alpha$ 1 de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por** una inyección de un bolo.
- 15 7. Uso de DSPA $\alpha$ 1 de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por** una inyección de un bolo individual (*single Bolus*).



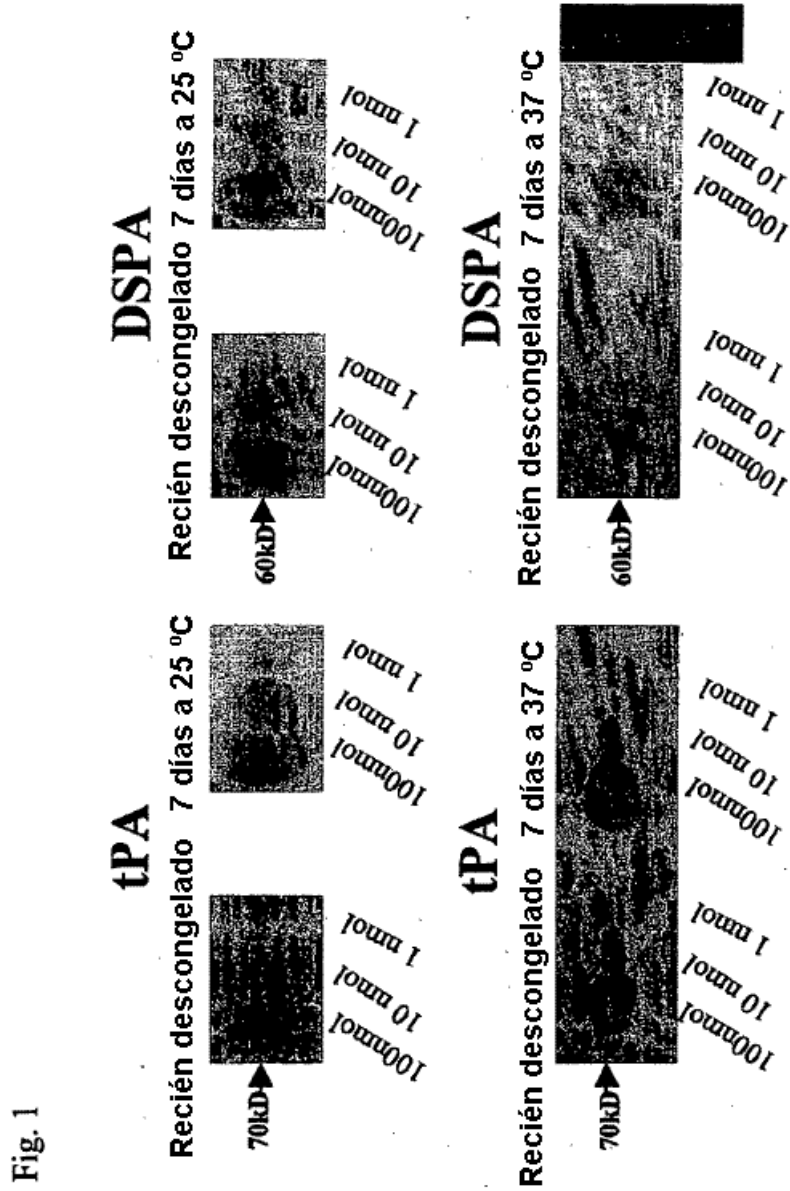


Fig. 1

Fig. 2

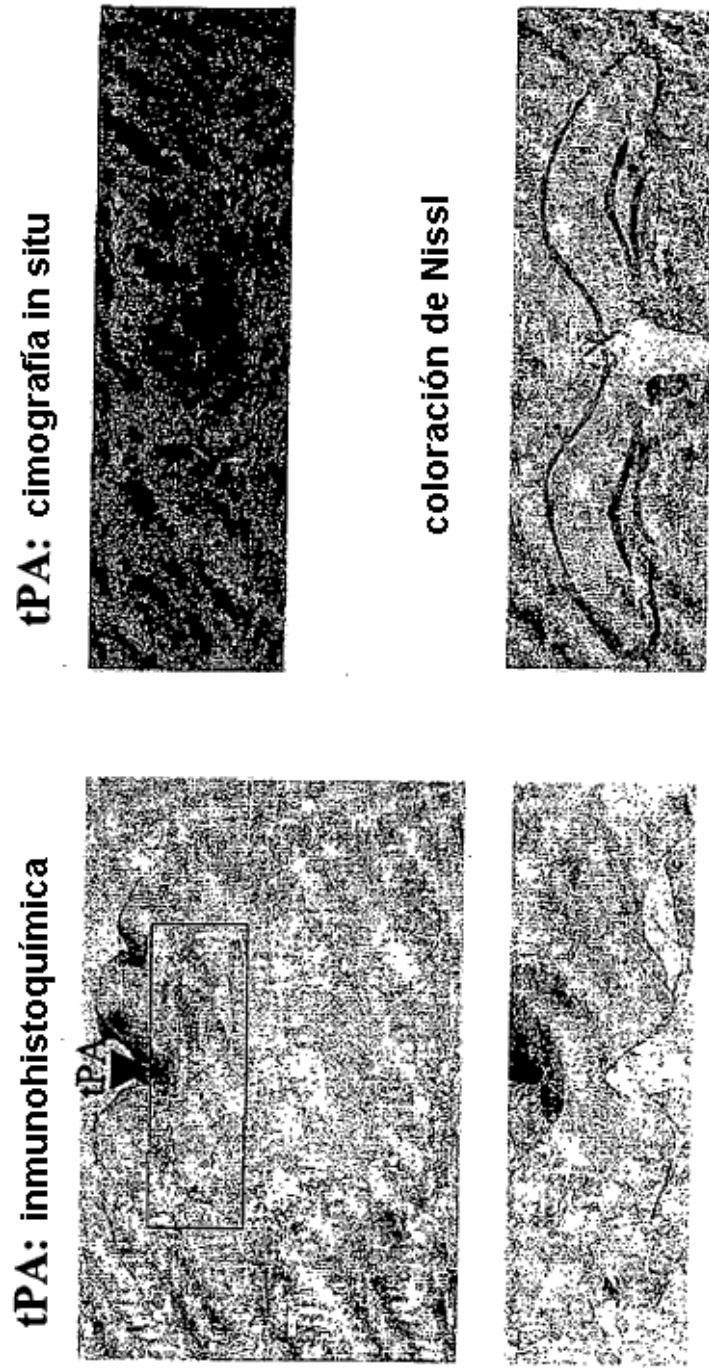


Fig. 4a

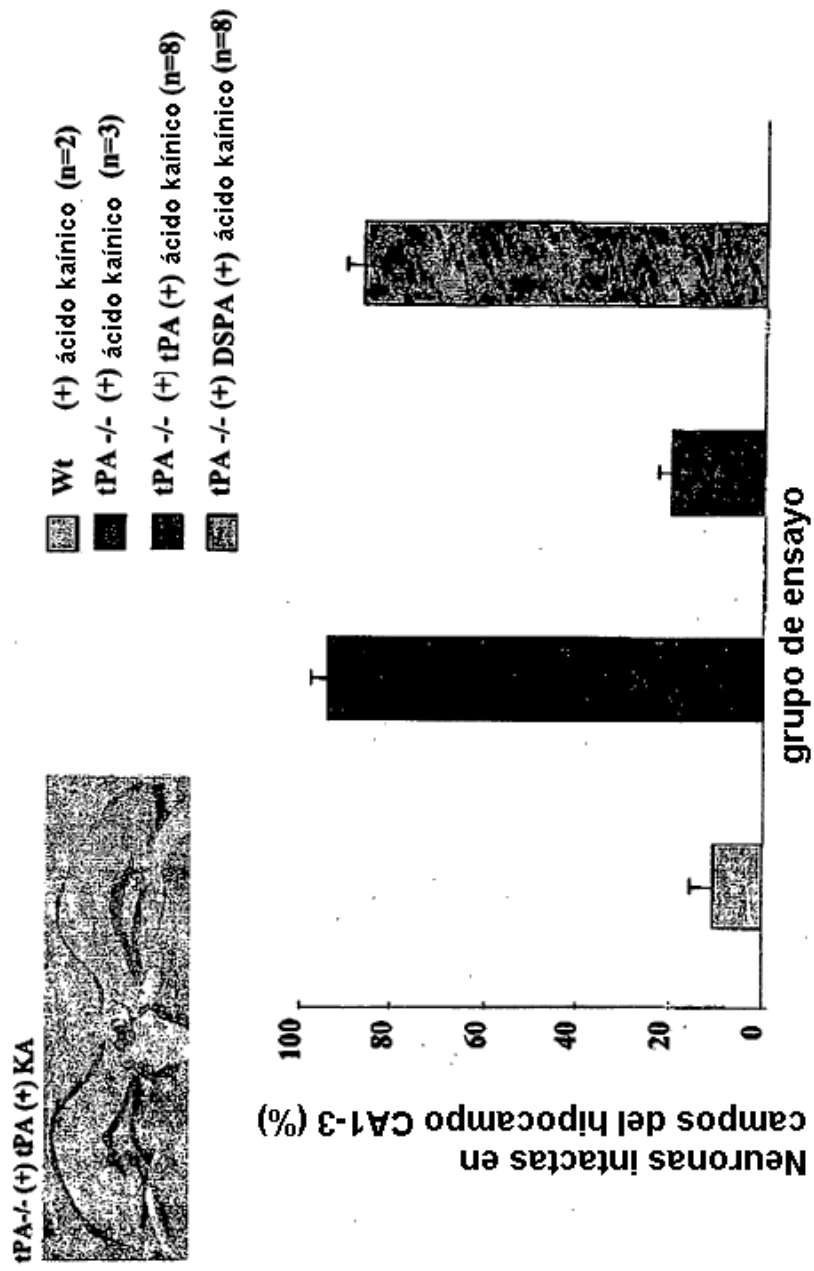
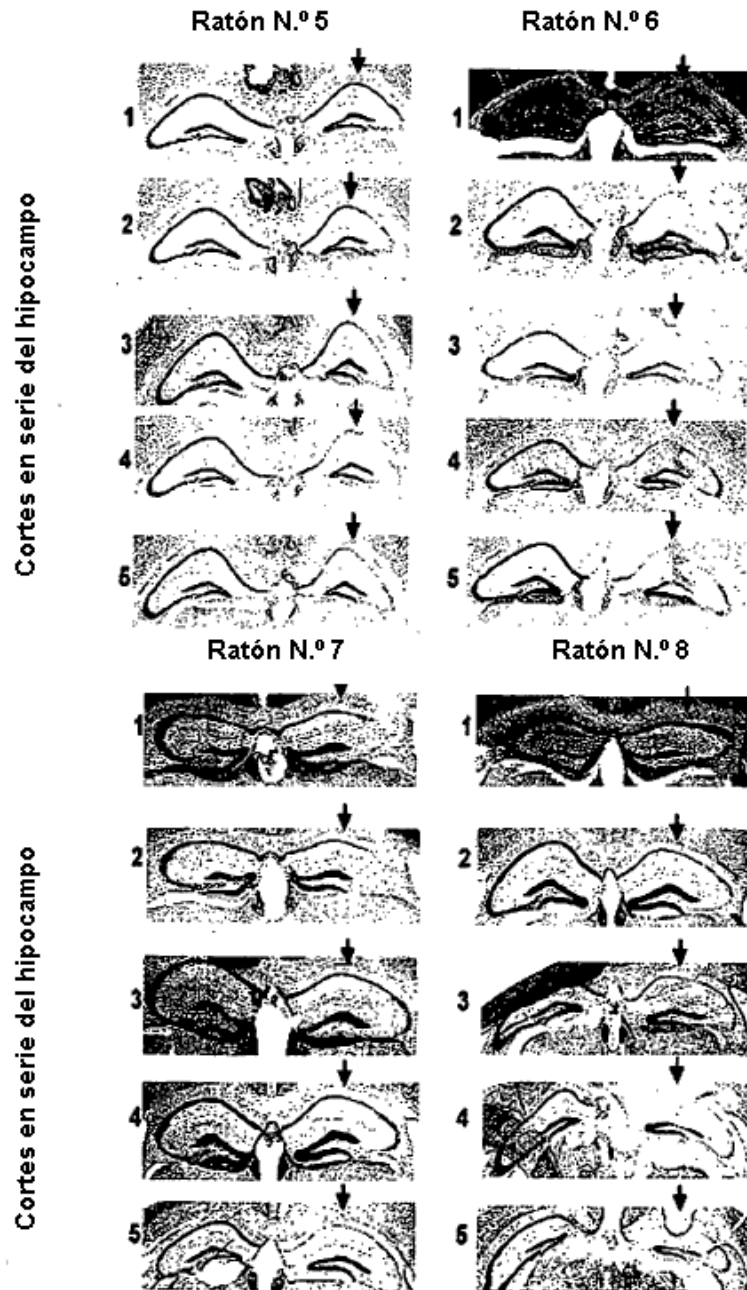
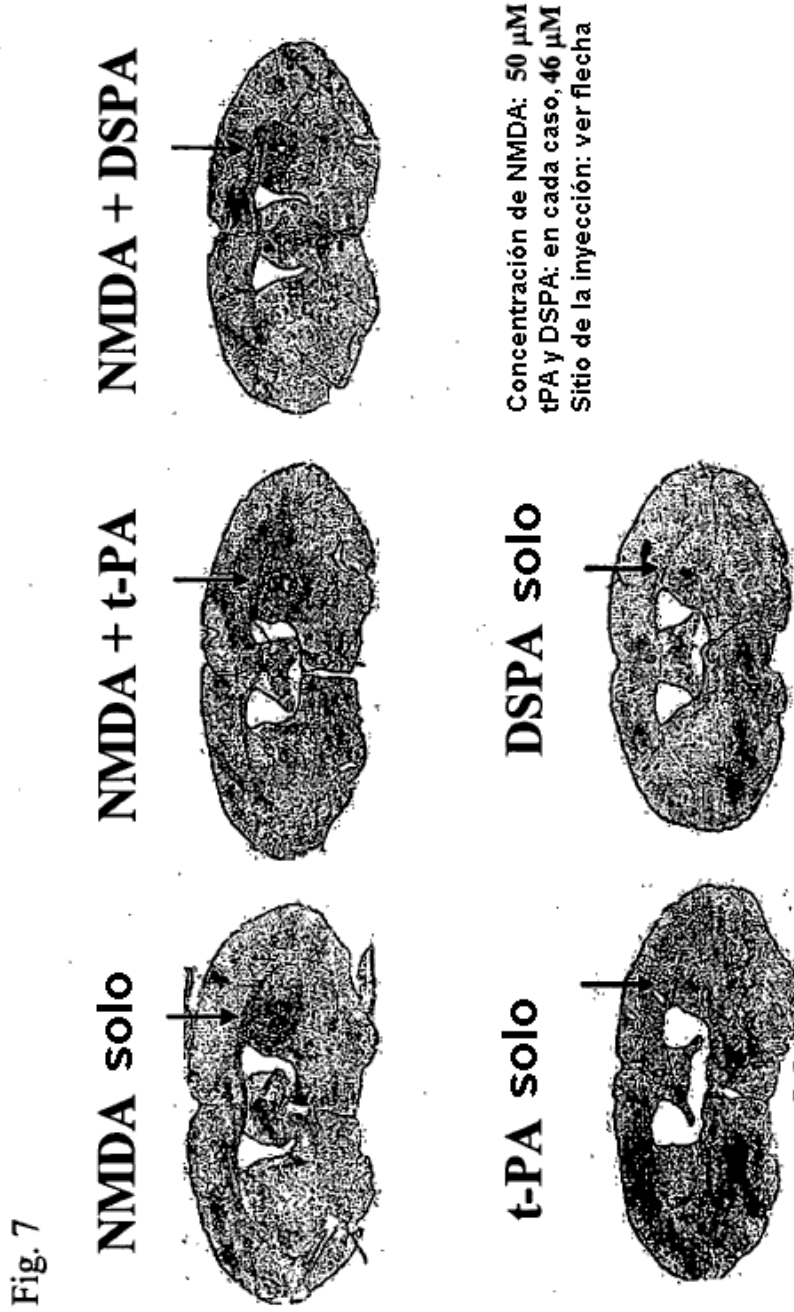


Fig. 4b

**Ratones tPA  $-/-$ : infusión de tPA, seguido de inyección de ácido kaínico (↓)**





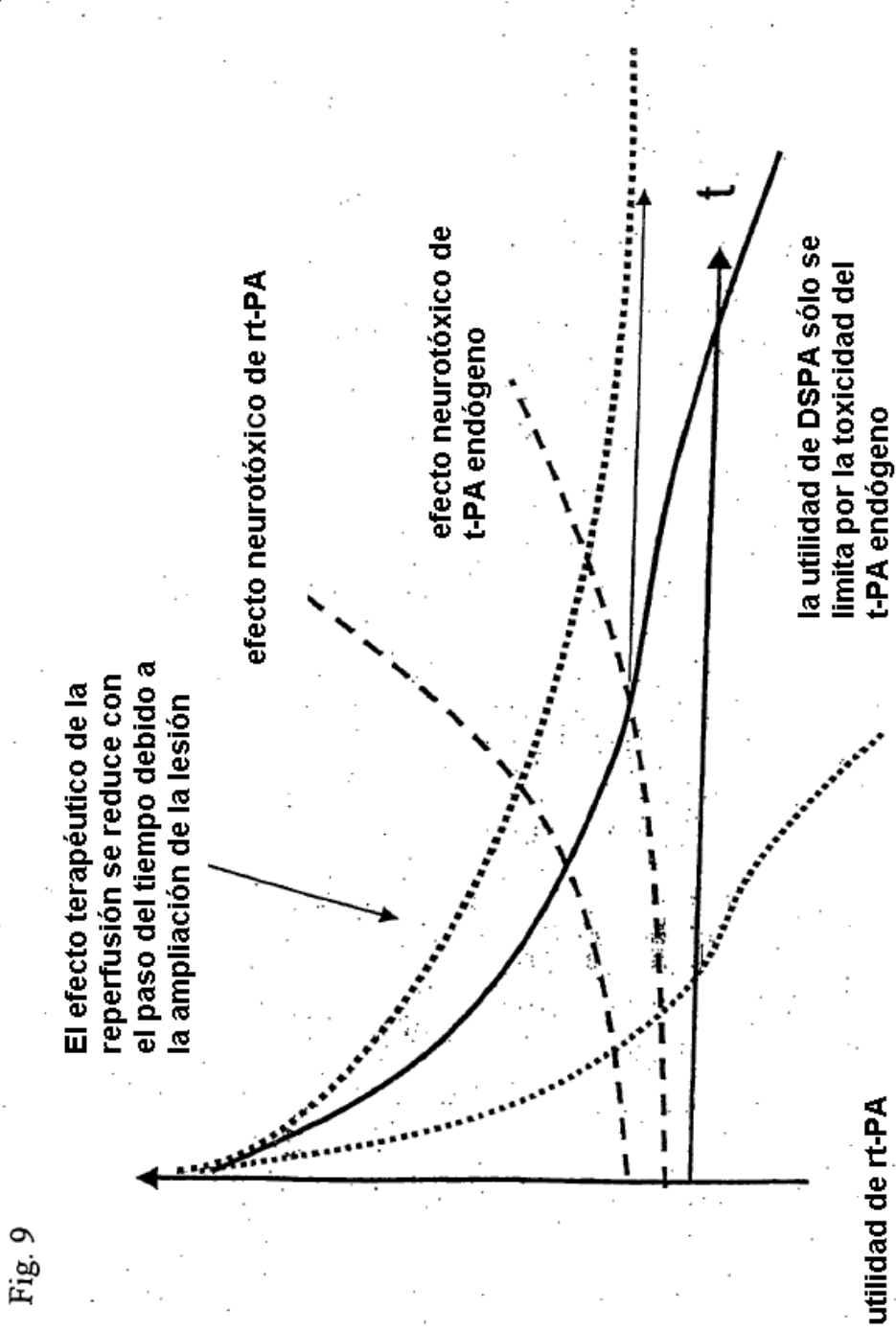
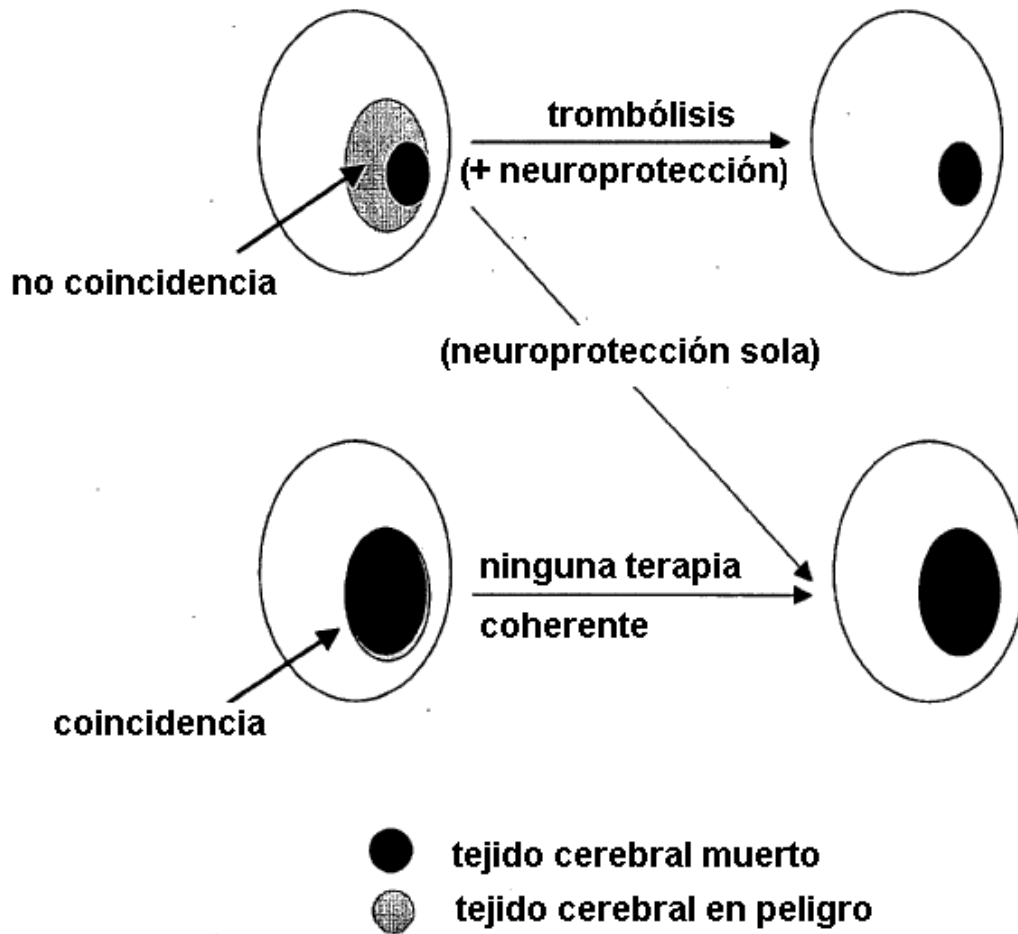
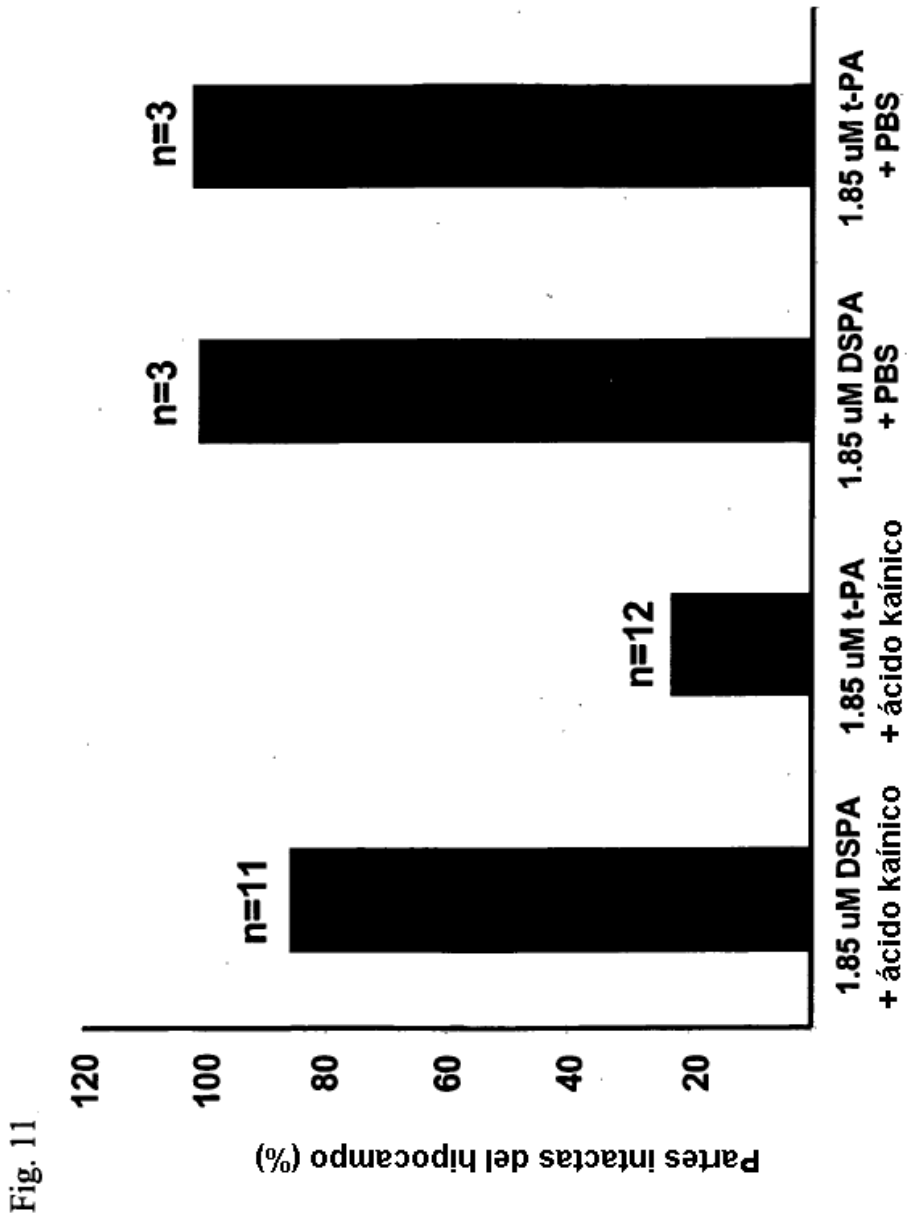


Fig. 9

Fig. 10 **Tejido rescatable como condición para un tratamiento exitoso**







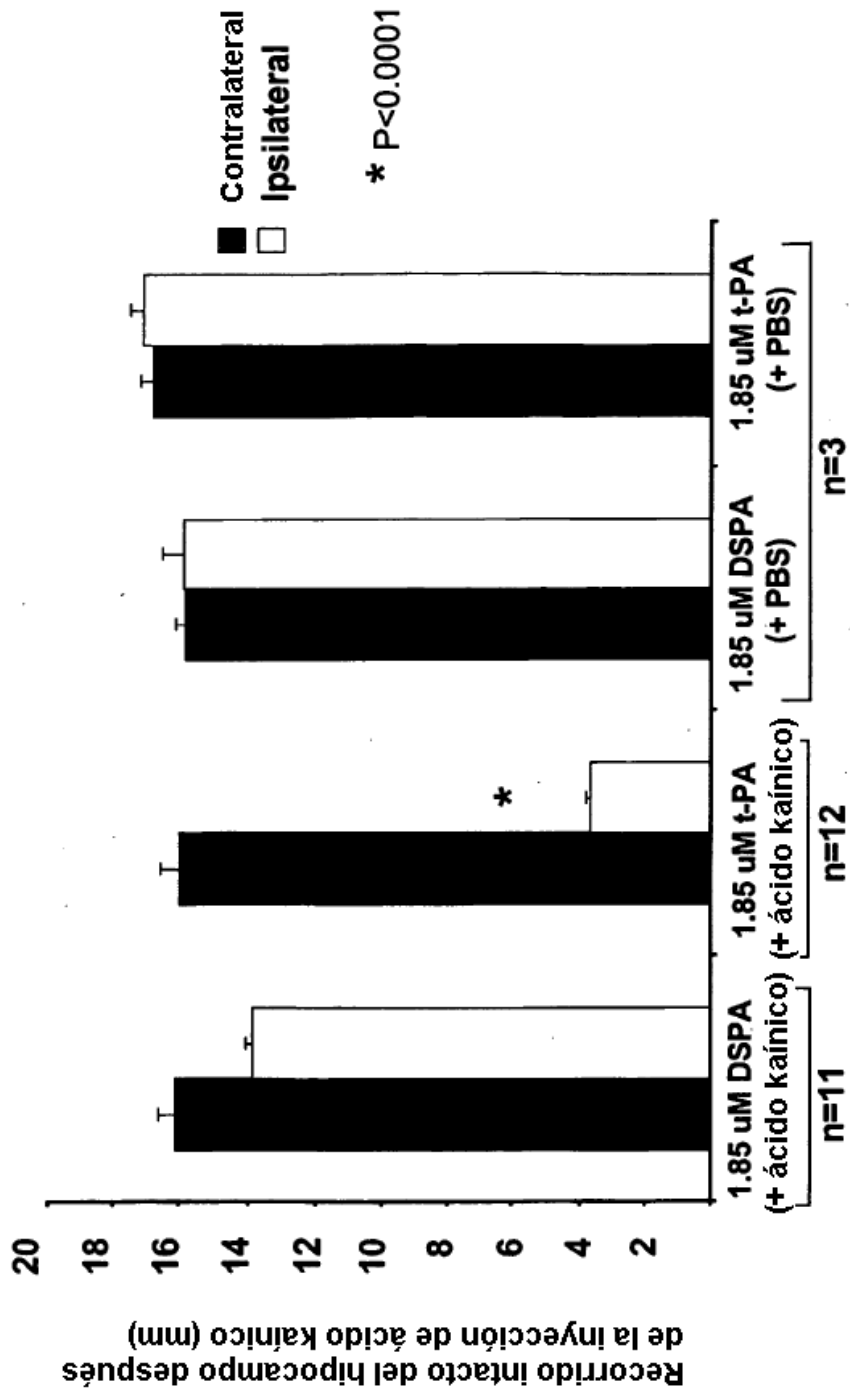


Fig. 12

Fig. 13

SEQ. ID Nr. 2

1 MVNTMKTKLL CVLLLCGAVF SLPRQETYRQ LARGSRAYGV ACKDEITQMT  
 51 YRRQESWLRP EVRSKRVEHC QCDRGSNELH QVPSNSCDEP RCLNGGTCVS  
 101 NKYFSIHCWN CPKKFGGQHC EIDKSKTCYE GNGHFYRGKA STDTMGRPCL  
 151 FWNSATVLQQ TYHAHRSDAL QLGLGKHNYC RNPDRRRRPW CYVQVGLKPL  
 201 VQECMVHDCA DFQCGQKTLR BPRFHSTGGE FTTIENQPWF AAIYRRHRGG  
 251 SGVTYVCGGS LMSPCWVISA THCFIDYPPK EDYIVYLGRS RLNSNTQGEM  
 301 KFEVENLILH KDYSADTHHN DIALLKIRSK EGRCAQPSRT IQTICLPSMY  
 351 NDPQFGTSCE ITGFGKENST DYLYPEQLKM TVVKLISHRE CQQPHYYGSE  
 401 VTTKMLCAAD PQWKEIYPNV TDSCQGDSSG PLVCSLQGRM TLTGIVSWGR  
 451 GCALKDKPGV YTRVSHFLPW IRSHTKL

Fig. 14

SEQ. ID Nr. 1

1 MVNTMKTKLL CVLLLCGAVF SLPRQETYRQ LARGSRAYGV ACKDEITQMT  
 51 YRRQESWLRP EVRSKRVEHC QCDRGQARCH TVPVKSCSEP RCFNGGTCQQ  
 101 ALYFSDFVCO CPEGFAGKCC BIDTRATCYE DQGISYRGTW STAESGAECT  
 151 NWNSSALAQK PYSGRRPDAI RLGLGNHNYC RNPDRDSKPW CYVFKAGKYS  
 201 SEFCSTPACS STCGLRQYSQ PQFHSTGGLF ADIASHPWQA AIFAKHRRSP  
 251 GERFLCGGIL ISSCWILSAA HCFQERFPPH HLTVILGRTY RVVPGEETEQK  
 301 FEVEKYIVHK EFDDDTYDND IALLQLKSDS SRCAQESSV RTVCLPPADL  
 351 QLPDWTECEL SGYGKHEALS PFYSERLKEA HVRLYPSSRC TSOHLLNRTV  
 401 TDNMLCAGDT RSGGPQANLH DACQGDSSGP LVCLNDGRMT LVGIISWGLG  
 451 CGQKDVPGVY TKVTNYLDWI RDNMRP

Fig. 15 (Tabla 1)

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

5 \* P &lt; 0,0001

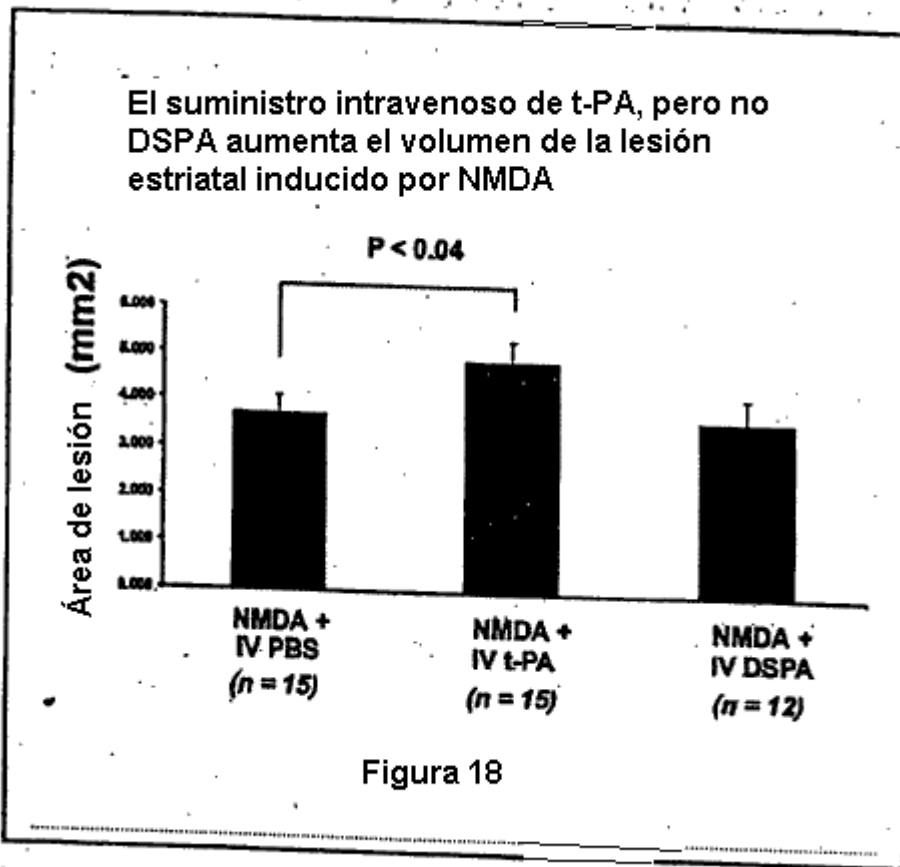
Fig. 16 (Tabla 2)

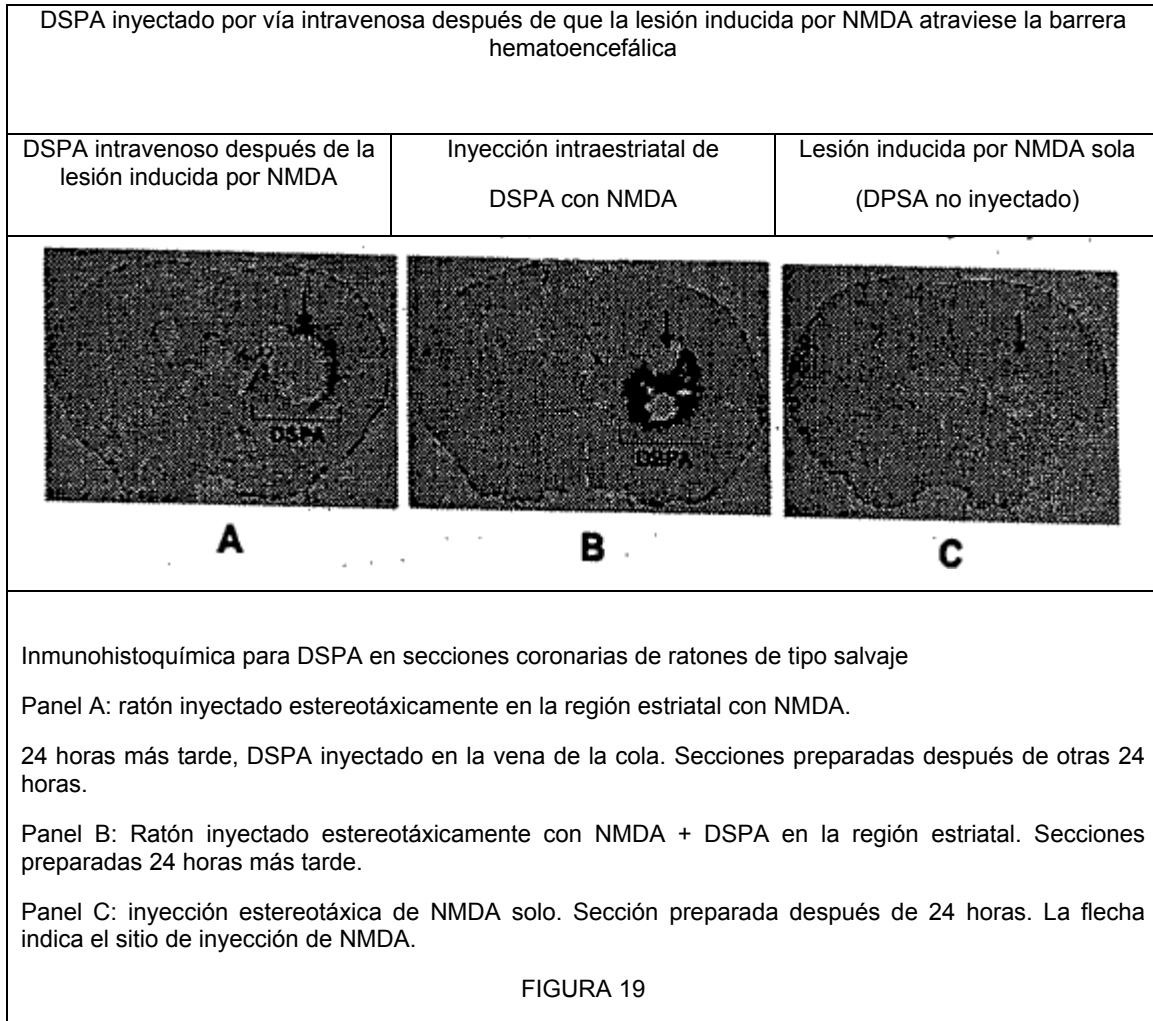
Grupo de tratamiento	Cantidad de ratones de tipo salvaje	Volumen medio de lesión (mm <sup>3</sup> ) (SEM)
NMDA solo	8	1.85 (0.246)
NMDA + t-PA	8	3.987 (0.293) *
NMDA + DSPA	8	1.656 (0.094) **
t-PA solo	3	0.20 (0.011)
DSPA solo	3	0.185 (0.016)

} \* P < 0.0001

Fig. 17 (Tab. 3)

Paciente	NIHSS					sAEs
	Línea base	Postrat.	Día 7	Día 30	Día 90	
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	*	*	
1007	14	6	*	*	*	
2001	19	20	—	—	—	ICH, muerte
2002	15	21	—	—	—	ICH, muerte
3001	8	7	6	5	*	
3002	15	16	9	8	*	
3003	10	19	21	*	—	muerte día 39





5 Abajo figuran los datos hasta el día 7 de los primeros 47 pacientes (no ciego); los datos de todos los pacientes del nivel de dosis de 62,5 µg (ciego y completo con 19 pacientes; 15 Desmoteplase y 4 placebo) y los pacientes de 90 µg (ciego e inicial, 15 pacientes reclutados (3 ó 4 en placebo y 10 u 11 en Desmoteplase – distribución de números en base a los bloques usados para aleatorización; datos agudos completos, datos al día 7 disponibles de 13 pacientes).

Asignación de la dosis

Población de pacientes

DIAS: no ciego

- 10 - 16 pacientes de placebo  
- 17 pacientes tratados con 25 mg (312,5 µg/kg prom.)  
- 13 pacientes tratados con 37,5 mg o 50 mg (545,5 µg/kg prom.)  
(7 con 37,5 mg, 6 con 50 mg)  
DIAS y DEDAS: aún ciego
- 15 - 19 pacientes (4 placebo, 15 tratados con 62,5 µg/kg) (DIAS)  
- 17 pacientes (≥ 3 placebo, ≥ 12 tratados con 90 µg/kg) (15 DIAS, 2 DEDAS)

Fig. 20



La Figura 21 (abajo) describe los datos de línea de base más relevantes al comparar todos los pacientes reclutados. Es importante observar que el grupo de 90 µg parece tener más pacientes de mayor edad (factor de riesgo de sangrado) y parece haber una tendencia a un período posterior de tratamiento. Sin embargo, esto es verdad al comparar los pacientes "viejos" y los pacientes "nuevos" y es probable debido al hecho de que la ventana de tratamiento se modificó durante la primera parte del ensayo DIAS. Se produjo un sangrado sintomático en el grupo de dosis de 90 µg y ninguno en el nivel de 62,5 µg. NIHSS (gravedad del accidente cerebrovascular) al inicio es comparable con el grupo de 25 mg. Se cree que ninguna de las diferencias entre los grupos tiene relevancia estadística o médica, dado que parece haber una buena superposición y dispersión entre los grupos.

- 5
- 10

Características de la línea de base

Población de pacientes

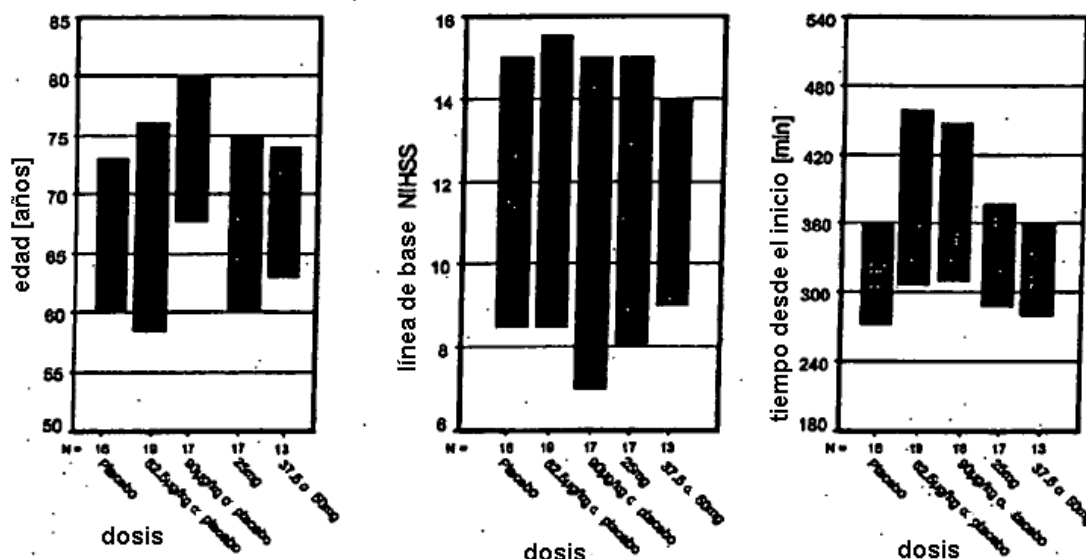


Fig. 21

La Figura 22 (abajo) describe el tema clave de los aspectos de seguridad del estudio (sl CH). Hubo un sangrado sintomático en los 36 pacientes (62,5 y 90 µg/kg de niveles de dosis) al reiniciar el estudio. En comparación con los sangrados previos, hay varios aspectos de interés. El sangrado ocurrió más bien tarde (28 horas después del tratamiento), esto parece ser el primer paciente que no tuvo ninguno de los factores de riesgo presentes previos (edad, alto nivel de glucosa, alto NIHSS). Las transformaciones asintomáticas no parecen mostrar una dependencia de la dosis, que está en línea con una alta incidencia casi sustancial en pacientes no tratados, tal como se sabe de ensayos previamente publicados. El paciente que tenía slCH, mostró signos de reperfusión y a las 4-8 h de MRI, también signos de transformación hemorrágica asintomática.

5

10 Transformaciones hemorrágicas asintomáticas y sintomáticas

## Seguridad: ICH y muertes

	dosis					
	Placebo	25mg	37.5 o 50mg	82.5µg/kg o placebo	90µg/kg o placebo	
transformación no hemorrágica	14 87,5%	11 64,7%	7 53,8%	13 68,4%	14 82,4%	59 72,0%
asintomática	2 12,5%	2 11,8%	2 15,4%	6 31,8%	2 11,8%	14 17,1%
sintomática	0	4 23,5%	4 30,8%	0	1 5,9%	9 11,0%
	18 100,0%	17 100,0%	13 100,0%	19 100,0%	17 100,0%	82 100,0%

	dosis					
	Placebo	25mg	37.5 o 50mg	82.5µg/kg o placebo	90µg/kg o placebo	
mortalidad muerto	0	2 11,8%	5 38,5%	1 5,3%	2 11,8%	10 12,2%
vivo	18 100,0%	15 88,2%	8 61,5%	18 94,7%	15 88,2%	72 87,8%
	18 100,0%	17 100,0%	13 100,0%	19 100,0%	17 100,0%	82 100,0%

Fig. 22

5 La Figura 23 describe la abertura del recipiente tal como se midió por medio del cambio de TIMI. Como establecieron algunos de los investigadores en recientes encuentros de investigadores, MRA subestima la abertura del recipiente. Necesitaremos dirigir esto en la evaluación con la nueva escala TISS (esta escala fue diseñada para el ensayo DIAS y DEDAS, lo cual representa una combinación de cambios de TIMI y PWI, que se adaptó en base a los datos de los primeros 47 pacientes y se usa de una manera explorativa). La reperfusión tal como se evalúa por PWI (la Figura 25 da una imagen ligeramente diferente. Se debe tener en mente que la escala de TIMI muestra la reperfusión de vasos más grandes solamente, que también puede reflejar una mejora de la microcirculación. Así, parece lógico que las líneas temporales y la cinética/magnitud de estas medidas parezcan seguir algoritmos ligeramente diferentes. Sin embargo, deberían alarmarse si mostraran diferentes direcciones. En ambos modos, el grupo de 90 µg alcanza valores que son similares a los del grupo de 25 mg, que era el mejor grupo de los "viejos" pacientes (es decir, el primer grupo de datos no ciegos del análisis intermedio). Es difícil evaluar si la tasa de apertura "real" es eventualmente mayor o un poco menor, pero definitivamente es mejor en el grupo placebo. Para los datos en bruto, ver las Tablas 1 y 2 siguientes.

10

15 Cambio de TIMI

### Eficacia: cambio de "TIMI"

Comparación de "nuevo" y "viejo"

		dosis					
		Placebo	25mg	37.5 o 50mg	62.5µg/kg o placebo*	90µg/kg o placebo*	
cambio de TIMI	sin mejora	11 68,8%	8 57,1%	6 50,0%	14 77,8%	10 71,4%	49 66,2%
	reapertura (>=1)	5 31,3%	6 42,9%	8 50,0%	4 22,2%	4 28,6%	25 33,8%
		18 100,0%	14 100,0%	12 100,0%	18 100,0%	14 100,0%	74 100,0%

\* juzgado por centro (no cuantitativo)

datos disponibles del análisis central N = 10 para el nivel de 90 ug

dosis	
62.5µg/kg o placebo	90µg/kg o placebo
11 84,6%	7 70,0%
2 15,4%	3 30,0%
13 100,0%	10 100,0%

Fig. 23

Reperusión tal como se indica por reducción de PWI

**Eficacia: cambio de PWI relativo**

Comparación de "viejo" y "nuevo"

Tasa de respondedores (todos los pacientes)

	dosis					
	Placebo	25mg	37.5 o 50mg	62.5µg/kg o placebo*	90µg/kg o placebo*	
< 30% más pequeño o más grande que la línea de base	12 80,0%	7 46,7%	5 55,6%	12 92,3%	9 60,0%	45 67,2%
>=30% más pequeño que la línea de base	3 20,0%	8 53,3%	4 44,4%	1 7,7%	6 40,0%	22 32,8%
	15 100,0%	15 100,0%	9 100,0%	13 100,0%	15 100,0%	67 100,0%

\* juzgado por centro: "más pequeño" vs. "no más pequeño" que la línea de base

datos disponibles del análisis central N = 10 para el nivel de 90 ug

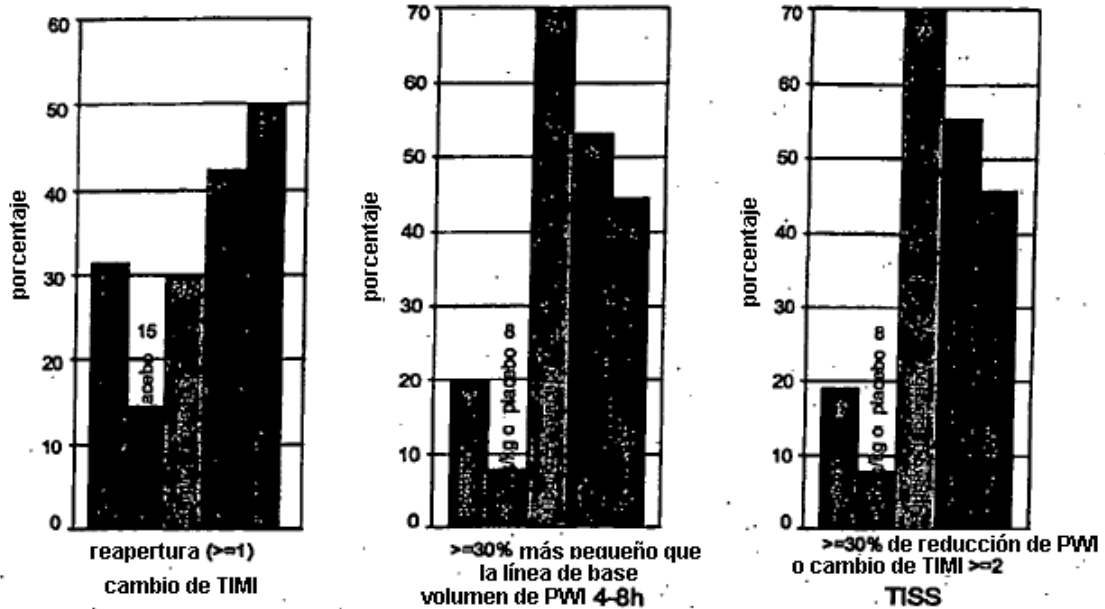
dosis	
62.5µg/kg o placebo	90µg/kg o placebo
11 91,7%	3 30,0%
1 8,3%	7 70,0%
12 100,0%	10 100,0%

*Fig. 24*

TIMI, PWI y TISS a 4-8 h

## Eficacia: cambio de TIMI y PWI

Comparación de "viejo" y "nuevo"



5 La Figura 25 muestra un signo de una curva de dosis-respuesta con forma de campana para PWI pero no para TIMI. Si bien parece haber un aumento de la dosis para TIMI cuando TIMI y TISS ya muestran una curva con forma de campana, se puede explicar por el hecho de que TIMI justo aparece en vasos (más grandes), mientras que PWI y TISS aparecen en los efectos de reperfusión sobre el tejido. Si bien mayores dosis llevan a una apertura del vaso más rápida y completa, esto puede llevar también a cierto daño de reperfusión que podría ser la razón de la curva con forma de campana de los resultados de PWI y TISS.

10

FIG. 25

La Figura 26 (siguiente) muestra cómo la reperfusión se traduce en la mejora clínica aguda de los pacientes con accidente cerebrovascular medido como mejora de la escala de accidentes cerebrovasculares NIHSS. Es sorprendente que ambos de 62,5 µg/kg y 90 µg son mejores que cualquier grupo de dosis 4-8 h después de la medicación. Uno podría especular que esto es un indicador de que la lesión por reperfusión ocurrió en las dosis mayores previas. Esta tendencia se continúa hasta el día 7, donde ambos grupos de dosis son mejores que el mejor de los grupos previos (25 mg) cuando los sangrados se incluyen o excluyen del análisis. Un punto importante es que el grupo de dosis 62,5 µg/kg es tan bueno como el grupo de 25 mg y el grupo de 90 µg/kg es mejor que el grupo de 25 mg en el día 7.

5

10 Mejora de NIHSS 4-8 h después del tratamiento y día 7

### Eficacia: resultados clínicos

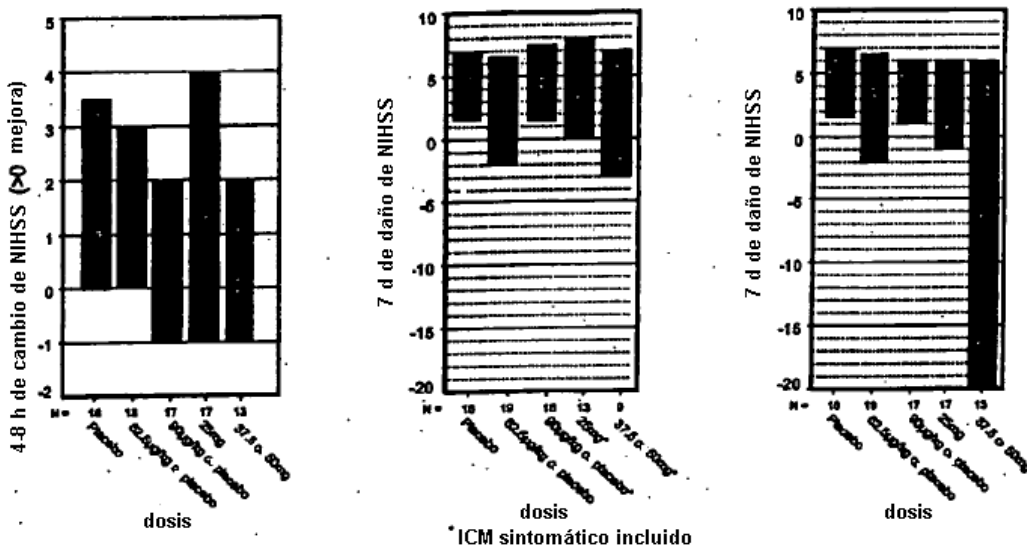


Fig. 26

Figura 27: curva de dosis-respuesta hipotética para Desmoteplase en pacientes con accidente cerebrovascular

### Curvas de dosis-respuesta emergentes

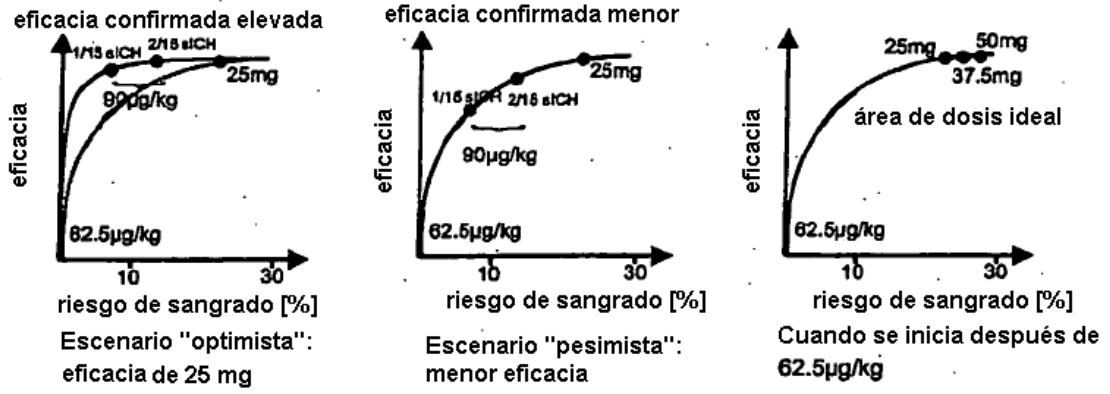


Fig. 27

A continuación están los datos ciegos en bruto del nivel de dosis de 62,5 µg/kg (Tabla 4) y 90 µg/kg (Tabla 5)

Tabla 4: datos clave en bruto de los 19 pacientes en el grupo de dosis de 62,5 µg

Fecha	Pat. No.	Datos de línea de base				Rendimiento 4-8 horas			rend. 72 horas	Día 7 NIHSS
		NIHSS	Edad	Peso	Inicio	ICH	Reperf.	NIHSS		
26.08.02	601	9	44	72	5h 10m	No	No	6	no sang. no SAE	1
20.09.02	602	8	78	80	8h 04m	No	Sí	14	no sang. no SAE	12
21.09.02	603	18	42	72	6h 50m	No	No	17	no sang. no SAE	11
26.09.02	604	9	79	75	8h 15m	No	Sin cambios significativos	8	no sang. no SAE	11
30.09.02	605	13	71	90	4h 54m	No	No	13	no sang. no SAE	16
16.10.02	606	18	73	90	5h 25m	No	No	19	no sang. no SAE	15
17.10.02	607	18	76	65	4h 50m	No	No	25	no sang. no SAE	19
30.10.02	608	8	67	91	9h 00m	No	No	5	no sang. no SAE	6
01.11.02	609	15	70	90	7h 25m	No	MRI no realizado (sólo FLAIR), intubación 5,5 h después de rayos X	15	no sang. mec. Vent	17
07.11.02	610	15	81	74	6h 00m	No	No	8	no sang. no SAE	8
13.11.02	611	7	46	119	4h 15m	No	Sin cambios significativos	7	no sang. no SAE	3
21.11.02	612	14	71	32	8h 10m	No	Sí Reperf. parcial	12	s. asint.	2
21.11.02	613	9	50	52	5h 30m	No	Sí	8	s. asint.	9
03.12.02	614	16	65	67	5h 40m	asin.	Sí Reperf. parcial	13	no SAE	10
08.12.02	615	8	64	68	8h 30m	No	No	8	no sang. no SAE	1
11.12.02	616	14	76	61	5h 00m	No	No	18	no sang. no SAE	27
17.12.02	617	8	53	120	4h 15m	No	No	5	no sang. no SAE	14
19.12.02	618	11	82	85	6h 00m	asin.	No	11	no sang. no SAE	8
22.12.02	619	16	70	100	7h 00m	No	No	16	no sang. no SAE	15

Fig. 28 (Tab. 4)



Tabla 5: datos clave en bruto de los primeros 17 pacientes (15 pacientes DIAS y 2 pacientes DEDAS) en el grupo de dosis 90 µg

Fecha	Pat. No.	Centro	Datos de línea de base				Rendimiento 4-8 horas			rend. 72 horas	Día 7 NIHSS
			NIHSS	Edad	Peso	Inicio	ICH	Reperf.	NIHSS		
04.01.03	701	Chang	15	46	53	8h 30m	No	No	22	no sang. <b>no SAE</b>	14
27.01.03	702	Samson	19	81	101	8h 52m	No	No	21	no sang. <b>no SAE</b>	7
29.01.03	703	Hacke	14	51	60	5h 30m	No	Sí. PWI menor	8	no sang. <b>no SAE</b>	5
04.02.03	704	Rouanet	6	32	53	6h 00m	No	No	4	no sang. <b>no SAE</b>	2
05.02.03	705	Davalos	7	69	70	8h 10m	No	No	6	s. sint. <b>no SAE</b>	2
05.02.03	706	Davalos	6	80	65	5h 00m	No	No	6	no sang. <b>no SAE</b>	4
07.02.03	707	Chabriat	16	80	52	3h 50m	No	Sí. Reapertura en MRA	14	no sang. <b>no SAE</b>	11
08.02.03	708	Fazekas	11	81	90	7h 00m	asin.	Sí. PWI menor y reapertura en MRA	9	<b>no SAE</b>	2
12.02.03	709	Bleccic	12	77	71	4h 30m	No	cierta regresión de PWI	12	no sang. <b>no SAE</b>	12
19.02.03	710	Levi	9	85	70	5h 00m	No	Sí. Reapertura parcial en MRA y reperusión parcial en PWI	9	no sang. <b>no SAE</b>	3
25.02.03	711	Davalos	12	43	50	8h 23m	No	No	13	no sang. <b>no SAE</b>	6
28.02.03	712	Bogouss	17	68	70	5h 15m	No	No	17	no sang. <b>no SAE</b>	12
04.03.03	713	Meves	14	78	80	5h 10m	No	El paciente murió. Pulm. ¿Embolia?	-	-	-
10.03.03	714	Davalos	6	69	78	6h 10m	asin.	Sí. Reapertura parcial en MRA y PWI menor.	4	sang. sint.	19
12.03.03	715	Chabriat	6	75	78	7h 30m	No	Sí. PWI menor.	4	no sang. <b>no SAE</b>	2
27.03.03	716	Chang	18	54	69	6h 40m	asin.	Sí. Mínima reperf. en MRA	19	<b>no SAE</b>	
29.03.03	717	Hacke	11	52	80	5h 25m	No	No	11		
30.03.03	718	Ludolph	5	59	58	6h 45m	No	Sí. Reapertura en MRA y PWI menor	4		
22.02.03	201		19	72	99	no tratado	-		-		
03.03.03	202		12	70	92	7h 20m	No	No	34	paciente en vent. mec.	paciente muerto al día 6 (1)
19.03.03	203		16	77	57	9h 00m	No	Sí. Reapertura parcial en MRA	16	no sang. <b>no SAE</b>	

Fig. 29 (Tab. 5)