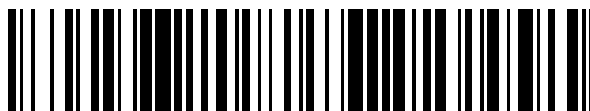


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 504 365**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2003** **E 03790377 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014** **EP 1567199**

54 Título: **La actividad neuroprotectora de la proteína C activada es independiente de su actividad anticoagulante**

30 Prioridad:

05.12.2002 US 430936 P

24.01.2003 US 442066 P

25.04.2003 US 465235 P

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

08.10.2014

73 Titular/es:

ZZ BIOTECH L.L.C. (33.3%)

1001 McKinney Street, Suite 1900

Houston, TX 77002, US;

THE UNIVERSITY OF ROCHESTER (33.3%) y

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (33.3%)

72 Inventor/es:

ZLOKOVIC, BERISLAV V. y

GRIFFIN, JOHN H.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 504 365 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

La actividad neuroprotectora de la proteína C activada es independiente de su actividad anticoagulante

5 INVESTIGACIÓN O DESARROLLO PATROCINADOS POR EL GOBIERNO FEDERAL

El gobierno de EE.UU. tiene ciertos derechos sobre esta invención proporcionados por las subvenciones de los NIH HL63290 y HL52246 del Departamento de salud y servicios sociales.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Esta invención se refiere al uso de proteína C activada (APC), un profármaco y/o una variante de la misma como se define en las reivindicaciones como inhibidor de la apoptosis o la muerte celular y/o factor de supervivencia celular, especialmente para células o tejidos del sistema nervioso que estén estresados o dañados. Esta función biológica de la APC puede separarse de su función anticoagulante (concretamente, la inhibición de la coagulación). La invención puede usarse para tratar isquemia y apoplejía al inhibir la ruta proapoptótica de señalización de p53 en células cerebrales estresadas o dañadas. Aquí se ha mostrado esto en endotelio cerebral humano *in vitro* y en animales *in vivo* (apoplejía isquémica y modelos de NMDA). La APC puede actuar a través del receptor de proteína C endotelial (EPCR) y el receptor activado de proteasa 1 (PAR-1) sobre células endoteliales cerebrales estresadas, o del PAR-1 y el receptor activado de proteasa 3 (PAR-3) sobre neuronas estresadas, activando rutas antiapoptóticas y y/o rutas prosupervivencia en estas células cerebrales estresadas y/o dañadas.

La proteína C se identificó originalmente por sus actividades anticoagulante y profibrinolítica. Tras la activación de la forma de zimógeno, la proteína C activada (APC) es una serinproteasa que desactiva los factores Va y VIIIa. La proteína C humana se fabrica principalmente en el hígado como polipéptido único de 461 aminoácidos. Esta molécula precursora se modifica postraduccionalmente entonces mediante (i) escisión de una secuencia señal de 42 aminoácidos, (ii) retirada proteolítica del zimógeno monocatenario del residuo de lisina en posición 155 y del residuo de arginina en posición 156, produciendo la forma bicatenaria (concretamente, la cadena ligera de 155 residuos aminoácidos unida por ligamiento disulfuro con la cadena pesada de 262 residuos aminoácidos que contiene la serinproteasa), (iii) carboxilación de los residuos de ácido glutámico agrupados en los primeros 42 aminoácidos de la cadena ligera, dando como resultado nueve residuos de ácido γ -carboxiglutámico (Gla), y (iv) glicosilación en cuatro sitios (uno en la cadena ligera y tres en la cadena pesada). La cadena pesada contiene la tríada de serinproteasa de Asp257, His211 y Ser360.

De forma similar a la mayoría de los demás zimógenos de las proteasas extracelulares y los factores de coagulación, la proteína C tiene una estructura nuclear de la familia de la quimotripsina, que tiene inserciones y una extensión N-terminal que posibilitan la regulación del zimógeno y la enzima. Son de interés dos dominios con secuencias aminoácidas similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Es conocida al menos una porción de las secuencias nucleotídica y aminoácida de la proteína C de ser humano, mono, ratón, rata, hámster, conejo, perro, gato, cabra, cerdo, caballo y vaca, así como mutaciones y polimorfismos de la proteína C humana (véase el acceso a GenBank P04070). Son conocidas otras variantes de la proteína C humana que afectan a diferentes actividades biológicas.

Recientemente, se ha aprobado la drotrecogina α (activada) (proteína C activada humana recombinante) para uso como tratamiento de la sepsis. Aunque su eficacia puede deberse en parte a la actividad antitrombótica de la APC, Grinnell y sus colegas proponen que sus efectos en la sepsis podrían atribuirse a las actividades antiinflamatoria y de supervivencia celular de la APC.

La capacidad de la proteína C activada de suprimir las rutas proinflamatorias y los mecanismos de supervivencia celular en la interfase de célula endotelial-mononuclear sugiere una compleja respuesta adaptativa en la pared del vaso para proteger al organismo del ataque vascular y para prolongar la supervivencia endotelial, celular y orgánica. Joyce y Grinnell, Crit. Care Med. 30: S288-S293 (2002). Basándose en el perfil transcripcional, la apoptosis inducida por estaurosporina en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y la lesión mediada por factor de necrosis tumoral α de HUVEC, Joyce *et al.* (J. Biol. Chem. 276: 11199-11203, 2001) sugieren que la inhibición por APC de la señalización de NF- κ B causa la regulación negativa de moléculas de adhesión, mientras que la inducción de genes antiapoptóticos (por ejemplo, proteína A1 relacionada con Bcl2 o Bcl2A1, inhibidor de la apoptosis 1 o cIAP1, óxido nítrico sintasa endotelial o eNOS) se ha interpretado como un posible mecanismo ligado a los efectos antiapoptóticos de APC en el modelo de estaurosporina. Pero la expresión estos genes no se ha estudiado aquí. El papel directo de estos genes en el modelo de estaurosporina tiene que mostrarse todavía y otros informes no sugieren un papel protector principal (Ackerman *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 11245-11252, 1999). Tampoco se han obtenido datos en células endoteliales cerebrales ni en estudios sobre estrés celular generalizado frente a ningún otro inductor de la apoptosis. El papel de estos genes antiapoptóticos no se ha mostrado en ninguno de los modelos; el único efecto directo de la APC que se ha determinado ha sido la inhibición de la señalización de NF- κ B. Ha de observarse que NF- κ B es un factor de transcripción que puede tener una función dual en el sistema nervioso

y endotelio y podría ser antiapoptótico o proapoptótico (Ryan *et al.* Nature 404: 892-897, 2000; Yu *et al.* J. Neurosci. 19: 8856-8865, 1999; Yabe *et al.* J. Biol. Chem. 276: 43313-43319, 2001). Por lo tanto, los efectos de supervivencia celular o citoprotección a través de la regulación negativa de NF- κ B en el sistema nervioso y el sistema vascular no explican los efectos protectores celulares directos de la APC. Estas observaciones estaban también limitadas al modelo de estaurosporina o a un mecanismo de TNF- α en HUVEC.

Taylor y Esmon (patente de EE.UU. 5.009.889) dan a conocer que la APC inhibe los estímulos inflamatorios que desestabilizan los procesos de permeabilidad celular y coagulación normal en un paciente que padece disfunción del endotelio vascular. Estaban interesados en tratar un trastorno sistémico de células endoteliales en sepsis (presuntamente reduciendo la respuesta inflamatoria), en lugar de prevenir la apoptosis o promover la supervivencia celular. Tampoco han sugerido el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas ni la prevención de la muerte y lesión de células neuronales.

Griffin *et al.* (patente de EE.UU. 5.084.274) y Grinnell *et al.* (patente de EE.UU. 6.037.322) dan a conocer que la APC puede usarse para tratar oclusión trombótica o tromboembolia, que podrían implicar apoplejía. De nuevo, no se ha proporcionado ningún dato en un modelo de apoplejía ni de los efectos de la APC sobre el resultado neurológico o neuropatológico. Estas patentes estaban interesadas en la actividad anticoagulante de APC en el tratamiento de trombosis. Pero no han sugerido efectos neuroprotectores celulares directos de la APC, ni que la actividad anticoagulante no fuera necesaria para este efecto. Es posible que esta actividad anticoagulante pueda limitar el uso de la APC en el tratamiento de apoplejía debido a complicaciones hemorrágicas. En contraposición, se muestra que esta actividad no es crítica para la neuroprotección.

Griffin *et al.* (WO 01/56532) da a conocer que la APC puede usarse para el tratamiento de trastornos neuropatológicos y enfermedades inflamatorias cerebrales. Se muestra que la APC proporciona neuroprotección en un modelo de isquemia cerebral focal de murino.

Riewald *et al.* (Science 296:1880-1882, 2002) han reseñado que la APC usa el receptor de proteína C de célula endotelial (EPCR) como correceptor para la activación del receptor activado de proteasa 1 (PAR-1) en células endoteliales. Han encontrado también que Bcl2A1 y cAP1 se regulan positivamente. Sin embargo, sus resultados sobre el endotelio estaban limitados a HUVEC y la activación de la fosforilación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Además, existen diferencias significativas en las respuestas celulares y su regulación de la expresión génica entre HUVEC y células endoteliales cerebrales o cualquier otro tipo de células cerebrales (Berger *et al.*, Molec. Med. 5: 795-805, 1999; Petzelbauer *et al.* J. Immunol. 151: 5062-5072, 1993; Abbot *et al.*, Arthritis & Rheumatism 35: 401-406, 1992; Mason *et al.*, Am. J. Physiol. 273: C1233-C1240, 1997).

La técnica anterior no ha mostrado el valor del endotelio cerebral como diana terapéutica en apoplejía o isquemia. No se ha sugerido que las dianas vasculares de APC EPCR y PAR-1, y las dianas neuronales PAR-1 y PAR-3, que están ligadas intracelularmente para la regulación negativa de p53 en condiciones isquémicas y/o durante la hiperestimulación de receptores neuronales de D-aspartato de N-metilo (NMDA) tanto *in vitro* como *in vivo*, promuevan la supervivencia celular en el cerebro. Además, la ruta antiapoptótica de APC durante la hipoxia y lesión de células endoteliales cerebrales que se describe es distinto de la inducción de genes antiapoptóticos por APC en HUVEC anteriormente descrita por Joyce *et al.* y Riewald *et al.* De forma similar, no se ha descrito anteriormente la activación de la ruta antiapoptótica por APC en neuronas dañadas o estresadas.

El uso en la técnica anterior de APC en apoplejía estaba interesado en el tratamiento de trombosis, en lugar de conseguir la neuroprotección mediante la protección directa de endotelio y neuronas cerebrales de la muerte celular isquémica o la muerte celular excitotóxica. Los estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que los efectos neuroprotectores de la APC no dependen de su actividad anticoagulante. Además, su uso como modelo de apoplejía confirma que la actividad anticoagulante de la APC no es necesaria para la neuroprotección, y su uso como modelo de lesiones excitotóxicas cerebrales *in vivo* indica que los efectos sistémicos de la APC no son necesarios para sus efectos protectores neuronales directos.

Se ha mostrado anteriormente en las solicitudes de patente nº de serie 09/777.484 y PCT/US01/03758 que la APC puede usarse como agente neuroprotector gracias a su acción de prevención de la trans migración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica (BBB) en el parénquima cerebral durante un ataque isquémico al cerebro. Por tanto, la reducción del componente inflamatorio de una lesión isquémica estaba asociada a la neuroprotección. Aquí, en un modelo de apoplejía en que se usa una APC homóloga de especie (concretamente, APC recombinante de murino administrada a un ratón), se consigue la neuroprotección con APC a dosis baja (0,02 mg/kg/min durante 1 min) en ausencia de una disminución significativa de neutrófilos en el tejido cerebral, o al menos no depende de la reducción del número de leucocitos en el tejido cerebral isquémico. Además, los resultados con APC en un modelo de lesiones excitotóxicas cerebrales por NMDA *in vivo* confirman que la APC ejerce efectos protectores neuronales directos y que sus efectos neuroprotectores no dependen de sus efectos anticoagulante y antiinflamatorio asociados a la reducción del número de leucocitos en tejido cerebral dañado.

Se ha sugerido también que los efectos de supervivencia celular directa sobre células dañadas por isquemia no pueden excluirse. Se demuestra ahora que, en condiciones de cultivo normales, el efecto antiapoptótico durante la isquemia no depende de la expresión aumentada de los genes antiapoptóticos que se estudiaron por Riewald *et al.* y Joyce *et al.* Aquí, se muestra que la APC inhibe la apoptosis de endotelio vascular cerebral humano isquémico mediante una combinación de regulación negativa del mecanismo mediado por p53 y la relación Bax/Bcl-2 y la inhibición de la señalización de caspasa 3. Se ha confirmado también en neuronas cultivadas que la APC bloquea la apoptosis neuronal inducida por NMDA al reducir la señalización proapoptótica dependiente de p53 y dependiente de caspasa 3. El uso de proteína C activada a dosis bajas con efectos anticoagulantes reducidos o nulos para inhibir la apoptosis y/o como factor de supervivencia celular puede separarse de otras funciones como la inhibición de trombosis y la infiltración de leucocitos. Por ejemplo, puede administrarse una dosis baja de APC para proporcionar neuroprotección, y el efecto neuroprotector no depende del efecto anticoagulante de APC. Esto muestra que la actividad anticoagulante de APC no es necesaria para la neuroprotección mediada por APC.

Es un objetivo de la invención usar proteína C activada (APC), profármacos y variantes que constan al menos de la mutación KKK191-193AAA como agentes neuroprotectores para inhibir la apoptosis mediada por p53 en células cerebrales como resultado de isquemia y apoplejía y/o para actuar como factores de supervivencia celular, al inhibir la muerte celular programada mediada por p53 en células cerebrales o, más particularmente, endotelio vascular cerebral.

Es un efecto adverso del tratamiento con drotrecogina α (activada) la hemorragia (véase Lyseng-Williamson y Perry. *Drugs* 62: 617-630, 2002). Por tanto, es otro objetivo de la invención proporcionar productos variantes (por ejemplo, APC mutante que consta al menos de la mutación KKK191-193AAA) o procesos (por ejemplo a dosis baja) para reducir sus actividades anticoagulante y antitrombótica y, en última instancia, la incidencia o gravedad de la hemorragia.

Se aborda así una necesidad largamente sentida de nuevas composiciones terapéuticas y profilácticas. Se proporcionan también procedimientos terapéuticos y profilácticos para la inhibición de la apoptosis o la muerte celular y la promoción de la supervivencia celular. Pueden seleccionarse variantes de proteína C (concretamente, un profármaco), variantes de proteína C activada, estrategias de formulación y protocolos de tratamiento por su efecto sobre la ruta de señalización de p53 o su capacidad de actuar a través de EPCR y PAR-1 sobre el endotelio y de PAR-1 y PAR-3 sobre neuronas. Se describen procesos para usar y preparar los productos anteriormente mencionados. Se describen a continuación objetivos y ventajas adicionales de la invención.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a una composición farmacéutica como se define en las reivindicaciones y al uso de una variante funcional de una proteína C activada (APC) o una proteína C humana como se define en las reivindicaciones. Puede usarse una cantidad eficaz de proteína C activada (APC), al menos un profármaco (por ejemplo, proteína C y variantes de la misma) o al menos una variante de la misma (por ejemplo, mutantes del dominio de proteasa de APC con actividad anticoagulante reducida) que constan al menos de la mutación KKK191-193AAA para proporcionar al menos neuroprotección, para inhibir la apoptosis o muerte celular y/o para promover la supervivencia celular en células cerebrales estresadas y dañadas y, más particularmente, en endotelio y neuronas cerebrales estresados o dañados.

Por lo tanto, la invención proporciona un tratamiento para la terapia o profilaxis de isquemia y apoplejía, y los productos usados en el mismo. Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse y valorarse de acuerdo con el mismo. Resultarán evidentes aspectos adicionales de la invención para especialistas en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones, y generalizaciones de las mismas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1a-1e muestran los efectos antiapoptóticos de APC en células endoteliales cerebrales (BEC) humanas hipóxicas. Fig. 1a, la liberación de LDH de BEC era dependiente del tiempo en condiciones hipóxicas y normóxicas. Fig. 1b, el efecto citoprotector de APC era dependiente de la dosis en BEC hipóxicas y no tenía efecto sobre BEC normóxicas. Fig. 1c, se efectuaron simultáneamente la tinción TUNEL (izquierda) y Hoechst (derecha) en BEC normóxicas (paneles superiores) y BEC hipóxicas en ausencia (paneles medios) y presencia de APC 100 nM (paneles inferiores). Fig.1d, se muestra el porcentaje de BEC positivas de TUNEL en condiciones hipóxicas y normóxicas frente a APC. Fig. 1e, se muestran los efectos de reactivos sobre la lesión en BEC hipóxicas (izquierda a derecha): tampón solo, APC (100 nM), Ser360Ala-APC (100 nM)¹⁷, zimógeno de proteína C (100 nM), APC hervida (100 nM), APC (100 nM) con anticuerpos: IgG anti-APC (C3, 11 μ g/ml)²⁶, anti-PAR-1 (H-111, 20 μ g/ml), anti-PAR-2 (SAM-11, 20 μ g/ml), anti-EPCR (RCR-252, 15 μ g/ml)¹⁸ y (RCR-92, 15 μ g/ml)¹⁸. Para las Fig. 1a-1b y 1d-1e, los datos son medias $\pm$ EEM (3-5 medidas independientes por triplicado para cada punto temporal); * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$. Para la Fig. 1a, se compararon los valores de hipoxia con

los valores de normoxia; para las Fig. 1b y 1d-1e, se compararon los valores de hipoxia en presencia de APC u otros reactivos moleculares estudiados con los valores en ausencia de APC.

Las Figuras 2a-2e muestran que la APC bloquea la apoptosis dependiente de p53 en BEC humanas hipóxicas. Fig. 2a, se estudió el curso temporal de la expresión de p53, Bax, o proteína Bcl-2 en BEC hipóxicas mediante análisis de transferencia Western. Fig. 2b, se determinó la intensidad de la señal de p53, Bax o Bcl-2 durante hipoxia mediante densitometría de barrido y se normalizó a β -actina. Se expresó la abundancia de proteína respecto a tiempo cero, cuyo valor se tomó arbitrariamente como 1. Fig. 2c-2d, se estudiaron los efectos de APC (100 nM) sobre la expresión de p53, Bax o Bcl-2 en BEC hipóxicas mediante transferencia Western y densitometría (como en las Fig. 2a-2b) a las 2 y 4 h. Los efectos de la APC permanecen persistentemente al cabo de 24 h. Fig. 2e, se efectuó la inmunotinción para la forma activa de caspasa 3 en condiciones normóxicas (panel superior izquierdo) e hipóxicas en ausencia (panel medio izquierdo) o presencia de APC 100 nM (panel inferior izquierdo) simultáneamente con la tinción de Hoechst (paneles derechos). Para las Fig. 2b y 2d, los datos son medias $\pm$ EEM, de 3 a 5 medidas independientes efectuadas para cada punto temporal; * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

Las Figuras 3a-3b muestran que la APC inhibe la transcripción de p53 en BEC hipóxicas. Fig. 3a, se muestra la electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR correspondientes a transcritos de ARNm de p53 y GAPDH (control interno) en BEC normóxicas e hipóxicas en ausencia y presencia de APC 100 nM. Fig. 3b, se muestra la abundancia relativa de ARNm de p53 normalizado por GAPDH en BEC hipóxicas en ausencia o presencia de APC. Los datos son medias $\pm$ EEM de 4 medidas independientes efectuadas para cada punto temporal con $P < 0,01$ cuando se indica. Fig. 3c, la APC (100 nM) no afecta a la expresión de proteína A1 relacionada con Bcl2, clAP1, o eNOS en BEC hipóxicas estudiado por análisis de transferencia Western (como en la Figura 2).

Las Figuras 4a-4i muestran que los efectos neuroprotectores *in vivo* de APC recombinante de murino (ratón) durante la apoplejía isquémica focal en ratones requieren EPCR y PAR-1. Figs. 4a-4b, se muestran los volúmenes de infarto y edema en ratones con una deficiencia grave de EPCR (EPCR-) tratados con APC (APC+) o vehículo (APC-), y en controles de la misma camada normales genéticamente coincidentes (EPCR+) tratados con APC (APC+) o vehículo (APC-). Media $\pm$ EEM, $n = 6$. Se administró APC (0,2 mg/kg) 10 min después de la MCAO. Figs. 4c-4d, se muestran los volúmenes de infarto y edema en ratones C57BL/6 tratados con los anticuerpos anti-PAR-1 [anti-PAR-1 (H111)+] en presencia de APC (APC+) o ausencia de APC (APC-) y en ratones de control [anti-PAR-1

(H111)-] tratados con APC (APC+) o vehículo (APC-). Se administraron los anticuerpos anti-PAR-1 (40 μ g por ratón i.v.) 10 min antes de la MCAO; se procuró APC (0,2 mg/kg) 10 min después de la MCAO. Media $\pm$ EEM, $n = 6$. Fig. 4e-4i, se muestran la puntuación neurológica motora, volumen de lesión cerebral total (infarto + edema), flujo sanguíneo cerebral postisquémico (CBF), deposición de fibrina y el número de leucocitos positivos de CD11b en ratones sometidos a isquemia focal por MCAO y tratados con vehículo (0) o APC (0,02, 0,04 o 0,20 mg/kg/min infundida durante 1 min). Los valores son media $\pm$ EEM, $n = 6$.

Las Figuras 5a-5e muestran los efectos protectores de la APC sobre la apoptosis inducida por NMDA en neuronas corticales de ratón cultivadas. Fig. 5a, se efectuó la inmunotinción para caspasa 3 activa en neuronas corticales 24 h después de exposición a NMDA en ausencia o presencia de APC humana (100 nM) simultáneamente a la tinción de TUNEL y Hoechst. Fig. 5b, número de células positivas de TUNEL (izquierda) y células positivas de caspasa 3 (derecha) en los experimentos ilustrados en la Fig. 5a, expresado como el porcentaje del número total de núcleos positivos de Hoechst. Fig. 5c, se determinaron los cambios dependientes del tiempo de la actividad de caspasa 3 en neuronas corticales cultivadas después de exposición a NMDA en ausencia (círculos negros) o presencia (círculos blancos) de APC humana (100 nM). Fig. 5d, efecto neuroprotector de APC humana (100 nM) sobre la apoptosis neuronal inducida por NMDA mostrado en función del tiempo; se cuantificó el número de células apoptóticas usando tinción de TUNEL y Hoechst. Círculo negro, NMDA solo; círculo blanco, NMDA y APC humana.

Fig. 5e, la APC humana (hAPC) y APC de ratón recombinante (mAPC) tenían efectos dependientes de la dosis sobre las neuronas corticales 24 h después de exposición a NMDA. Círculo negro, NMDA solo; círculo blanco, NMDA y APC humana; triángulo, NMDA y APC de ratón. Los datos son medias $\pm$ EEM (3-5 medidas independientes por triplicado). ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ en comparación con los valores en ausencia de APC.

Las Figuras 6a-6f muestran que la APC bloquea la apoptosis dependiente de p53 en neuronas corticales de ratón tratadas con NMDA. Fig. 6a-6b, se ilustran análisis de transferencia Western para p53 en extractos de proteína nuclear de células tratadas con NMDA en ausencia o presencia de APC humana (100 nM) en diferentes puntos temporales. Fig. 6c, se ilustran análisis de transferencia Western para Bax y Bcl-2 sobre extractos celulares completos de experimentos similares a los mostrados en la Fig. 6a. Fig. 6d, se muestran análisis densitométricos de la densidad óptica de bandas de p53, Bax y Bcl-2 normalizadas a β -actina para

células tratadas con NMDA en ausencia (blanco) o presencia (negro) de APC humana. Los datos son medias $\pm$ EEM (3 a 5 medidas independientes para cada punto temporal). Fig. 6e, los ensayos de desplazamiento de la movilidad electroforética no muestran cambios en las actividades de unión a ADN de NF- κ B después de exposición de las neuronas a NMDA. Sirvieron como control positivo células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) expuestas a LPS de *E. coli*. Fig. 6f, se ilustran análisis de transferencia Western para las subunidades de receptor de NMDA cortical intactas NR1 y NR2A en fracciones de membrana 24 h después de tratamiento con APC humana (100 nM).

Las Figuras 7a-7e muestran la especificidad de la protección de APC sobre la muerte neuronal inducida por NMDA en neuronas corticales de ratón cultivadas y en cerebros de ratón *in vivo*. Fig. 7a, se trataron neuronas corticales con NMDA y se incubaron durante 24 h con vehículo, APC humana (100 nM), zimógeno de proteína C (100 nM), IgG anti-APC (C3), Ser360Ala-APC (100 nM) y APC hervida (100 nM); la apoptosis se cuantificó como en la Fig. 5a. Fig. 7b, se trataron neuronas corticales con NMDA y se incubaron durante 24 h con APC de ratón (10 nM) en presencia de anticuerpos de bloqueo del sitio de escisión anti-PAR-1 (H-111), anti-PAR-2 (SAM 11) o anti-PAR-3 (H-103); los anticuerpos anti-PAR-1 N-terminal (S-19) o anti-PAR-2 (S-19) y anti-PAR-3 C-terminal (M-20) o anti-PAR-4 (M-20) sirvieron como controles negativos. El péptido agonista de PAR-1 TFLLRNPNDK (10 μ M) y el péptido agonista de PAR-2 SLIGRL (100 μ M) se estudiaron también. Se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas como en la Fig. 7a. Los datos son medias $\pm$ EEM ($n = 3-5$ medidas independientes por triplicado) para las Fig. 7a-7b. * $P < 0,01$, NMDA frente a NMDA + TFLLRNPNDKAPC. Fig. 7c, se tiñeron con violeta de cresilo secciones coronales de cerebros de ratón infundidas con NMDA en ausencia (APC-) o presencia (APC+) de APC de ratón (0,2 μ g). Fig. 7d, se determinó el efecto protector de APC de ratón dependiente de la dosis sobre la lesión inducida por NMDA (volumen de lesión) en cuerpo estriado de ratón a las 48 h. Fig. 7e, se muestran los efectos de diferentes anticuerpos anti-PAR sobre los volúmenes de lesión por NMDA en ausencia o presencia de APC de ratón: NMDA + APC (0,2 μ g); NMDA + APC (0,2 μ g) + anti-PAR-1 (H-111, 0,2 μ g), anti-PAR-2 (SAM11, 0,2 μ g) o anti-PAR-3 (H-103, 0,2 μ g). Los datos son medias $\pm$ EEM, $n = 3-5$ ratones para las Fig. 7d-7e.

La Figura 8 ilustra los bucles de superficie en la cercanía del sitio activo de proteasa de APC con el esquema de numeración de quimotripsina indicado. Se expresa la actividad anticoagulante de mutantes de APC humana (Gale *et al.*, *Blood* 96: 585-593, 2000; Gale *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: 28836-28840, 2002) como porcentaje de APC humana de tipo silvestre recombinante (definida como 100 %).

Las Figuras 9a-9f muestran los efectos neuroprotectores directos de mutantes de APC humana en el bucle 37 (KKK191-193AAA, "3K3A-APC") o el bucle de unión a Ca^{++} (RR229/230AA, "229/30-APC") en comparación con APC humana de tipo silvestre recombinante ("rwt-APC"). Fig. 9a, inmunotinción con TUNEL y Hoechst en neuronas de ratón aisladas 24 h después de exposición a NMDA 300 μ M en ausencia o presencia de rwt-APC (100 nM). Fig. 9b, efectos neuroprotectores dependientes de la dosis de mutantes de APC y rwt-APC sobre neuronas aisladas a las 24 h de exposición a NMDA 300 μ M. Círculo negro, rwt-APC; círculo blanco, 3K3A-APC; triángulo 229/30APC. Fig. 9c, volumen de lesión en cerebro de ratón infundido con NMDA (20 nmol) en ausencia o presencia de mutantes de APC o rwt-APC (0,2 μ g). Barra negra, NMDA solo; barra blanca, NMDA y rwt-APC; barra rayada diagonalmente, NMDA y 3K3A-APC; barra rayada horizontalmente, NMDA y 229/30APC. Fig. 9d, inmunotinción con TUNEL y Hoechst de células endoteliales cerebrales (BEC) humanas aisladas 8 h después de hipoxia/aglicemia en ausencia o presencia de rwt-APC (100 nM). Figs. 9e-9f, efectos neuroprotectores dependientes de la dosis de mutantes de APC y rwt-APC sobre BEC humanas hipóxicas a las 8 h de hipoxia/aglicemia estimados a partir de la liberación de LDH y el porcentaje de BEC apoptóticas por TUNEL. Círculo negro, 3K3A-APC; círculo blanco, 229/30APC; triángulo, rwt-APC. Los datos son medias $\pm$ EEM (3-5 medidas independientes).

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS DE LA INVENCION

La presente invención es útil para tratar enfermedades neurodegenerativas que implican apoptosis y/o muerte celular en el sistema nervioso central como se define en las reivindicaciones. La inhibición de la señalización de p53 por proteína C activada (APC) o una variante de la misma puede demostrarse mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, cultivos celulares y modelos animales). La apoptosis y/o muerte celular se reducen como resultado de la práctica de la invención. La lesión debida a isquemia o hipoxia puede prevenirse o al menos mitigarse. De forma similar, la lesión por irradiación ultravioleta (UV) o gamma (concretamente, ataques físicos del entorno) o contaminantes químicos y polucionantes puede prevenirse o al menos mitigarse. En particular, la neurotoxicidad debida a la hiperestimulación de los receptores de D-aspartato de N-metilo (NMDA) es un modelo útil para lesión y muerte celular neuronal que imita los efectos de una enfermedad neurodegenerativa. La citoprotección puede determinarse al nivel de los diferentes tipos celulares, órganos o tejidos u organismos completos.

La presente invención proporciona procedimientos para proteger a células neuronales de la muerte celular en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad neurodegenerativa como se define en las reivindicaciones. El procedimiento incluye administrar una cantidad eficaz de proteína C activada, un profármaco o

una variante de la misma al sujeto, en los que la variante funcional consta al menos de la mutación KKK191-193AAA, proporcionando así neuroprotección al sujeto. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz puede ser una dosis baja de APC o variante de la misma que es directamente neuroprotectora, pero con una actividad anticoagulante al menos reducida en comparación con tratamientos de la técnica anterior. Se han descrito variantes de APC con actividad anticoagulante reducida (Gale *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277: 28836-28840, 2002). Los ejemplos de dichas enfermedades incluyen isquemia y apoplejía. La mejora en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas puede ser clínicamente medible por pruebas neurológicas o psiquiátricas; de forma similar, los efectos terapéuticos sobre coagulación, fibrinólisis, trombosis e inflamación pueden determinarse clínicamente.

En enfermedades neurodegenerativas, las células neuronales degeneran causando el deterioro de la función cognitiva. Una variedad de enfermedades y deficiencias neurológicas pueden causar dicha degeneración, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad o corea de Huntington, hipoxia o isquemia causada por apoplejía, muerte celular causada por epilepsia, esclerosis lateral amiotrófica, retardo mental y similar, así como cambios neurodegenerativos resultantes del envejecimiento.

El término “enfermedad neurodegenerativa” se usa para designar afecciones que son el resultado de la pérdida de neuronas, lesión o pérdida de células neuronales y/o lesión de otros tipos de células cerebrales tales como oligodendrocitos, células endoteliales cerebrales, otras células vasculares y/u otros tipos de células del sistema nervioso, que pueden causar el deterioro de una función motora o sensorial del sistema nervioso, función cognitiva, funciones intelectivas integrativas superiores, memoria, visión, audición, etc. Dicha degeneración de células neurales puede estar causada por afecciones patológicas causadas por una carencia temporal de suministro de sangre u oxígeno al cerebro, por ejemplo, causada por apoplejía. Debería observarse que las enfermedades tales como apoplejía tienen tanto un componente neurodegenerativo como vascular, con o sin respuesta inflamatoria, y por tanto pueden tratarse con los procedimientos de la invención.

Se dan a conocer actividades de proteína C activada tales como inhibidor de la apoptosis o muerte celular, factor de supervivencia celular y agente citoprotector. La célula puede derivar de vasos cerebrales (por ejemplo, una célula endotelial o de músculo liso) de un sujeto, especialmente del endotelio de un vaso cerebral. Como alternativa, puede ser una neurona, un astrocito, una microglía, un oligodendrocito o un pericito; una célula precursora o progenitora de las mismas u otros tipos de célula diferenciada del sistema nervioso central o periférico del sujeto.

En particular, “neurona” incluye cientos de tipos diferentes de neuronas, cada uno con propiedades distintas. Cada tipo de neurona produce y responde a diferentes combinaciones de neurotransmisores y factores neurotróficos. Se cree que las neuronas no se dividen en el cerebro adulto, ni sobreviven generalmente largo tiempo *in vitro*. El procedimiento de la divulgación proporciona la protección de la muerte o senescencia de neuronas de virtualmente cualquier región del cerebro y la médula espinal. Las neuronas incluyen aquellas en tejido neural embrionario, fetal o adulto, incluyendo tejido de hipocampo, cerebelo, médula espinal, corteza (por ejemplo, corteza motora o somatosensorial), cuerpo estriado, prosencéfalo basal (por ejemplo, neuronas colinérgicas), mesencéfalo ventral (por ejemplo, células de sustancia negra) y locus cerúleo (por ejemplo, células neuroadrenálicas del sistema nervioso central).

Hay muchas otras enfermedades que se benefician de las metodologías de la presente divulgación tales como, por ejemplo, oclusión arterial coronaria, arritmias cardíacas, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiomiopatía, bronquitis, neurotraumatismo, rechazo de injerto/trasplante, miocarditis, neuropatía diabética y apoplejía. Aparece daño de tejido local y remoto potencialmente mortal durante cirugía, traumatismo y apoplejía cuando lechos vasculares grandes se privan de oxigenación durante un tiempo (isquemia) y después se restaura la circulación normal (reperfusión). La muerte celular y el daño de tejido pueden conducir a un fallo orgánico o una función orgánica disminuida. Las composiciones y metodologías de la presente invención son útiles en el tratamiento de isquemia y apoplejía.

“Proteína C” hace referencia a genes y proteínas nativos pertenecientes a esta familia, así como a variantes de los mismos (por ejemplo, mutaciones y polimorfismos encontrados en la naturaleza o diseñados artificialmente). La estructura química de los genes y proteínas puede ser un polímero de nucleótidos naturales o no naturales conectados por ligamientos covalentes naturales o no naturales (concretamente, un polinucleótido) o un polímero de aminoácidos naturales o no naturales conectados por ligamientos covalentes naturales o no naturales (concretamente, un polipéptido). Véanse las tablas 1-4 del WIPO Standard ST.25 (1998) para una lista no limitante de nucleótidos y aminoácidos naturales y no naturales. Los genes y proteínas de proteína C pueden reconocerse como pertenecientes a esta familia por comparación con el homólogo humano PROC, el uso de unión a ácido nucleico (por ejemplo, hibridación rigurosa en condiciones de NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, a 50 o 70 °C para un oligonucleótido; NaHPO₄ 500 mM pH 7,2, 7 % de SDS, 1 % de BSA, EDTA 1 mM, a 45 o 65 °C para un polinucleótido de 50 bases o más; y lavado apropiado) o unión a proteína (por ejemplo, inmunoensayo específico en condiciones de unión rigurosas de Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, 0,05 % de tensioactivo TWEEN 20, 1 % de BSA, a temperatura ambiente y con lavado apropiado); o algoritmos informáticos (Doolittle, Of URFS y ORFS, 1986; Gribskov y Devereux, *Sequence Analysis Primer*, 1991; y referencias citadas en el mismo).

Una "mutación" hace referencia a uno o más cambios en la secuencia de polinucleótidos y polipéptidos en comparación con proteína C nativa, y tiene al menos una función que es más activa o menos activa, una función existente que se cambia o está ausente, una función novedosa que no está presente naturalmente o combinaciones de las mismas. En contraposición, un "polimorfismo" hace referencia también a una diferencia en su secuencia en comparación con la proteína C nativa, pero los cambios no tienen necesariamente consecuencias funcionales. Las mutaciones y polimorfismos pueden hacerse por ingeniería genética o síntesis química, pero se prefiere la última para nucleótidos, aminoácidos o ligamientos no naturales. Las fusiones de dominios ligados en sus marcos de lectura son otro modo de generar diversidad en la secuencia o mezclar y hacer coincidir dominios funcionales. Por ejemplo, la proteína C homóloga y la proteína S funcionan mejor juntas y esto indica que sus secuencias pueden haber evolucionado conjuntamente para optimizar las interacciones entre la enzima y su cofactor. Pueden usarse técnicas de transposición exónica o transposición génica para seleccionar los fenotipos deseables en un trasfondo elegido (por ejemplo, dominios separables con actividades biológicas diferentes, secuencias híbridas de ser humano/ratón que ubican los determinantes de especie).

La identidad porcentual entre un par de secuencias puede calcularse por el algoritmo implementado en el programa informático BESTFIT (Smith y Waterman. *J. Mol. Biol.* 147:195-197, 1981; Pearson, *Genomics* 11: 635-650, 1991). Se ha adaptado otro algoritmo que calcula la divergencia de secuencia para una búsqueda rápida en base de datos y se ha implementado en el programa informático BLAST (Altschul *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997). En comparación con la secuencia humana, el polinucleótido o polipéptido de proteína C puede ser solo aproximadamente un 60 % idéntico a nivel aminoácido, 70% o más idéntico, 80 % o más idéntico, 90 % o más idéntico, 95 % o más idéntico, 97 % o más idéntico o más de 99 % idéntico.

Las sustituciones aminoácidas conservativas (por ejemplo, Glu/Asp, Val/Ile, Ser/Thr, Arg/Lys, Gln/Asn) pueden considerarse también cuando se hacen comparaciones, porque se espera que la similitud química de estos pares de residuos aminoácidos dé como resultado una equivalencia funcional en muchos casos. Las sustituciones aminoácidas que se espera que conserven la función biológica del polipéptido conservarían los atributos químicos de los residuos aminoácidos sustituidos, tales como hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga o tamaño de cadena lateral. En comparación con la secuencia humana, el polipéptido de proteína C puede ser solo aproximadamente un 80 % o más similar, un 90 % o más similar, un 95 % o más similar, un 97 % o más similar, un 99 % o más similar o aproximadamente un 100 % similar. La equivalencia funcional o conservación de la función biológica puede evaluarse mediante procedimientos para la determinación estructural y bioensayo.

Los codones usados pueden adaptarse también para traducción en un hospedador heterólogo adoptando las preferencias de codón del hospedador. Esto adaptaría la maquinaria traduccional del hospedador heterólogo sin un cambio sustancial de la estructura química del polipéptido.

La proteína C y variantes de la misma (concretamente, delección, transposición o duplicación de dominio, inserción, sustitución o combinaciones de las mismas) pueden usarse para determinar las relaciones de estructura-función (por ejemplo, barrido de alanina, sustitución aminoácida conservativa o no conservativa). Por ejemplo, el plegamiento y procesamiento, secreción, unión a receptor, señalización a través de EPCR, PAR-1 y/o PAR-3 e inhibición de la señalización de p53 por la proteína C, cualquiera de las demás actividades biológicas descritas en la presente memoria o combinaciones de las mismas pueden estar relacionadas con cambios en la secuencia aminoácida. Véase Wells (*Bio/Technology* 13: 647-651, 1995) y la patente de EE.UU. 5.534.617. Puede usarse la evolución dirigida mediante mutagénesis dirigida o aleatoria o la transposición génica usando proteína C para adquirir funciones nuevas y mejoradas de acuerdo con los criterios de selección. Los polipéptidos variantes mutantes y polimórficos se codifican por polinucleótidos variantes mutantes y polimórficos adecuados. Pueden estudiarse las relaciones de estructura-función de la proteína C (concretamente, estudios de SAR) usando polipéptidos variantes producidos con un constructo de expresión transfectado en una célula hospedadora con o sin expresión de proteína C endógena. Por tanto, las mutaciones en los dominios discretos de proteína C pueden estar asociadas a una actividad decreciente o incluso creciente de la función de la proteína.

Gale *et al.* (*J. Biol. Chem.* 277: 28836-28840, 2002) han demostrado que las mutaciones en los bucles de superficie de APC afectan a su actividad anticoagulante. Se ha mostrado que los mutantes de APC KKK191/193AAA (bucle 37), RR229/230AA (bucle de calcio), RR306/312AA (bucle de autólisis), RKRR306/314AAAA (bucle de autólisis) tienen aproximadamente < 10 %, 5 %, 17 % y < 2 % de la actividad anticoagulante de APC nativa, respectivamente. Un estudio de seguimiento (Mosnier, Gale y Griffin, observaciones no publicadas) ha demostrado que estos mutantes de APC con actividad anticoagulante reducida (concretamente, KKK191/193AAA, RR229/230AA, RR306/312AA y RKRR306/312AAAA) retienen la actividad antiapoptótica en el modelo de apoptosis de estaurosporina.

El zimógeno de proteína C, precursor de proteína C activada, se convierte fácilmente en proteína C activada en el cuerpo por proteasas. La proteína C puede considerarse una forma de profármaco de la proteína C activada. Por tanto, el uso de proteína C activada pretende incluir expresamente proteína C y variantes de la misma. Los

tratamientos con proteína C requerirían dosis apropiadamente mayores conocidas por los especialistas en la materia (véase a continuación).

Pueden producirse formas recombinantes de proteína C con una estructura química seleccionada (por ejemplo, nativa, mutante o polimórfica). Como ilustración, se describe un gen que codifica proteína C humana en la patente de EE.UU. 4.775.624 y puede usarse para producir proteína C humana recombinante como se describe en la patente de EE.UU. 4.981.952. La proteína C humana puede producirse recombinantemente en cultivo de tejido y activarse como se describe en la patente de EE.UU. 6.037.322. La proteína C humana normal puede purificarse de plasma, activarse y ensayarse como se describe en la patente de EE.UU. 5.084.274. Las secuencias nucleotídica y aminoácídica dadas a conocer en estas patentes pueden usarse como referencia para la proteína C.

Se prefieren dosificaciones, protocolos de dosificación y variantes de proteína C que reduzcan la hemorragia en un sujeto en comparación con la proteína C activada que es endógena en el sujeto. Las mutaciones en la secuencia de la proteína C nativa pueden separar la capacidad de reducir la señalización de p53 de otras actividades biológicas (por ejemplo, actividad anticoagulante). La actividad citoprotectora de la proteína C puede mantenerse o aumentarse así, disminuyendo los efectos secundarios indeseables de la administración de proteína C activada (por ejemplo, hemorragia en el cerebro y otros órganos).

FORMULACIONES Y SU ADMINISTRACIÓN

Las composiciones farmacéuticas como se definen en las reivindicaciones pueden administrarse *in vitro* a células en cultivo, *in vivo* a células en el cuerpo o *ex vivo* a células fuera de un sujeto que pueden devolverse entonces al cuerpo del mismo sujeto u otro. Las células pueden retirarse de, trasplantarse a o estar presentes en el sujeto (por ejemplo, modificación genética de células endoteliales *in vitro* y devolución posterior de esas células al endotelio cerebral). La célula puede ser del endotelio (por ejemplo, una célula endotelial o de músculo liso), especialmente del endotelio de un vaso cerebral. Puede ser también una neurona, una célula glial, una célula precursora, progenitora o citoblasto de las mismas u otra célula diferenciada del sistema nervioso central o periférico.

El uso de composiciones que comprenden adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable y de composiciones que comprenden adicionalmente componentes útiles para suministrar la composición al cerebro de un sujeto es conocido en la materia. La adición de dichos portadores y otros componentes a la composición de la invención está dentro del nivel de conocimientos del especialista en esta materia. Por ejemplo, un material permeable puede liberar sus contenidos en la zona local o un tubo puede dirigir los contenidos de un depósito a una localización distante del cerebro.

Una composición farmacéutica puede administrarse en forma de una formulación que está adaptada para aplicación directa al sistema nervioso central o es adecuada para pasar a través del intestino o circulación sanguínea. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden añadirse a medio de cultivo. Además del compuesto activo, dichas composiciones pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes conocidos por facilitar la administración y/o potenciar la captación. Puede administrarse en una única dosis o en múltiples dosis que se administran en momentos diferentes. Una dosis unitaria de la composición es una cantidad de APC o mutante de APC que consta al menos de la mutación KKK191-193AAA que proporciona neuroprotección, citoprotección, inhibe la apoptosis o muerte celular y/o promueve la supervivencia celular, pero no proporciona un efecto anticoagulante, profibrinolítico o antitrombótico significativo o un nivel terapéutico de dicha actividad o tiene al menos una actividad reducida en comparación con las dosis descritas anteriormente de proteína C activada. La medida de dichos valores está dentro del conocimiento del especialista en la materia: los laboratorios clínicos determinan rutinariamente estos valores con ensayos estándares y los hematólogos los clasifican como normales o anormales dependiendo de la situación.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por cualquier vía conocida. A modo de ejemplo, la composición puede administrarse por vía mucosa, pulmonar, tópica u otra localizada o sistémica (por ejemplo, entérica y parenteral). En particular, puede desearse conseguir una cantidad eficaz de proteína C activada, profármaco o variante funcional en el sistema nervioso central. Esto puede implicar una inyección de acción prolongada o un implante quirúrgico en el cerebro. "Parenteral" incluye subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal y otras técnicas de inyección o infusión, sin limitación.

Las elecciones adecuadas de cantidades y momentos de dosis, formulación y vías de administración pueden hacerse con los objetivos de conseguir una respuesta favorable en el sujeto (concretamente, eficacia) y evitar una toxicidad indebida u otro perjuicio del mismo (seguridad). Por tanto, "eficaz" hace referencia a aquellas elecciones que implican la manipulación rutinaria de las condiciones para conseguir un efecto deseado (por ejemplo, la inhibición de la apoptosis o muerte celular, promoción de la supervivencia celular, neuroprotección, citoprotección o combinaciones de las mismas). De esta manera, "cantidad eficaz" hace referencia a la cantidad total de proteína C activada, profármaco (por ejemplo, proteína C) o variante funcional que consigue el efecto deseado. La actividad puede determinarse por referencia a una baja cantidad de proteína C activada (por ejemplo, 0,005 mg/kg o menos,

0,01 mg/kg o menos, 0,02 mg/kg o menos, 0,03 mg/kg o menos, 0,04 mg/kg o menos); de forma similar, puede determinarse una "cantidad equivalente" de profármaco o variante funcional con actividad anticoagulante reducida que consiga el mismo o similar efecto neuroprotector deseado que la cantidad de referencia de proteína C activada, pero con un riesgo reducido de hemorragia debido a la actividad anticoagulante reducida.

Un bolo de la formulación administrado solo una vez a un sujeto es un plan de dosificación conveniente, aunque conseguir una concentración eficaz de proteína C activada en el cerebro puede requerir una administración más frecuente. El tratamiento puede implicar una infusión continua (por ejemplo, durante 3 h después de apoplejía) o una infusión lenta (por ejemplo, durante 24 a 72 h cuando se procura al cabo de 6 h de la apoplejía). Como alternativa, puede administrarse cada dos días, una vez por semana o una vez al mes. Los niveles de dosificación de ingredientes activos en una composición farmacéutica pueden variarse también de modo que se consiga una concentración transitoria o mantenida del compuesto o derivado del mismo en un sujeto y dé como resultado la respuesta terapéutica deseada. Pero es también conocido por los especialistas en la materia empezar con dosis a niveles menores de lo necesario para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado.

La cantidad de compuesto administrada depende de factores tales como, por ejemplo, bioactividad y biodisponibilidad del compuesto (por ejemplo, semivida en el cuerpo, estabilidad y metabolismo); propiedades químicas del compuesto (por ejemplo, peso molecular, hidrofobicidad y solubilidad); vía y plan de administración y similares. Se entenderá también que el nivel de dosis específico para conseguir por cualquier sujeto particular puede depender de una variedad de factores, incluyendo edad, salud, historial médico, peso, combinación con uno o más fármacos y gravedad de la enfermedad.

Por ejemplo, puede usarse una dosis baja para evitar la apoptosis o muerte celular y/o promover la supervivencia celular. Estos efectos son diferentes de la inhibición por APC de trombosis, coagulación y/o inflamación que se obtuvieron a mayores dosis. Los efectos antiinflamatorios de la APC están posiblemente mediados por la regulación negativa de la ruta de NF- κ B. En sistemas homólogos (por ejemplo, APC nativa o recombinante humana administrada a pacientes), puede ser suficiente un solo bolo de APC (por ejemplo, 0,005 mg/kg o menos, 0,01 mg/kg o menos, 0,02 mg/kg o menos, 0,03 mg/kg o menos, 0,04 mg/kg o menos administrado durante 1 min) para ser directamente neuroprotector sin tener un efecto antitrombótico significativo en la circulación cerebral. El tratamiento previo infundía APC a una dosificación de 0,01 mg/kg/h a 0,05 mg/kg/h durante 4 a 96 h. Por tanto, menos de 0,005 mg/kg, menos de 0,01 mg/kg, menos de 0,02 mg/kg, menos de 0,03 mg/kg o menos de 0,04 mg/kg son dosis que pueden formularse y administrarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente memoria. Puede calcularse una cantidad ilustrativa para un ser humano adulto de 70 kg y esta puede ser suficiente para tratar seres humanos de entre 50 y 90 kg.

La cantidad eficaz o equivalente puede empaquetarse en una "dosis unitaria" con instrucciones escritas para conseguir uno o más efectos deseados y/o evitar uno o más efectos indeseados. Las formulaciones, vías de administración y planes de dosificación anteriormente mencionados son meramente ilustrativos de las técnicas que pueden usarse.

El término "tratamiento" hace referencia, entre otros, a reducir o aliviar uno o más síntomas de enfermedad neurodegenerativa. Por ejemplo, la terapia estándar tal como el tratamiento de apoplejía con un activador de plasminógeno de tejido puede compararse con y sin proteína C activada, un fármaco o una variante del mismo. Esto incluye la terapia de un sujeto afectado o la profilaxis de un sujeto en riesgo. Para un sujeto dado, puede determinarse la mejora de un síntoma, su empeoramiento, regresión o progresión mediante medidas objetivas o subjetivas. El sujeto necesitado de tratamiento puede estar en riesgo de o ya afectado por una enfermedad neurodegenerativa; el tratamiento puede iniciarse antes y/o después del diagnóstico. En un paciente, la indicación de que el tratamiento es eficaz puede ser un resultado neurológico, funciones motoras o sensoriales, funciones cognitivas, funciones psicomotoras, funciones neurológicas motoras, funciones intelectivas integrativas superiores, memoria, visión o audición mejorados; daño y lesión cerebral reducidos como se evidencia por análisis no invasivo por imágenes (por ejemplo, IRM o imagenología por perfusión cerebral) o combinaciones de los mismos. Este efecto puede confirmarse por análisis neuropatológico del tejido cerebral. En última instancia, la reducción de un proceso neurodegenerativo por estabilización de las funciones de células endoteliales cerebrales y la prevención de su muerte conducirá a mejoras del flujo sanguíneo cerebral (CBF) y la normalización de las funciones reguladoras del CBF. En un estudio preclínico, pueden demostrarse en un modelo animal los hallazgos neurológicos o de comportamiento, la reducción de la apoptosis o un marcador de la misma (por ejemplo, contenido y fragmentación de ADN), la supervivencia celular aumentada, la muerte celular disminuida o combinaciones de los mismos. Estos beneficios pueden conseguirse con poca o ninguna anticoagulación sistémica significativa en sujetos humanos o animales. A nivel celular, pueden observarse una señalización de p53 reducida, relación de Bax/Bcl-2 normalizada, señalización por caspasa 3 reducida o combinaciones de las mismas. Puede determinarse el aumento o disminución por comparación con el tratamiento con o sin proteína C activada, un profármaco o una variante de la misma, o con los efectos esperados de la enfermedad no tratada.

El tratamiento puede implicar también otros modos y agentes de tratamiento existentes (por ejemplo, proteína S, agentes fibrinolíticos o antitrombóticos, agentes antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos). Por tanto, puede practicarse un tratamiento de combinación (por ejemplo, APC y tPA administradas simultánea o secuencialmente).

5 EJEMPLOS

La APC, un factor anticoagulante y antiinflamatorio sistémico¹⁻³, reduce el daño orgánico en modelos animales de sepsis, lesión isquémica y apoplejía^{1,4,5}. La APC reduce significativamente la mortalidad en pacientes con sepsis grave⁶. No es conocido si la APC actúa como factor de supervivencia celular directo o si la neuroprotección por APC^{5,7} es resultado de su efecto anticoagulante y antiinflamatorio¹⁻³. Aquí se muestra que la APC previene la apoptosis en endotelio cerebral humano hipóxico mediante la inhibición dependiente de la transcripción de la proteína supresora tumoral p53, la normalización de la relación Bax/Bcl-2 y la reducción de la señalización de caspasa 3. Estos mecanismos son distintos de la regulación positiva anteriormente mostrada de genes antiapoptóticos (por ejemplo, proteína A1 relacionada con Bcl2, inhibidor de la apoptosis 1) por APC en células endoteliales de vena umbilical humana^{8,9}. La citoprotección por APC del endotelio cerebral *in vitro* requería el receptor de proteína C endotelial (EPCR) y el receptor activado de proteasa 1 (PAR-1), así como la actividad neuroprotectora *in vivo* de APC en un modelo de apoplejía isquémica⁵ en ratones con deficiencia grave de EPCR¹⁰, consistentemente con trabajos que muestran los efectos directos de la APC sobre células cultivadas a través de EPCR y PAR-1⁹. Además, los efectos neuroprotectores *in vivo* de APC a dosis baja parecían ser independientes de su actividad anticoagulante. Por tanto, la APC protege al cerebro de la isquemia actuando directamente sobre células cerebrales.

Además, se muestra que la APC puede proteger directamente a neuronas alteradas de lesión celular y apoptosis. Se reseña que la APC interfiere con la apoptosis por D-aspartato de N-metilo (NMDA) en neuronas corticales de ratón cultivadas bloqueando la señalización proapoptótica de p53 y caspasa 3. Las infusiones intracerebrales directas de APC reducían significativamente las lesiones cerebrales excitotóxicas por NMDA en ratones, sugiriendo que los efectos sistémicos de la APC no son necesarios para la protección cerebral. Los efectos neuroprotectores directos de la APC sobre neuronas de ratón alteradas *in vitro* e *in vivo* requerían PAR-1 y PAR-3 en las neuronas, consistentemente con los hallazgos en células endoteliales cerebrales hipóxicas de que la señalización dependiente de EPCR por APC a través de PAR-1 previene la apoptosis dependiente de p53 de endotelio. Por tanto, el presente trabajo demuestra también que la APC previene directamente la apoptosis neuronal inducida por NMDA *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo que la APC puede limitar el daño neuronal en trastornos neurodegenerativos causados por la hiperestimulación de receptores de NMDA.

35 EJEMPLO 1:

Reactivos y anticuerpos. Se prepararon APC humana, zimógeno de proteína C, Ser360Ala-APC mutante que carece de la serina del sitio activo, APC de murino recombinante e IgG de ratón anti-APC humana (anticuerpo C3) como se describe^{17,24} o usando técnicas conocidas. Para transferencias Western e inmunotinción, se usaron los siguientes anticuerpos: p53, monoclonal de ratón anti-humano, 1:100 (0,4 mg/ml, DAKO); Bcl-2, monoclonal de ratón anti-humano, 1:100 (0,2 mg/ml, Santa Cruz Biologics); Bax, monoclonal de ratón anti-humano, 1:100 (0,2 mg/ml, Santa Cruz Biologics); proteína A1 relacionada con Bcl2 o Bcl2A1, policlonal de conejo anti-humano 1:100 (0,2 mg/ml, Santa Cruz Biologics); inhibidor de la apoptosis 1 o cIAP1, policlonal de conejo anti-humano 1:100 (0,2 mg/ml, Santa Cruz Biologics); óxido nítrico sintasa endotelial o eNOS, policlonal de conejo anti-humano, 1:100 (0,2 mg/ml, Santa Cruz Biologics); β-actina, policlonal de cabra anti-humano, 1:2500 (0,2 mg/ml, Santa Cruz Biologics); caspasa 3 activa, de conejo anti-humano, 1:250 (1 mg/ml, Promega); factor de Von Willebrand, monoclonal de conejo anti-humano, 1:200 (5,6 mg/ml, DAKO); GFAP, proteína ácida fibrilar glial, policlonal de ratón anti-humano, 1:500 (11,7 mg/ml, DAKO) y CD11 b, monoclonal de ratón anti-humano, 1:100 (0,2 mg/ml, Oncogene). Los anticuerpos que bloquean la activación de PAR-1 (H-111), PAR-2 (SAM-11) o PAR-3 (H-103) se obtuvieron de Santa Cruz Biologics. Se han descrito anticuerpos anti-EPCR que bloquean (RCR-252) o no bloquean (RCR-92) la unión de APC¹⁸. Se obtuvieron los péptidos agonistas de PAR-1 y PAR-2 TFLLRNPNDK y SLIGRL, respectivamente, de Ana Spec (San José, CA). La hirudina era de Sigma (St. Louis, MO).

Células endoteliales cerebrales microvasculares humanas (BEC). Se aislaron BEC primarias de autopsias rápidas (menos de 3 h) de individuos jóvenes neurológicamente normales después de traumatismo. Se caracterizaron y cultivaron las BEC como se describe anteriormente²⁷. Después de clasificación por FACS usando células Dil-Ac-LDL, más de un 98 % de las células eran positivas de los marcadores endoteliales de factor de von Willebrand y CD105, y negativas de GFAP (astrocitos), CD11 b (macrófagos/microglía) y α-actina (células de músculo liso). Se usaron células de pase temprano (P3-P5) para todos los estudios.

Modelo de hipoxia. Se usó hipoxia/aglicemia como modelo *in vitro* de lesión isquémica como se describe¹⁴. Brevemente, se sembraron $0,7 \times 10^6$ BEC en placas de 100 mm en medio RPMI1640 suplementado con suero fetal bovino al 20 %, suministro de crecimiento de célula endotelial (30 µg/ml, Sigma) y heparina (5 U/ml, Sigma). 24 horas después, se lavaron las células dos veces con PBS y se transfirieron entonces a medio Eagle modificado por

Dulbecco exento de suero (DMEM) sin glucosa y se expusieron a hipoxia grave (menos de 2% de oxígeno) usando una cámara anaeróbica (Forma Scientific) equipada con una incubadora humidificada de temperatura controlada. Se purgó todo el sistema con una atmósfera de 95 % de N₂/5 % de CO₂. Se monitorizaron los niveles de oxígeno en la incubadora mediante O₂ Fyrite (Forma Scientific). Se mantuvieron las BEC de control en DMEM suplementado con 20 % de oxígeno y glucosa 5 mM. En la mayoría de estudios, se efectuaron los experimentos a las 8 h de cultivo, cuando la lesión hipóxica era ya máxima.

Detección de lesión y apoptosis celular. Se detectó inicialmente la lesión celular por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de cultivo celular usando un ensayo de LDH (Sigma) según las instrucciones del fabricante. Se efectuaron tinciones con Hoechst y TUNEL para determinar la apoptosis en células fijadas con acetona. Para la tinción con Hoechst, se tiñeron las células durante 5 min con el tinte de unión a ADN fluorescente Hoechst 33.342 1 µg/ml (Sigma). Se llevó a cabo el ensayo TUNEL según las instrucciones del fabricante (Phoenix Flow Systems). Se observaron las imágenes usando un microscopio Olympus AX70.

Análisis de transferencia Western. Se recogieron muestras de proteína para análisis de transferencia Western después de 2, 4, 8 o 24 h de hipoxia o normoxia (control). Se determinó la concentración de proteína usando el kit de ácido bicinonínico (Pierce). Se separaron cantidades iguales de proteína (10 µg/carril) por electroforesis en gel de 10 % de SDS-poliacrilamida (PAGE) y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Se sondearon las membranas con diferentes anticuerpos usando técnicas de inmunotransferencia estándares. Se determinó la abundancia relativa de cada proteína por densitometría de barrido usando β-actina como control interno. Se efectuaron las comparaciones entre diferentes tratamientos dentro del intervalo de intensidad lineal de sus señales respectivas.

Análisis de inmunofluorescencia. Se cultivaron BEC (5,6 x 10⁴/pocillo, placa de 12 pocillos) en cubreobjetos recubiertos con colágeno. Después de cada tratamiento, se fijaron las células con acetona y se incubaron con anticuerpo primario a 4 °C durante una noche, seguido de IgG de conejo conjugada con rodamina (para tinción de caspasa 3 activa). Se examinaron entonces las imágenes usando un microscopio Olympus AX70.

Análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-transcripción inversa (TI). Se aisló el ARN total de BEC usando el minikit RNeasy (Qiagen). Se usó aproximadamente 1 µg de ARN total para las síntesis de ADNc con el sistema de síntesis de primera hebra Super-Script™ (Invitrogen). Se realizó una PCR-TI semicuantitativa con 3 µl de producto de TI; las condiciones del ciclo térmico eran de 94 °C durante 4 min; 94 °C durante 30 s/60 °C durante 30 s/72 °C durante 45 s (30 ciclos); 72 °C durante 10 min. Se adquirieron los conjuntos de cebadores específicos de p53 y GAPDH en Biosource International. Los productos de PCR (p53: 213 pb; GAPDH: 231 pb) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y se detectaron con tinción con bromuro de etidio. Se efectuaron las comparaciones entre diferentes tratamientos mediante densitometría de barrido usando 30 ciclos que estaban dentro de intervalo lineal de la señal.

Modelo animal in vivo de apoplejía. Se usó una técnica de MCAO intravascular modificada⁵ para inducir la apoplejía. Se administraron APC recombinante de murino o vehículo 10 min después de la MCAO por la vena femoral. Se monitorizó el CBF por flujometría láser Doppler (Transonic Systems) como se describe⁵. El procedimiento se consideró exitoso si se observaba una caída mayor o igual al 80 % de CBF inmediatamente después de colocar la sutura. Se midieron los gases sanguíneos arteriales antes y durante la MCAO como se describe⁵. Se efectuaron estudios neurológicos a las 24 h y se sacrificaron los animales en ese momento para análisis neuropatológico. Todos los animales sobrevivieron 24 h. Los exámenes neurológicos se puntuaron como sigue: sin déficit neurológico (0), incapacidad de extender totalmente la pata delantera izquierda (1), giro a la izquierda (2), círculos a la izquierda (3), incapacidad de andar espontáneamente (4) y muerte relacionada con apoplejía (5). Se incubaron secciones coronales de cerebro de 1 mm no fijadas en cloruro de trifeníltetrazolio al 2 % en tampón fosfato (pH 7,4) y se exhibieron las secciones coronales en serie en una pantalla de video digitalizador (Jandel Scientific). Se calcularon el volumen de infarto y edema cerebral con la corrección de Swanson como se describe⁵. Se determinó el efecto de la APC de murino (0,2 mg/kg) en ratones con deficiencia grave de EPCR¹⁰ y en ratones C57BL/6 de tipo silvestre en presencia y ausencia de anticuerpos anti-PAR-1 (H-111, 40 µg/ratón) infundidos 10 min antes de la MCAO. En un estudio separado, se compararon los efectos de la APC de murino a dosis baja (0,04 mg/kg) y APC de murino a dosis alta (0,2 mg/kg). En estos experimentos, se cuantificó la fibrina por transferencia Western con anticuerpo anti-fibrina II (NYB-T2G1, Accurate Chemical Scientific Corp.) y se tiñeron los leucocitos con anticuerpo de CD11 b (DAKO, 1:250)⁵.

Estadísticas. Se presentaron los datos como media ± EEM. Se usó ANOVA para determinar las diferencias estadísticamente significativas; se compararon los datos no paramétricos (puntuaciones del resultado neurológico) por la prueba de Kruskal-Wallis. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

La disfunción endotelial es crítica durante la lesión isquémica, incluyendo el daño cerebral isquémico. Las señales de estrés¹¹⁻¹³ e hipoxia¹⁴⁻¹⁶ causan la lesión celular parcialmente mediante la acción de la proteína supresora de tumor p53. Para ensayar la hipótesis de que la APC ejerce efectos antiapoptóticos durante el daño cerebral

isquémico al evitar la apoptosis mediada por p53, se usó un modelo de lesión de célula endotelial cerebral (BEC) hipóxica¹⁴. La Fig. 1a ilustra la liberación dependiente del tiempo de lactato deshidrogenasa (LDH) de BEC humanas primarias hipóxicas. La liberación de LDH (corregida para la liberación basal en condiciones normóxicas) indicaba lesión hipóxica en un 60 a 70 % de las células de entre 8 y 24 h. La APC ejercía un efecto citoprotector dependiente de la dosis (Fig. 1 b) y prevenía la lesión hipóxica en un 55 a 65 % de las células. La hirudina, un inhibidor de trombina específico (1 µg/ml), no tenía efecto sobre la actividad protectora de APC. Las células normóxicas eran raramente positivas de TUNEL (Fig. 1c, panel superior izquierdo; Fig. 1 d). En contraposición, las BEC hipóxicas eran positivas de TUNEL en más de un 65 % y exhibían también condensación de cromatina y contracción nuclear (Fig. 1c, paneles medios; Fig. 1d). En presencia de APC e hipoxia, el número de células positivas de TUNEL y células con cambios nucleares apoptóticos se reducía significativamente en hasta un 60 % (Fig. 1c, paneles inferiores; Fig. 1d). La Fig. 1d demuestra el efecto antiapoptótico dependiente de la dosis de la APC en BEC hipóxicas, con CE₅₀ de aproximadamente 15 nM. Estos estudios se efectuaron con APC humana administrada a células humanas.

Para definir la especificidad de los efectos protectores de APC, se examinaron los efectos de hipoxia/isquemia sobre BEC en presencia de Ser360Ala-APC mutante recombinante que carece de la serina del sitio activo¹⁷, zimógeno de proteína C, APC termoinactivada y APC más el anticuerpo monoclonal neutralizante C3 anti-APC. La Fig. 1e confirmó que solo la APC confería citoprotección directa, mientras que la APC mutante o zimógeno de proteína C no eran protectores. Esto sugiere que la serina del sitio activo es necesaria para los efectos citoprotectores de APC, planteando la posibilidad de que los receptores de tipo receptor activado de proteasa (PAR) puedan estar implicados.

Por lo tanto, se estudiaron a continuación los efectos de la APC en presencia de anticuerpos de bloqueo de la escisión frente a PAR-1, PAR-2 y PAR-3 cuyos transcritos de ARNm estaban presentes en BEC humanas, como se confirmó por el análisis de expresión génica en micromatriz. El bloqueo del sitio de escisión de PAR-1, pero no de PAR-2, dio como resultado una pérdida de la citoprotección mediada por APC (Fig. 1e). El anticuerpo neutralizante específico del dominio independiente de escisión N-terminal de PAR-1 o el anticuerpo contra el sitio de escisión de PAR-3 no tenían efecto. Un anticuerpo contra el sitio de unión de APC en el receptor de proteína C endotelial (EPCR)¹⁸ bloqueaba la citoprotección mediada por APC, en contraposición con un anticuerpo de control anti-EPCR que no inhibe la unión de APC y que no tenía efecto (Fig. 1e). El péptido agonista de PAR-1 TFLLRNPNDK, pero no el péptido agonista de PAR-2 SLIGRL, causaba efectos citoprotectores (Fig. 1e), y bloquear el sitio de escisión de PAR-1 por anticuerpos no daba como resultado la pérdida de la citoprotección mediada por péptido agonista de PAR-1. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la unión de APC a EPCR y la activación de PAR-1 son necesarias para rescatar el endotelio cerebral de la apoptosis inducida por hipoxia. Estos hallazgos son consistentes con la activación mediada por APC de proteína cinasas activadas por mitógeno recientemente demostrada en células endoteliales de vena umbilical humana a través de EPCR y PAR-1⁹.

Se determinó a continuación cómo la APC interfiere con la cascada molecular implicada en la apoptosis en BEC hipóxicas. Se demostró en primer lugar un aumento de los niveles totales de p53 en BEC hipóxicas de 2,1 veces y 1,5 veces a las 2 y 4 h, respectivamente (Fig. 2a-2b). Los aumentos de Bax, un miembro proapoptótico de la familia del gen Bcl-2 y un producto transcripcional de la acción de p53¹⁹, eran análogos a los de p53, y Bax permanecía elevada a lo largo de las 24 h (Fig. 2a-2b). La hipoxia suprimía la proteína Bcl-2, un inhibidor de la apoptosis²⁰, a un 30-40 % de los valores de control (Fig. 2a-2b). Estos resultados indicaban que el factor de transcripción proapoptótico p53 y una relación aumentada de Bax/Bcl-2 proapoptótica estaban implicados en la lesión isquémica del endotelio cerebral, como se ha reseñado anteriormente para lesión hipóxica en varios tipos de célula diferentes¹⁴⁻¹⁶. Esta cadena de acontecimientos daba como resultado la activación de la caspasa 3, una proteasa importante que desempeña un papel en el desmantelamiento del núcleo por proteólisis de varios sustratos nucleares²¹, en aproximadamente un 65 % de las células (Fig. 2e, panel medio izquierdo). Las células positivas de caspasa 3 tenían cromatina condensada y/o fragmentación nuclear en tinción con Hoechst consistentemente con la apoptosis (Fig. 2e, panel medio derecho) y actividad aumentada de caspasa 3.

La APC reducía los niveles aumentados de p53 en BEC hipóxicas a las 2 y 4 h en un 77 y 79 % y de Bax en un 65 y 68 %, respectivamente (Fig. 2c-2d). En contraposición, la APC aumentaba notablemente la cantidad de Bcl-2 a las 2 y 4 h de hipoxia en comparación con controles tratados con vehículo (Fig. 2c-2d). Como sería predecible, las normalizaciones inducidas por APC de los niveles de p53 y de la relación de Bax/Bcl-2 estaban asociadas a una reducción significativa (mayor del 60 %) de las células positivas de caspasa 3 en presencia de APC (Fig. 2e, panel inferior). Se observaron también reducciones similares del número de células que exhiben cambios nucleares apoptóticos en presencia de APC.

Con respecto al mecanismo intracelular de la inhibición de p53 inducida por APC en BEC hipóxicas, se evaluaron varios procesos conocidos por influir en la estabilidad y el aclaramiento proteolítico de p53, incluyendo transcripción y/o traducción, degradación proteolítica y/o modificaciones postraduccionales¹¹⁻¹³. La hipoxia inducía un aumento transitorio rápido de los transcritos de ARNm de p53 en los primeros 30 min, que se inhibía fuertemente por la APC (Fig. 3a-3b). En puntos temporales posteriores, la hipoxia no alteraba los niveles de transcritos de p53 y se

normalizaban al cabo de 1 h (Fig. 3). En contraposición con las BEC hipóxicas, la APC no afectaba a los niveles de p53 en células normóxicas. Una ruta importante que regula la degradación proteosómica postraducciona de p53 implica la unión a la oncoproteína diminuta doble de murino 2 (Mdm2), mientras que la fosforilación de p53 estabiliza la proteína al impedir la unión de Mdm2 y la posterior degradación proteosómica de p53^{11,13}. En el presente modelo de hipoxia, era indetectable la fosforilación de p53 en Ser20 o Ser15, un sitio de fosforilación conocido para cinasa mutada de ataxia telangiectasia en respuesta al daño de ADN¹². Los cambios en la proteína Mdm2 durante la hipoxia eran indetectables, y no se observaron efectos directos de la APC sobre los niveles de proteína Mdm2.

Para determinar si otros genes antiapoptóticos que están regulados positivamente por APC en HUVEC^{8,9} actúan sinérgicamente con la ruta de p53 en la protección celular endotelial cerebral humana, se estudió la expresión de proteína A1 relacionada con Bcl2 (Bcl2A1), inhibidor de la proteína de apoptosis 1 (clAP1) y óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Ni la hipoxia ni la APC alteraron significativamente los niveles de Bcl2A1 (Fig. 3c), consistentemente con el concepto de que la Bcl2A1 no tiene un efecto marcado sobre la susceptibilidad de HUVEC de experimentar apoptosis en respuesta a estaurosporina u otros estímulos apoptóticos²². La APC no afectaba a los niveles de clAP1 (Fig. 3c) ni eNOS, que aumentaban por hipoxia a las 4 h como se reseña²³. Estos resultados *in vitro* implican que la ruta antiapoptótica de APC en el escenario de isquemia endotelial cerebral implica la activación dependiente de EPCR extracelular de PAR-1, que da como resultado la inhibición intracelular de p53 y la regulación negativa de Bax con la consiguiente disminución de la relación de Bax/Bcl-2.

Para determinar si la citoprotección *in vivo* de APC tiene requisitos similares para EPCR y PAR-1 a los mostrados anteriormente, se estudiaron los efectos de la APC durante apoplejía isquémica focal⁵ en ratones con deficiencia grave de EPCR (menos de 10 % del tipo silvestre)¹⁰. La administración de APC de murino (0,2 mg/kg) a ratones con deficiencia grave de EPCR y controles genéticamente coincidentes reducía los volúmenes de infarto cerebral en un 32 y 56 % (Fig. 4a), respectivamente, y de edema cerebral en un 45 y 73 % (Fig. 4b), respectivamente, en comparación con los controles tratados con vehículo. Por tanto, se perdió aproximadamente la mitad del efecto neuroprotector observado para APC 0,2 mg/kg en ratones con una deficiencia grave de EPCR, sugiriendo un importante papel *in vivo* de EPCR en la mediación de los efectos neuroprotectores de APC. Para mostrar el papel de PAR-1 *in vivo*, 10 min antes de establecer la oclusión de arteria cerebral media (MCAO), se infundió en ratones un anticuerpo de bloqueo de la escisión anti-PAR-1 que reacciona de forma cruzada con PAR-1 de murino, y 10 min después de la MCAO, los ratones recibieron vehículo o APC (0,2 mg/kg). Había un aumento significativo de 1,5 veces y 2 veces de los volúmenes de infarto (Fig. 4c) y edema (Fig. 4d), respectivamente, a las 24 h entre los ratones tratados con APC más anticuerpo anti-PAR-1 y ratones tratados con APC solo. Esto indicaba que, en presencia de anticuerpo anti-PAR-1, la capacidad de APC de proteger a ratones eficazmente frente al ataque isquémico focal se reduce notablemente. Estos estudios *in vivo* corroboraron los hallazgos mecanísticos *in vitro*, demostrando que los dos receptores esenciales para la citoprotección de APC de endotelio cerebral durante la isquemia *in vitro*, concretamente EPCR y PAR-1, contribuyen significativamente a los efectos neuroprotectores de APC *in vivo*.

Para valorar si los mecanismos *in vivo* de APC implican rutas anticoagulantes y antiinflamatorias así como efectos antiapoptóticos, se determinó el volumen de lesión cerebral, cambio de flujo sanguíneo cerebral (CBF) y deposición de fibrina cerebrovascular y neutrófilos⁵ en presencia de APC a dosis baja (0,02 o 0,04 mg/kg) o APC a dosis alta (0,2 mg/kg) administrada 10 min después del establecimiento de la MCAO. La APC a dosis baja reducía significativamente la puntuación neurológica motora (Fig. 4e) y el volumen de lesión cerebral (Fig. 4f) en un 73 y 38 %, respectivamente, en ausencia de mejora significativa del CBF postisquémico (Fig. 4g) o reducción de la deposición de fibrina (Fig. 4h) y/o neutrófilos (Fig. 4i). En contraposición, la APC a dosis alta reducía la puntuación neurológica motora (Fig. 4e) y el volumen de lesión cerebral (Fig. 4f) en un 91 y 65 %, respectivamente, y causaba también una mejora del 30 % del CBF postisquémico (Fig. 4e), con reducciones significativas de fibrina (Fig. 4h) y una reducción moderada de neutrófilos (Fig. 4i). Por lo tanto, parece que la actividad neuroprotectora de APC *in vivo* es distinguible de la actividad anticoagulante de APC, como se predice por los mecanismos citoprotectores que implican los efectos directos de APC sobre PAR-1 y EPCR. Estos datos para diferentes dosis de APC implican que los efectos anticoagulantes de APC potencian el CBF postisquémico al reducir la acumulación de fibrina, pero plantean la pregunta de si la reducción observada del número de leucocitos infiltrantes del cerebro isquémico puede ser resultado de los efectos antiapoptóticos y citoprotectores de APC, en lugar de debida al efecto primario de la APC sobre el tráfico de neutrófilos de la barrera hematoencefálica⁵.

Se investigó a continuación la actividad de APC en modelos de lesión neuronal. Para ensayar si la APC es protectora neuronal directamente, se estudiaron sus efectos sobre la apoptosis inducida por D-aspartato de N-metilo (NMDA) en neuronas corticales de ratón cultivadas²⁹ y en lesiones cerebrales excitotóxicas inducidas por NMDA *in vivo* producidas por microinyecciones de NMDA estereotácticas en el núcleo caudado de ratón³⁰. La hiperestimulación de receptores de NMDA está implicada en la neurodegeneración en apoplejía y lesión cerebral traumática y está asociada a una serie de trastornos neurodegenerativos incluyendo enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Huntington^{31,32}. Varios mecanismos implicados potencialmente en la apoptosis neuronal inducida por NMDA incluyen aumentos de p53 y Bax³³⁻³⁵, un miembro proapoptótico de la familia génica de Bcl-2 y un

producto transcripcional de p53¹⁹, la activación de la señalización de caspasa 3^{36,37}, que da como resultado la proteólisis de varios sustratos nucleares, y la generación de óxido nítrico^{29,30,38}. Puesto que la señalización por APC dependiente de EPCR a través de PAR-1 evita la apoptosis dependiente de p53 del endotelio como se muestra en las Fig. 1-4³⁹, se teoriza que la APC puede ejercer sus efectos protectores neuronales directos sobre la apoptosis inducida por NMDA bloqueando la señalización de p53 y caspasa 3 a través de PAR en neuronas.

Se reseña aquí que la APC bloquea la apoptosis inducida por NMDA en neuronas corticales de ratón cultivadas reduciendo la señalización proapoptótica de p53 y caspasa 3. Además, las infusiones intracerebrales directas de APC reducían significativamente las lesiones cerebrales excitotóxicas por NMDA en ratones. Los efectos neuroprotectores directos de APC sobre neuronas de ratón alteradas *in vitro* e *in vivo* requerían PAR-1 y PAR-3 en las neuronas, sugiriendo que la APC puede limitar el daño neuronal en trastornos neurodegenerativos causados por la hiperestimulación de receptores de NMDA.

EJEMPLO 2:

Reactivos y anticuerpos. Se adquirió el D-aspartato de N-metilo (NMDA) de Sigma (St. Louis, MO). Se prepararon APC humana, APC de ratón recombinante, zimógeno de proteína C, mutantes de APC e IgG de ratón contra APC humana (anticuerpo C3) como se describe^{17,26}. Para análisis de transferencia Western o inmunotinción, se usaron anticuerpo policlonal de conejo contra caspasa 3 activa humana (1:250, 1 mg/ml; Promega, Madison, WI), Bcl-2 humana (1:100, 0,2 mg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), 53 humana (1:1000, Cell Signaling, Beverly, MA) y NMDA ξ 1 humana (NR1, 1:1000, 0,2 mg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), reaccionando todos de forma cruzada con los correspondientes antígenos de ratón; NR2A de ratón (1:500, 1 mg/ml; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), Bax de ratón (1:100, Chemicon, Temecula, CA) y anticuerpo policlonal de cabra contra β -actina humana (1:2.500, 0,2 mg/ml; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) que reacciona de forma cruzada con β -actina de ratón. Todos los anticuerpos contra PAR eran de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos policlonales de conejo contra PAR-1 humano (H-111) y PAR-3 humano (H-103) y el anticuerpo monoclonal de ratón contra PAR-2 humano (SAM11) reaccionan todos de forma cruzada con los correspondiente PAR de ratón; esto se ha confirmado en el presente estudio mediante inmunotinción positiva en cultivos neuronales corticales primarios de ratón. Se usaron también como controles negativos anticuerpos policlonales de cabra contra el extremo N de PAR-1 de ratón (S-19) y PAR-2 de ratón (S-19) y el extremo C de PAR-3 de ratón (M-20) y PAR-4 de ratón (M-20). Se obtuvieron los péptidos agonistas de PAR-1 y PAR-2 TFLLRNPNDK y SLIGRL en Ana Spec (San José, CA).

Cultivo neuronal. Se establecieron cultivos neuronales primarios como se describe⁴⁰. Brevemente, se extrajo corteza cerebral de ratones C57BL/6J fetales a los 16 días de gestación, se trataron con tripsina durante 10 min a 37 °C y se disociaron por trituración. Se sembraron suspensiones celulares disociadas a 5×10^5 células por pocillo en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos o a 4×10^6 células por disco en discos de cultivo de tejido de 60 mm recubiertos con poli-D-lisina, en medio neurobasal exento de suero más suplemento B27 (Gibco BRL, Rockville, MD). El medio suprime el crecimiento glial a menos de un 2 % de la población celular total. Se confirmó la ausencia de astrocitos por la falta de tinción de proteína ácida fibrilar glial. Se mantuvieron los cultivos en una incubadora a 5 % de CO₂ a 37 °C durante 7 días antes del tratamiento. Se reemplazó el medio cada 3 días.

Apoptosis inducida por NMDA en cultivo neuronal

Para la inducción de apoptosis neuronal, se expusieron los cultivos durante 10 min a NMDA 300 μ M/glicina 5 μ M en disolución salina equilibrada de Earle exenta de Mg²⁺ (EBSS) como se describe²⁹. Se expusieron los cultivos de control a EBSS sola. Después de la exposición, se aclararon los cultivos con EBSS, se devolvieron al medio de cultivo original y se incubaron con diferentes concentraciones de APC humana (1-100 nM) o APC de ratón recombinante (1-100 nM) durante 0, 3, 6, 12, 24 y 36 h, zimógeno de proteína C (100 nM), IgG anti-APC (C3, 11 μ g/ml), Ser360Ala-APC (100 nM) o APC hervida (100 nM) durante 24 h. Se añadieron diferentes anticuerpos anti-PAR (20 μ g/ml) al medio de incubación simultáneamente a APC recombinante de ratón (10 nM) después de exposición a NMDA. Se añadieron TFLLRNPNDK (10 μ M) y SLIGRL (100 μ M) al medio de incubación después de exposición a NMDA.

Detección de la apoptosis. Se visualizaron las células apoptóticas mediante un ensayo de marcaje del extremo cortado de digoxigenina-dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal *in situ* (TUNEL) según las instrucciones del fabricante (Intergen Company, Purchase, NY). Se contratiñeron las células con el tinte fluorescente de unión a ADN Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) a 1 mg/ml durante 10 min a temperatura ambiente para revelar la morfología nuclear. Se expresó el número de células apoptóticas como el porcentaje de células positivas de TUNEL del número total de núcleos determinado por tinción con Hoechst. Se contaron las células en 10 a 20 campos aleatorios (30x aumentos) por dos observadores independientes desconocedores de las condiciones experimentales. Se restó el número de células en condiciones basales (solo vehículo) del número de células apoptóticas en grupos de control y experimentales.

Doble marcaje para fragmentación de ADN in situ y caspasa 3. Después de la visualización del ADN fragmentado por TUNEL, se permeabilizaron las células con Tween al 0,4 % durante 30 minutos y se bloquearon con suero de cabra normal al 10 % en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se aplicó un anticuerpo anti-caspasa 3 primario durante una noche a 4 °C. Después de lavar con PBS tres veces, se incubaron las células con IgG de cabra anti-conejo conjugada con rodamina (1:150) durante 1 h a 37 °C.

Análisis de la actividad caspasa 3. Se analizó la actividad proteolítica de la caspasa 3 usando el kit de ensayo colorimétrico de caspasa ApoAlert (Clontech, Palo Alto, CA). Se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis celular. Se incubó la proteína (50 µg) con sustrato de caspasa 50 µM (DEVD-pNA) a 37 °C. Se registró la liberación colorimétrica de p-nitroanilina del sustrato Ac-DEVD-pNA cada 10 min a 405 nm con un lector de microplacas. Se expresó la actividad enzimática en unidades arbitrarias por mg de proteína por min.

Análisis de transferencia Western. Se prepararon como se describe extractos completos de proteína celular y nuclear o fracciones de membrana celular. Se determinó la concentración de proteína usando los ensayos de proteína de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA); se analizaron 10-50 µg de proteína por PAGE-SDS al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se bloquearon las membranas con leche desnatada al 5 % en TBST (TRIS 100 mM, pH 8,0, NaCl 1,5 M, 0,1 % de Tween 20) durante 1 h. Se incubaron las membranas durante una noche con anticuerpos primarios en PBST y se lavaron e incubaron entonces con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante durante 1 h. Se detectó la inmunorreactividad usando el sistema de detección ECL (Amersham, Piscataway, NJ). Se determinó la abundancia relativa de cada proteína por densitometría de barrido, usando β-actina como control interno. Se promediaron los datos de múltiples transferencias Western (n= 3-5) para el análisis estadístico.

Ensayo de desplazamiento de la movilidad electroforética (EMSA). Se extrajeron proteínas nucleares de cultivos neuronales corticales a las 0, 0,5, 1, 2, 3 y 6 h después de exposición a NMDA usando los reactivos de extracción nuclear y citoplásmica NE-PER™ según las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL). Se expusieron células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) a lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) (200 ng/ml) durante 4 h como control positivo. Se determinó la activación de NF-κB por su unión a la secuencia de consenso (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3'). Brevemente, se marcaron oligonucleótidos de consenso de NF-κB (Promega, WI) usando el kit de desplazamiento en gel de digoxigenina (Roche, Indianápolis, IN). Se incubaron oligonucleótidos marcados con 30 µg de extractos de proteína nuclear a temperatura ambiente durante 20 min en tampón de reacción (Roche, Indianápolis, IN). Se procesaron inmediatamente extractos nucleares incubados con la secuencia consenso de NF-κB en gel de poliacrilamida nativo al 4 % en 0,25x TBE. Se transfirió el gel a membrana Nitron+ (Amersham, Piscataway, NJ) y se detectó la señal según el manual del fabricante (Roche, Indianápolis, IN).

Microinyecciones de NMDA en el cuerpo estriado de ratones. Se realizaron todos los procedimientos como se describe³⁰ y de acuerdo con las "Animal Care Guidelines" de la Universidad de Rochester aprobadas por los Institutos nacionales de salud. Se anestesiaron ratones C57BL/6J macho, de 23-25 g, con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) i.p. Los animales recibieron microinfusiones en el cuerpo estriado derecho (0,5 mm anterior, 2,5 mm lateral, 3,2 mm ventral al bregma) de vehículo, NMDA (20 nmol en 0,3 µl de PBS, pH 7,4), NMDA + APC de ratón recombinante²⁸ (0,002 µg o 0,02 µg o 0,2 µg), NMDA + APC (0,2 µg) + anti-PAR-1 (H-111, 0,2 µg) o anti-PAR-2 (SAM 11, 0,2 µg) o anti-PAR-3 (H-103, 0,2 µg). Se infundieron las soluciones durante 2 min usando un sistema de microinyección (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Se dejó la aguja en el sitio durante 8 min adicionales después de la inyección como se reseña³⁰. Después de 48 h, se sacrificaron los ratones con anestesia profunda para el análisis de las lesiones excitotóxicas. Se perfundió por vía transcardiaca a los ratones PBS seguido de paraformaldehído al 4 % en PBS 0,1 M, pH 7,4. Se retiraron los cerebros y se prepararon secciones coronales de 30 µm de grosor usando un Vibratome. Se tiñó cada quinta sección de 1 mm anterior y posterior al sitio de inyección con violeta de cresilo. Se identificó el área de lesión por la pérdida de tinción como se reseña³⁰. Se determinaron las áreas de lesión mediante un analizador de imágenes (Image-ProPlus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se integraron, obteniendo el volumen de lesión.

Análisis estadístico. Se presentaron los datos como media ± EEM. Se usó ANOVA para determinar las diferencias estadísticamente significativas. P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

La Fig. 5a ilustra el efecto antiapoptótico significativo de la APC humana (100 nM) sobre neuronas corticales de ratón alteradas con NMDA. En respuesta al NMDA, se redujo el número de células positivas de TUNEL con cambios nucleares apoptóticos y el número de células positivas de caspasa 3 (Fig. 5a-5b) en más de un 60 % por la APC. La APC reducía de manera dependiente del tiempo el aumento de la actividad de caspasa 3 inducido por NMDA (Fig. 5c) y el número de células positivas de TUNEL (Fig. 5d). La Fig. 5e muestra la protección neuronal dependiente de la dosis por APC recombinante humana y de ratón. Los valores de CI₅₀ para reducir la apoptosis neuronal para APC humana y de ratón en el modelo de NMDA fueron de 49 y 5 nM, respectivamente, confirmando una eficacia significativamente mayor de la APC de ratón homóloga de especie consistentemente con lo anterior y un informe reciente en un modelo de apoplejía en ratón³⁹.

Para dilucidar cómo interfiere la APC con las cascadas moleculares implicadas en la apoptosis neuronal inducida por NMDA, se demostró en primer lugar que la APC reduce significativamente hasta un 60 % los niveles aumentados de proteína supresora tumoral p53 en extractos nucleares de neuronas tratadas con NMDA a las entre 3 y 24 h (Fig. 6a y 6d), y que reduce los niveles de transcritos de ARNm de p53 (Fig. 6b), consistentemente con sus efectos en endotelio cerebral isquémico³⁹. La fosforilación de p53 en la Ser20 o Ser15, que estabilizaría la proteína al evitar la degradación proteosómica al impedir su unión a la oncoproteína, doble diminuta 2 de murino (Mdm2), era indetectable en extractos nucleares u homogeneizados de células completas. Los cambios de la proteína Mdm2 en respuesta al NMDA fueron indetectables, y no se observaron efectos directos de la APC sobre la proteína Mdm2. Las Fig. 6c-6d confirman que una relación proapoptótica aumentada de *Bax/Bcl-2* está implicada en la lesión neuronal inducida por NMDA³⁵. Consistentemente con el bloqueo de p53, la APC rebajaba los aumentos de *Bax* y las disminuciones de *Bcl-2* (Fig. 6c-6d), alterando por tanto favorablemente la relación de *Bax/Bcl-2*.

La inducción de p53 dependiente de la transcripción está implicada en la apoptosis neuronal desencadenada por aminoácidos excitatorios³⁴ y NMDA (Fig. 6b), y el óxido nítrico provoca la acumulación de p53 y la apoptosis⁴¹. Aunque los presentes hallazgos proporcionan una evidencia definitiva de que la APC interfiere con la apoptosis inducida por NMDA al bloquear la señalización proapoptótica de p53 y caspasa 3 y normalizar la relación proapoptótica *Bax/Bcl-2* en neuronas estresadas, la relación exacta entre los mecanismos antiapoptóticos de APC y la toxicidad neuronal del óxido nítrico inducida por NMDA queda por definir.

Puesto que el NMDA puede aumentar los niveles del factor nuclear κB (NF- κB)⁴², que puede ser antiapoptótico o proapoptótico⁴³, se ensayó si los cambios observados en la expresión de p53 son posteriores a NF- κB . El NMDA no induce la translocación de NF- κB al núcleo de células corticales (Fig. 6e), mientras que el control positivo, lipopolisacárido de *E. coli*, causaba la translocación NF- κB a endotelio de vena umbilical (Fig. 6e). Esto confirma que, en el presente modelo de apoptosis inducida por NMDA, la translocación de NF- κB nuclear no está implicada en la apoptosis neuronal.

Se ensayó si la APC puede afectar a la estructura del receptor de NMDA por proteólisis como se ha reseñado para activador de plasminógeno de tejido (tPA)⁴⁴. En contraposición con tPA, la APC no escindía las subunidades NR1 ni NR2A de los receptores de NMDA (Fig. 6f), confirmando que la APC no modifica las propiedades de los receptores de NMDA y sugiriendo que la APC actúa posteriormente a la estimulación del receptor de NMDA. Los receptores de NMDA median la lesión cerebral isquémica, pero bloquear estos receptores puede ser dañino para animales y seres humanos^{45,46}. Por tanto, interferir con la apoptosis inducida por NMDA posteriormente a los receptores de NMDA, usando la APC para bloquear la señalización proapoptótica de p53 y caspasa 3 inducida por NMDA y/o limitar la generación de óxido nítrico al desacoplar las subunidades NR2 de los receptores de NMDA de la óxido nítrico sintasa neuronal⁴⁷, ofrece una atractiva estrategia de protección cerebral.

Para definir la especificidad de la neuroprotección de APC, se demostró que ni el mutante Ser360Ala-APC ni el zimógeno de proteína C podían proteger a neuronas de la apoptosis inducida por NMDA, y que la desnaturalización térmica o IgG anti-APC anulaban la actividad de APC (Fig. 7a). Esto confirma que la serina del sitio activo de APC es necesaria para la protección neuronal, elevando la posibilidad de que los PAR puedan estar implicados. Para ensayar el papel de los PAR, se estudiaron los efectos protectores neuronales de APC recombinante de ratón en presencia de diversos anticuerpos anti-PAR (Fig. 7b). Los cuatro PAR están presentes en SNC de roedor⁴⁸, como se ha confirmado por inmunotinción positiva de PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4 en neuronas corticales de ratón. El bloqueo por anticuerpo del sitio de escisión de PAR-1, pero no del sitio de escisión de PAR-2, causaba una pérdida significativa (aproximadamente 70 %) de la protección neuronal mediada por APC (Fig. 7b). En controles negativos, los anticuerpos contra las regiones N-terminales independientes de escisión de PAR-1 y PAR-2, o contra el extremo C de PAR-4, no tenían efecto (Fig. 7b). Un anticuerpo contra los 103 aminoácidos N-terminales extracelulares de PAR-3 bloqueaba significativamente la protección neuronal mediada por APC (aproximadamente 65 %), en contraposición con un anticuerpo de control anti-PAR-3 contra el extremo C de PAR-3 (Fig. 7b). La combinación de anticuerpos que bloquean la activación de PAR-1 y PAR-3 anulaba completamente los efectos protectores neuronales de APC (Fig. 7b). En estudios de señalización de trombina en plaquetas de ratón, PAR-3 no proporciona señalización de trombina, sino que en lugar de ello sirve como cofactor para la activación de PAR-4 por trombina⁴⁹. Por tanto, los presentes resultados sugieren que la APC se une a PAR-3 y activa PAR-1 para rescatar a neuronas de la toxicidad inducida por NMDA.

Para ensayar adicionalmente el papel de PAR-1, se demostró que el péptido agonista de PAR-1 (TFLLRNPNKD), pero no el péptido agonista de PAR-2 (SLIGRL), protegía a las neuronas frente a la apoptosis inducida por NMDA (Fig. 7b). El péptido agonista de PAR-1 y la trombina a concentraciones relativamente altas pueden matar neuronas^{50,51}. Pero a concentraciones comparables a las usadas en el presente estudio, el agonista de PAR-1 puede proteger a las neuronas y astrocitos de rata corticales de hipoglucemia y privación de oxígeno/glucosa^{50,51}, como se observa aquí para la toxicidad por NMDA. Por tanto, la activación de PAR-1 en neuronas puede ser antiapoptótica, como en el caso de APC y trombina a dosis baja. La actividad proapoptótica de niveles mayores de trombina puede implicar la acción de la trombina sobre sustratos distintos de PAR-1 (por ejemplo, PAR-4) y/o diferencias en la amplitud y duración de la señalización de PAR-1. La APC escinde un polipéptido N-terminal

sinéptico de PAR-1 en Arg41, el sitio de escisión de trombina, a una velocidad 5.000 veces más lenta que la trombina⁵². Presuntamente, la unión de APC a fosfolípidos de membrana plasmática o EPCR cerca de la cola N-terminal extracelular de PAR-1 acelera la escisión por APC en Arg41.

Para determinar si la neuroprotección de APC *in vivo* tiene requisitos similares para PAR-1 y PAR-3 que en neuronas cultivadas, se estudiaron los efectos de la APC sobre lesiones excitotóxicas inducidas por NMDA en cerebro de ratón usando inyecciones estereotácticas de NMDA en cuerpo estriado³⁰. La administración de APC de ratón (0,2 µg) a ratones con lesión cerebral inducida por NMDA reducía significativamente el volumen de lesión a las 48 h en más de un 70 % (Fig. 7c-7d); el efecto de la APC era dependiente de la dosis (Fig. 7d), de forma similar a los resultados *in vitro* (Fig. 7e). Había más de un 70 % de pérdida del efecto neuroprotector de APC *in vivo* en ratones tratados con APC más anticuerpo anti-PAR-1 (Fig. 7e) y una pérdida de más de un 65 % de neuroprotección mediada por APC en presencia de anticuerpo anti-PAR-3. Estos estudios confirmaron que PAR-1 y/o PAR-3 contribuyen significativamente a la protección neuronal de APC tanto *in vitro* como *in vivo*.

Finalmente, se confirmó que los mutantes de APC que carecen de niveles de tipo silvestre de actividad anticoagulante pueden retener una actividad neuroprotectora normal. Se ensayó en los mutantes del dominio de proteasa de APC humana con baja actividad anticoagulante (véanse las localizaciones mostradas en la Fig. 8) su actividad antiapoptótica usando neuronas de ratón alteradas con NMDA *in vitro* e *in vivo*, así como células endoteliales cerebrales humanas hipóxicas *in vitro* (Fig. 9a-9f). Los procedimientos y modelos animales usados para ensayar la actividad neuroprotectora de los mutantes de APC fueron como se describe anteriormente. Dos mutantes de APC humana con sustituciones de alanina en el bucle 37 (KKK191-193AAA, "3K3A-APC") o el bucle de unión a Ca⁺⁺ (RR229/230AA, "229/30-APC") una tenían actividad neuroprotectora como la APC humana de tipo silvestre recombinante ("rwt-APC") en los tres modelos estudiados, mientras que los mutantes de APC tenían menos de un 10 %, y aproximadamente un 5 %, de la actividad anticoagulante de la APC humana de tipo silvestre. Ninguna de estas mutaciones afectaba a la actividad amidolítica de APC. Por tanto, estos mutantes de APC humana con actividad anticoagulante reducida retienen niveles de tipo silvestre de actividad neuroprotectora *in vitro* e *in vivo* que actúan directamente sobre células cerebrales. Dichos mutantes de APC se denominan "mutantes funcionales" porque son selectivamente deficientes en actividad anticoagulante de APC y por lo tanto pueden tener menor riesgo de hemorragia. Los valores de Cl₅₀ de 3K3A-APC y 229/30-APC en neuronas de ratón tratadas con NMDA y BEC humanas hipóxicas eran aproximadamente de 11 nM y 18 nM, respectivamente, y de aproximadamente 10-12 nM para ambos.

En resumen, los presentes hallazgos indican que la APC tiene propiedades protectoras neuronales directas que no dependen de sus acciones sistémicas, y que la APC previene la apoptosis neuronal al actuar directamente sobre las neuronas alteradas. En contraposición, la proteasa tPA disolvente de coágulo ejerce una neurotoxicidad de célula cerebral directa^{24,44}. Por tanto, la APC, que actúa a través de PAR-1 y PAR-3, puede limitar críticamente el daño neuronal al prevenir la apoptosis neuronal inducida por NMDA en trastornos neurodegenerativos asociados a la hiperestimulación de receptor de NMDA.

REFERENCIAS

1. Griffin *et al.* "Activated protein C: Potential therapy for severe sepsis, thrombosis, and stroke". Semin. Hematol. 39: 197-205 (2002).
2. Griffin. "Blood coagulation. The thrombin paradox". Nature 378: 337-338 (1995).
3. Esmon *et al.* "Endothelial protein C receptor". Thromb. Haemost. 82: 251-258 (1999).
4. Mizutani *et al.* "Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation". Blood 95: 3781-3787 (2000).
5. Shibata *et al.* "Anti-inflammatory, antithrombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke". Circulation 103: 1799-1805 (2001).
6. Bernard *et al.* "Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis". New Engl. J. Med. 344: 699-709 (2001).
7. Folsom *et al.* "Prospective study of markers of hemostatic function with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators". Circulation 100: 736-742 (1999).
8. Joyce *et al.* "Gene expression profile of antithrombotic protein C defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis". J. Biol. Chem. 276: 11199-11203 (2001).
9. Riewald *et al.* "Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway". Science 296: 1880-1882 (2002).
10. Castellino *et al.* "Mice with a severe deficiency of the endothelial protein C receptor gene develop, survive, and reproduce normally, and do not present with enhanced arterial thrombosis after challenge". Thromb. Haemost. 88: 462-472 (2002).
11. Oren. "Regulation of the p53 tumor suppressor protein". J. Biol. Chem. 274: 36031-36034 (1999).
12. Carr. "Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle". Science 287: 1765-1766 (2000).
13. Ogawara *et al.* "Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53". J. Biol. Chem. 277: 21843-21850 (2002).

14. Stempien-Otero *et al.* "Mechanisms of hypoxia induced endothelial cell death. Role of p53 in apoptosis". J. Biol. Chem. 274: 8039-8045 (1999).
15. Kimura *et al.* "Orphan G protein-coupled receptor, GPR41, induces apoptosis via a p53/Bax pathway during ischemic hypoxia and reoxygenation". J. Biol. Chem. 276: 26453-26460 (2001).
- 5 16. Zhu *et al.* "p38 Mitogen-activated protein kinase mediates hypoxic regulation of Mdm2 and p53 in neurons". J. Biol. Chem. 277: 22909-22914 (2002).
17. Gale *et al.* "Nonenzymatic anticoagulant activity of the mutant serine protease Ser360Ala-activated protein C mediated by factor Va". Protein Sci. 6: 132-140 (1997).
18. Ye *et al.* "The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries". Biochem. Biophys. Res. Commun. 259: 671-677 (1999).
- 10 19. Miyashita *et al.* "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene". Cell 80: 293-299 (1995).
20. Yamamoto *et al.* "Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells". Hypertension 37: 1341-1348 (2001).
- 15 21. Faleiro *et al.* "Caspases disrupt the nuclear-cytoplasmic barrier". J. Cell Biol. 151: 951-959 (2000).
22. Ackerman *et al.* "The role of antiapoptotic Bel-2 family members in endothelial apoptosis elucidated with antisense oligonucleotides". J. Biol. Chem. 274: 11245-11252 (1999).
23. Hoffman *et al.* "Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism". J. Cell. Physiol. 188: 33-44 (2001).
- 20 24. Wang *et al.* "Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice". Nat. Med. 4: 228-231 (1998).
25. Flavin *et al.* "Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro". Glia 29: 347-354 (2000).
- 25 26. Gruber y Griffin." Direct detection of activated protein C in blood from human subjects". Blood 79: 2340-2348 (1992).
27. Mackic *et al.* "Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1- 40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer". J. Clin. Invest. 102: 734-743 (1998).
- 30 28. Fernández *et al.* "Recombinant murine-activated protein C in a murine ischemic stroke model". Blood Cell. Mol. Dis. 30: 271-276 (2003)
29. Bonfoco *et al.* "Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 7162-7166 (1995).
- 35 30. Ayata *et al.* "Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice". J. Neurosci. 17: 6908-6917 (1997).
31. Kemp *et al.* "NMDA receptor pathways as drug targets". Nature Neurosci. 5: 1039-1042 (2002).
32. Le *et al.* "Potential and current use of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in diseases of aging". Drugs & Aging 18: 717-724 (2001).
- 40 33. Sakhi *et al.* "Induction of tumor suppressor p53 and DNA fragmentation in organotypic hippocampal cultures following excitotoxin treatment". Exp. Neurol. 145: 81-88 (1997).
34. Uberti *et al.* "Induction of tumour-suppressor phosphoprotein p53 in the apoptosis of cultured rat cerebellar neurons triggered by excitatory amino acids". Eur. J. Neurosci. 10: 246-254 (1998).
35. Djebaili *et al.* "p53 and Bax implication in NMDA induced-apoptosis in mouse hippocampus". Neuroreport. 11: 2973-2976 (2000).
- 45 36. Du *et al.* "Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 1657-11662 (1997).
37. Okamoto *et al.* "Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 3974-3979 (2002).
- 50 38. Dawson *et al.* "Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 6368-6371 (1991).
39. Cheng *et al.* "Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective". Nature Med. 9: 338-342 (2003).
40. Brewer *et al.* "Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination". J. Neurosci. Res. 35: 567-576 (1993).
- 55 41. Brüne *et al.* "Nitric oxide evoked p53-accumulation and apoptosis". Toxicology Letters 139: 119-123 (2003).
42. McInnis *et al.* "The role of superoxide and nuclear factor- κ B signaling in N-methyl-D-aspartate-induced necrosis and apoptosis". J. Pharmacol. Exp. Ther. 301: 478-487 (2002).
43. Ryan *et al.* "Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death". Nature 404: 892-897 (2000).
- 60 44. Nicole *et al.* "The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling". Nature Med. 7: 59-64 (2001).
45. Davis *et al.* "Selfotel in acute ischemic stroke: Possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist". Stroke 31: 347-354 (2000).

46. Morris *et al.* "Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: Results of two Phase III clinical trials". J. Neurosurg. 91: 737-743 (1999).
47. Aarts *et al.* "Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions". Science 298: 846-850 (2002).
- 5 48. Striggow *et al.* "Four different types of proteaseactivated receptors are widely expressed in the brain and are up-regulated in hippocampus by severe ischemia". Eur. J. Neurosci. 14: 595-608 (2001).
49. Nakanishi-Matsui *et al.* "PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin". Nature 404: 609-613 (2000).
50. Striggow *et al.* "The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 2264-2269 (2000).
- 10 51. Donovan *et al.* "Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection". J. Biol. Chem. 273: 12746-12752 (1998).
52. Kuliopulos *et al.* "Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: Kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy". Biochemistry 38: 4572-4585 (1999).

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende al menos una variante funcional de una proteína C humana activada (APC) o una proteína C humana para uso en el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada del grupo consistente en isquemia y apoplejía, en la que la variante funcional consta al menos de la mutación KKK191-193AAA, caracterizada porque la variante funcional está presente en una cantidad eficaz para proporcionar neuroprotección para células estresadas o lesionadas en un sujeto.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que da como resultado una anticoagulación sistémica al menos reducida o insignificante cuando se administra al sujeto.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que la dosis unitaria se administra al sujeto en menos de 72 horas.
4. Uso de al menos una variante funcional de una proteína C humana activada (APC) o una proteína C humana, en el que la variante funcional consta al menos de la mutación KKK191-193AAA, para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar una enfermedad neurodegenerativa seleccionada del grupo consistente en isquemia y apoplejía, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a un sujeto de tal modo que se mejora al menos un efecto del estrés o lesión en uno o más tipos celulares del sujeto; en el que el uno o más tipos celulares están en el cerebro del sujeto y en el que el sujeto es un ser humano.

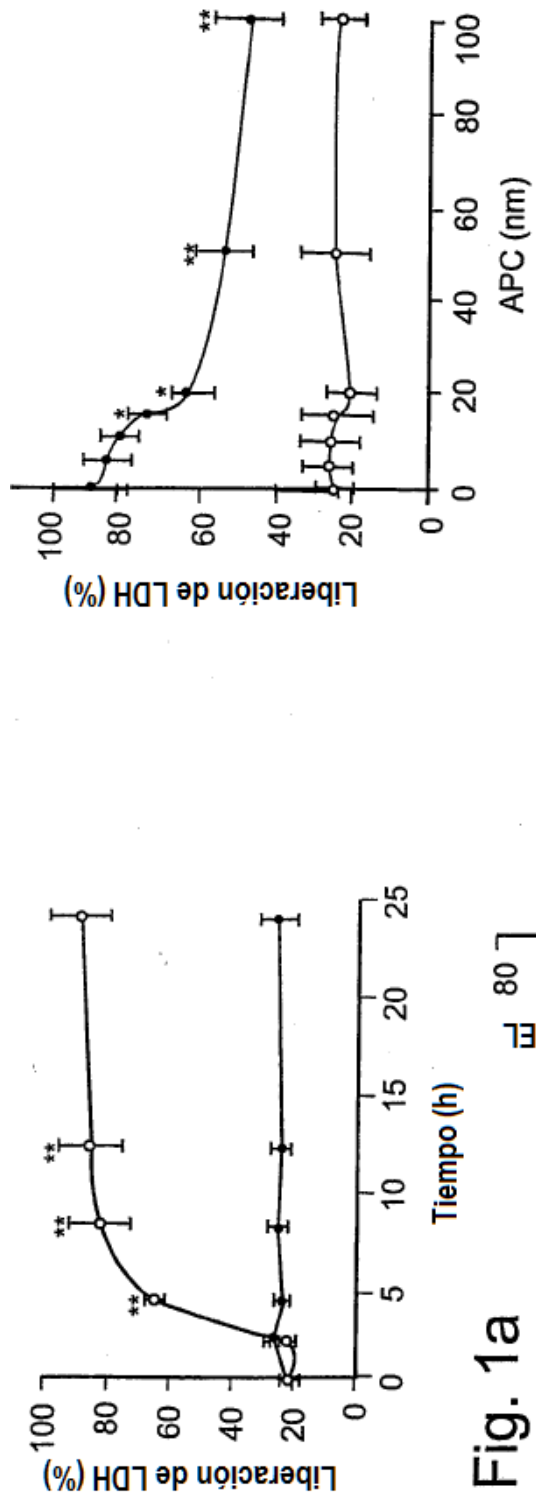


Fig. 1a

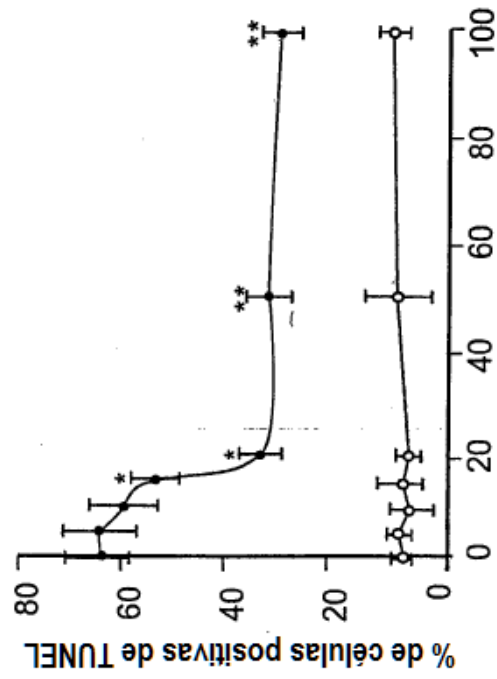


Fig. 1b

Fig. 1d

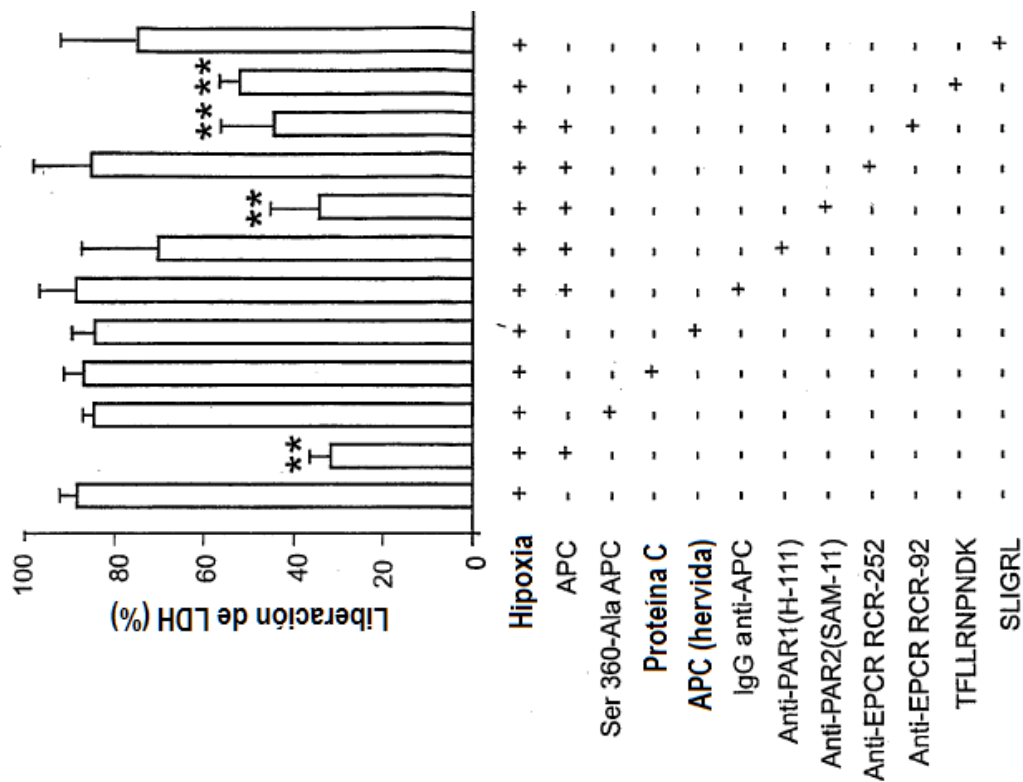


Fig. 1e

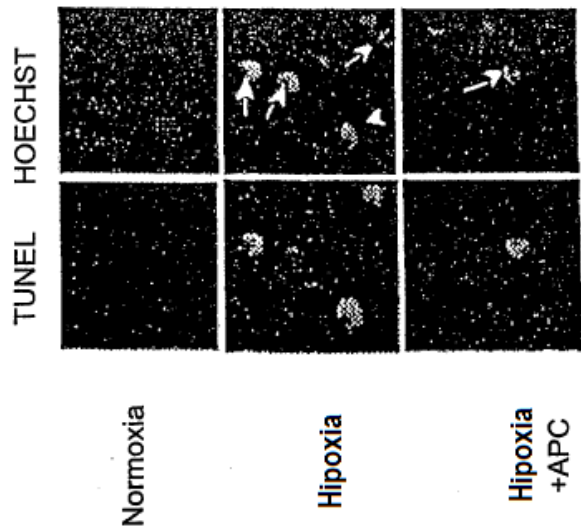
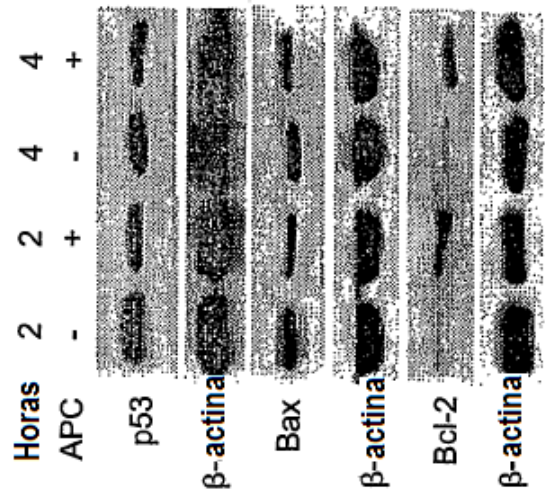
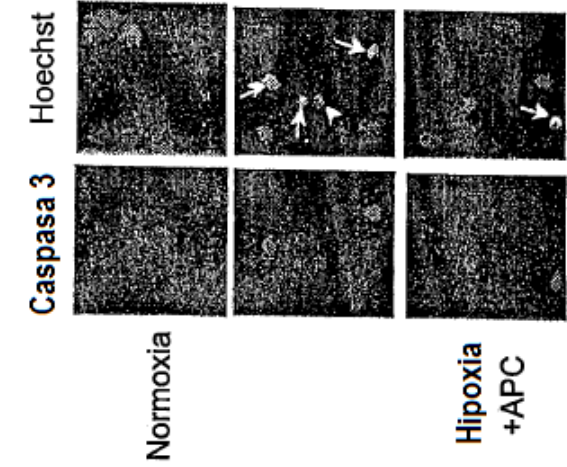
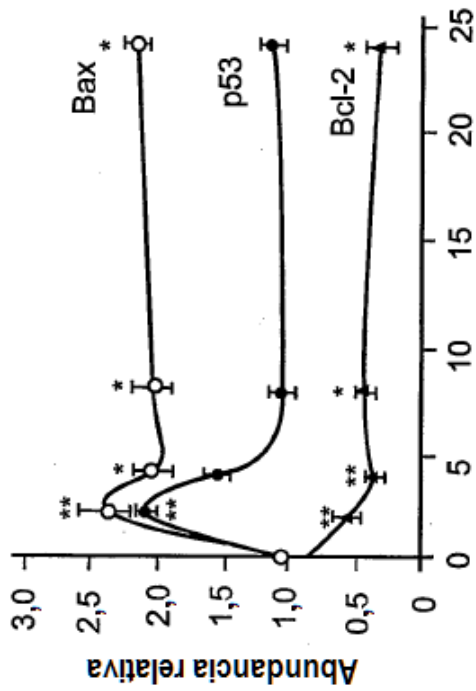
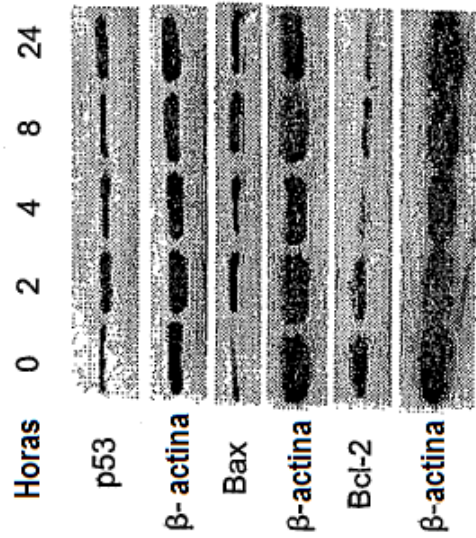
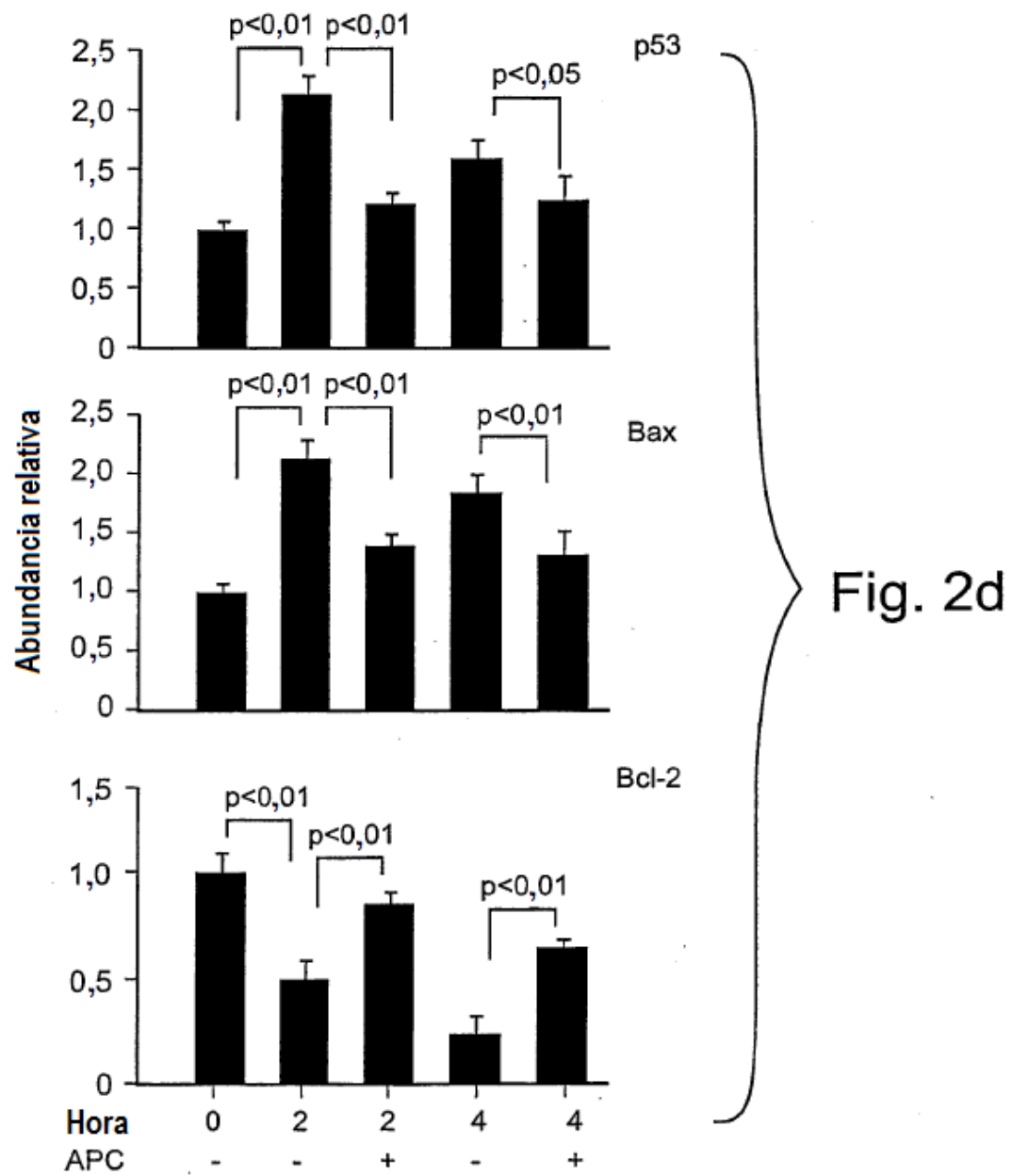


Fig. 1c





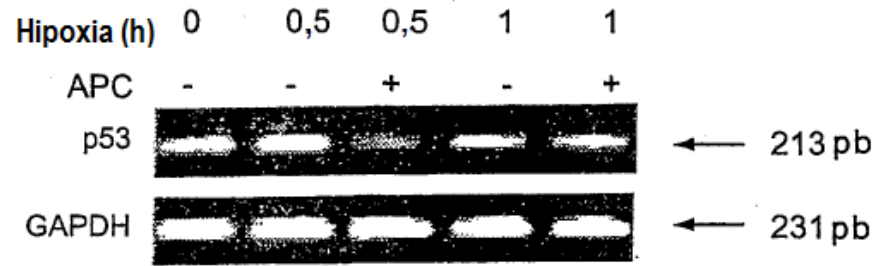


Fig. 3a

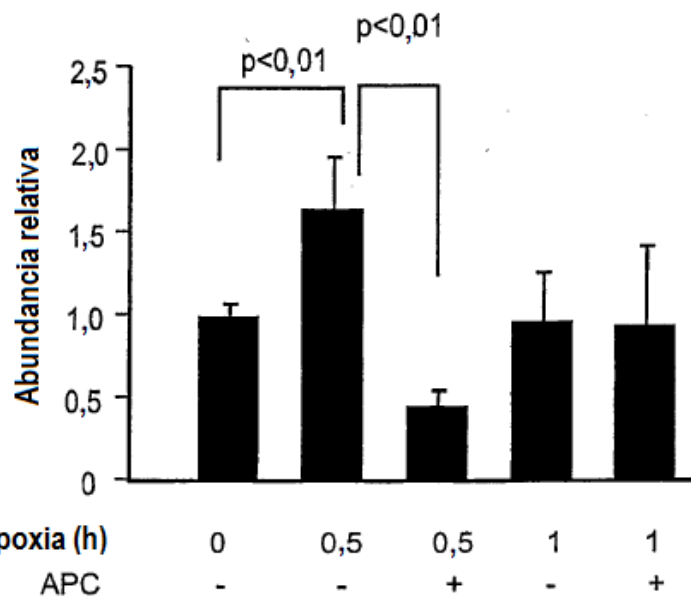


Fig. 3b

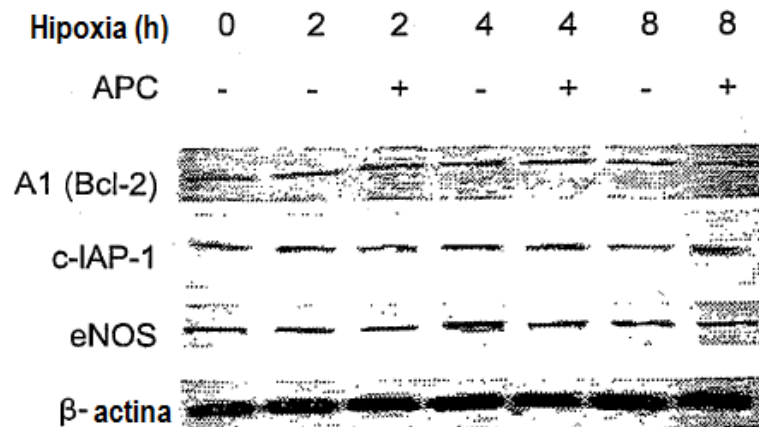


Fig. 3c

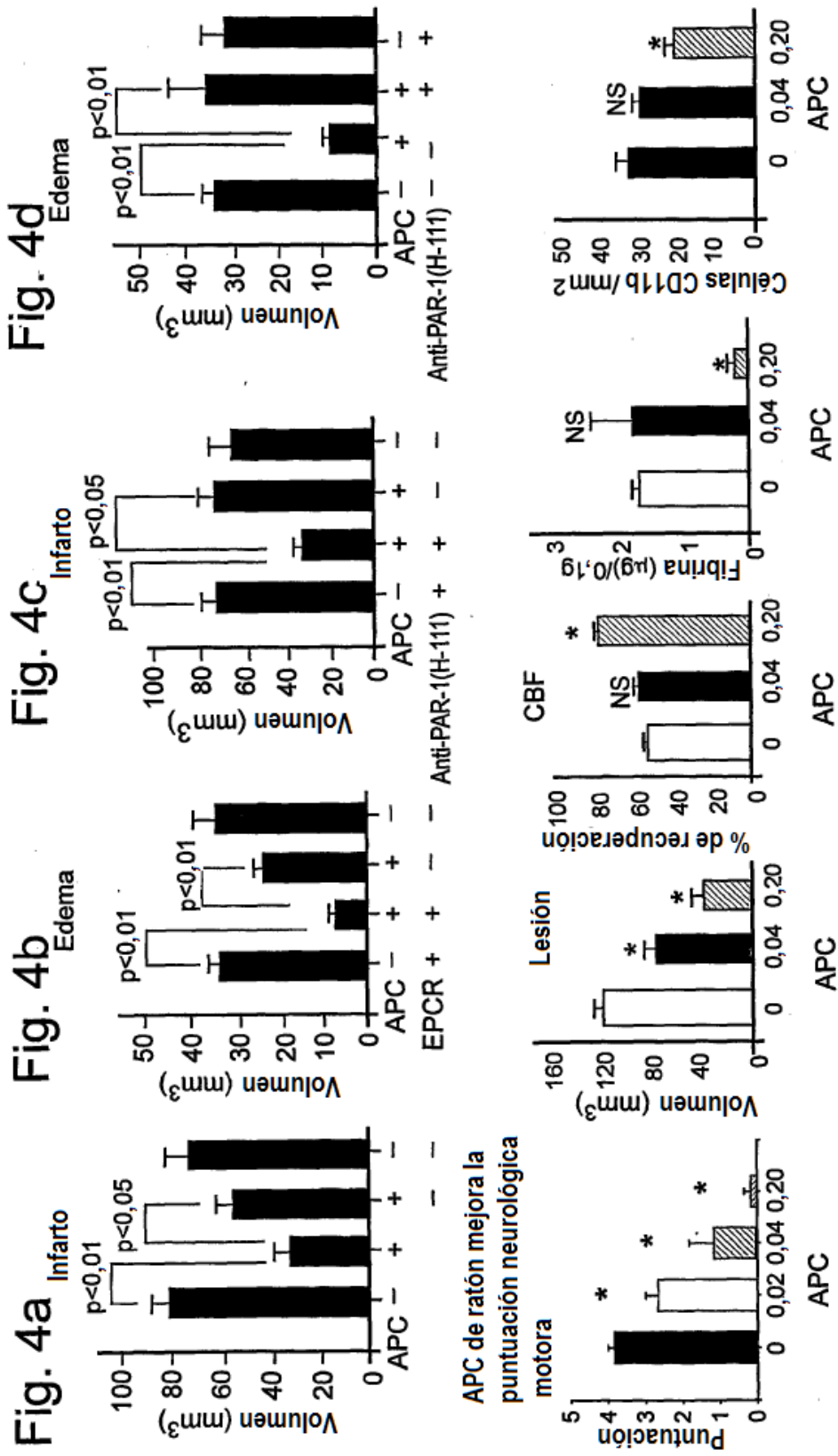


Fig. 5a

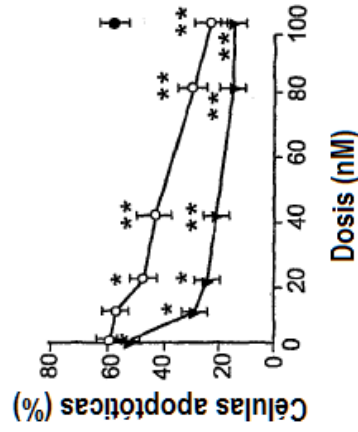
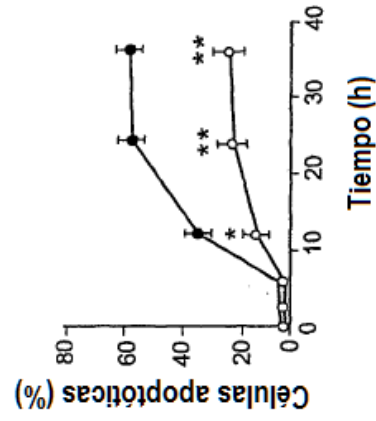
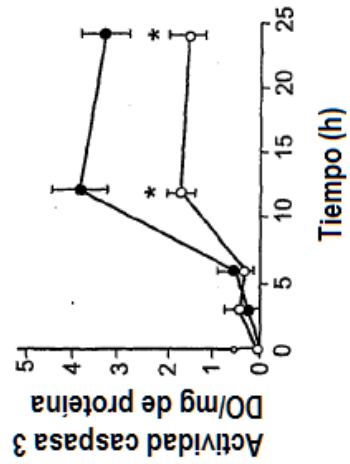
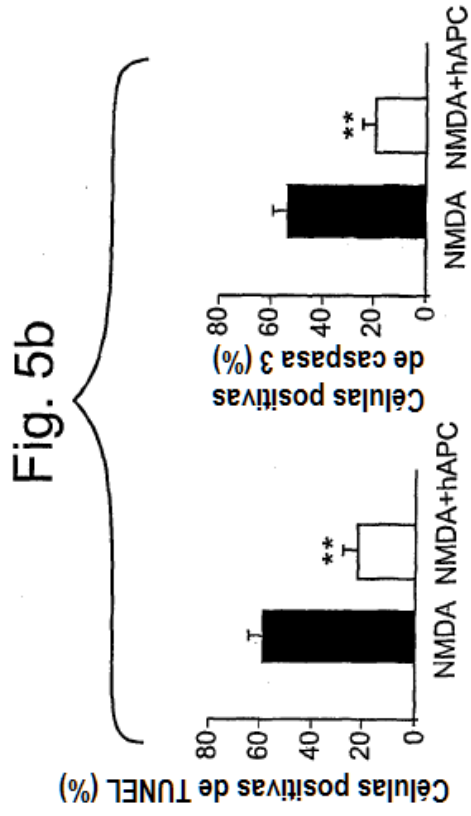
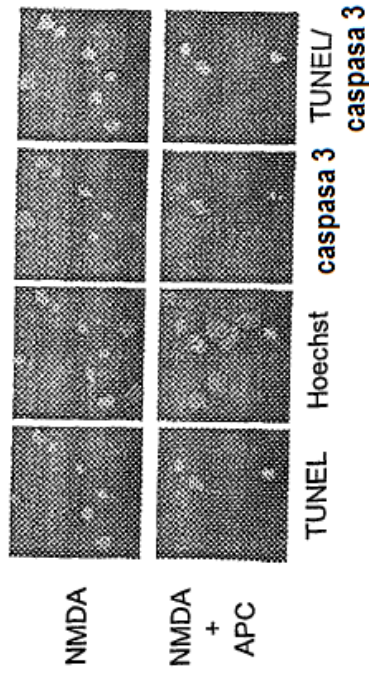


Fig. 6a

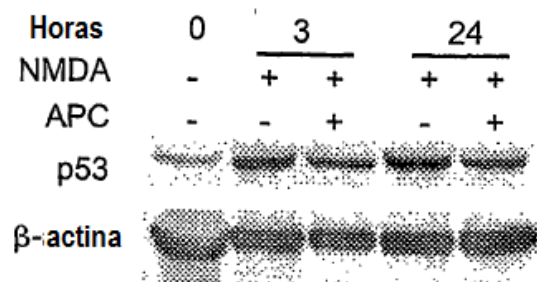


Fig. 6b

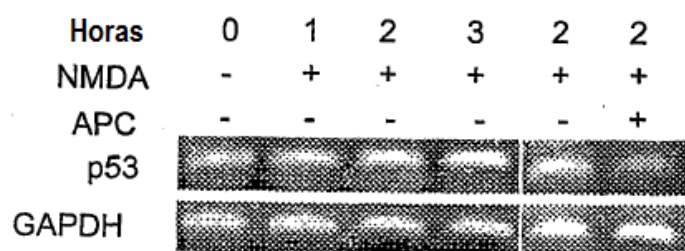


Fig. 6c

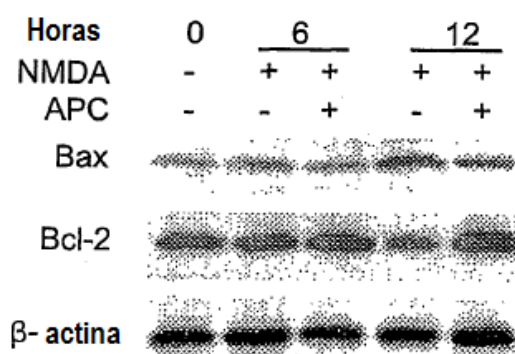


Fig. 6e

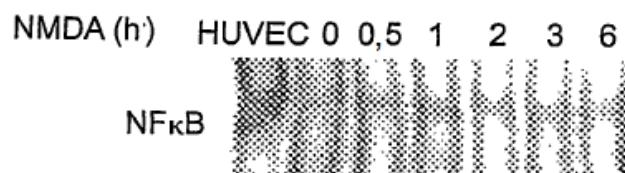


Fig. 6f

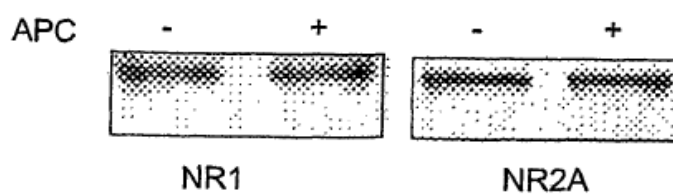
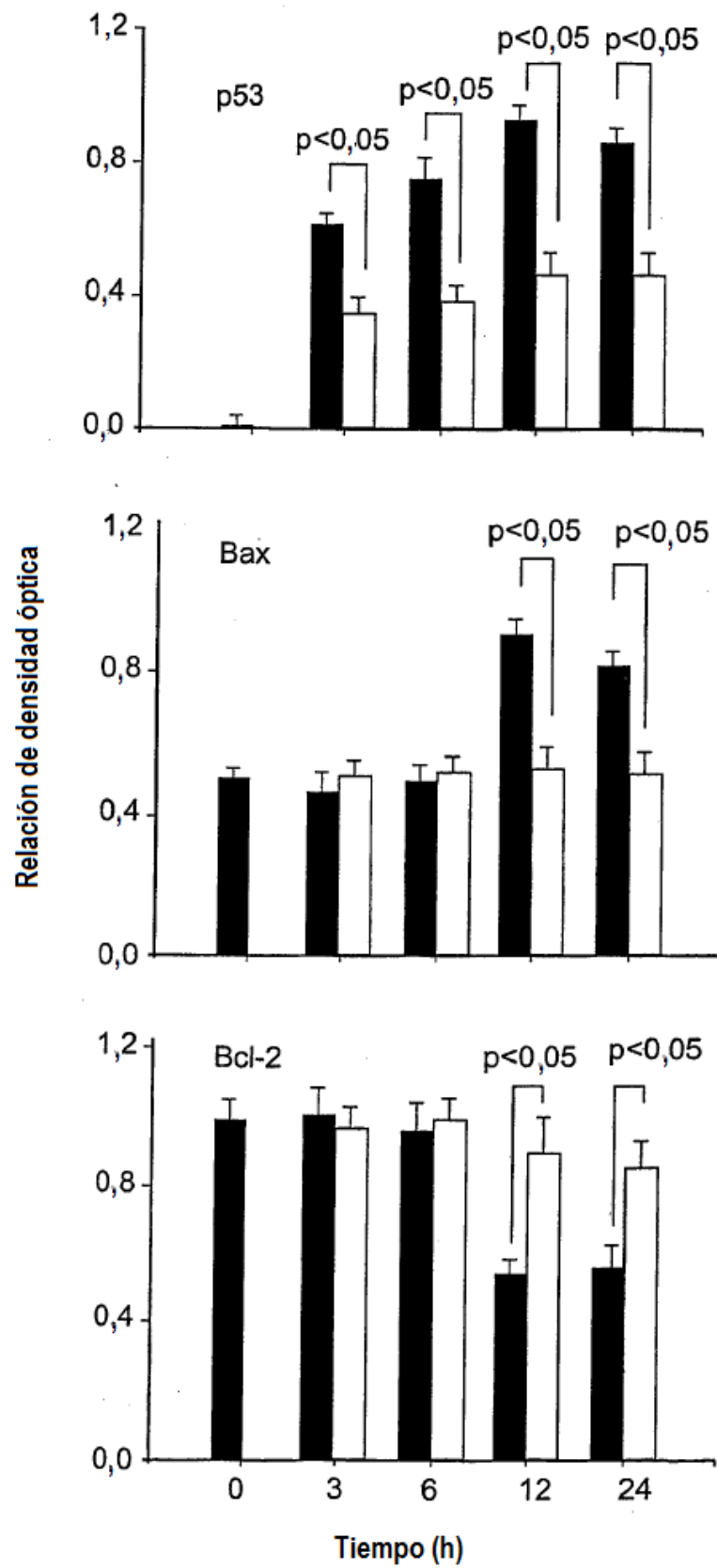
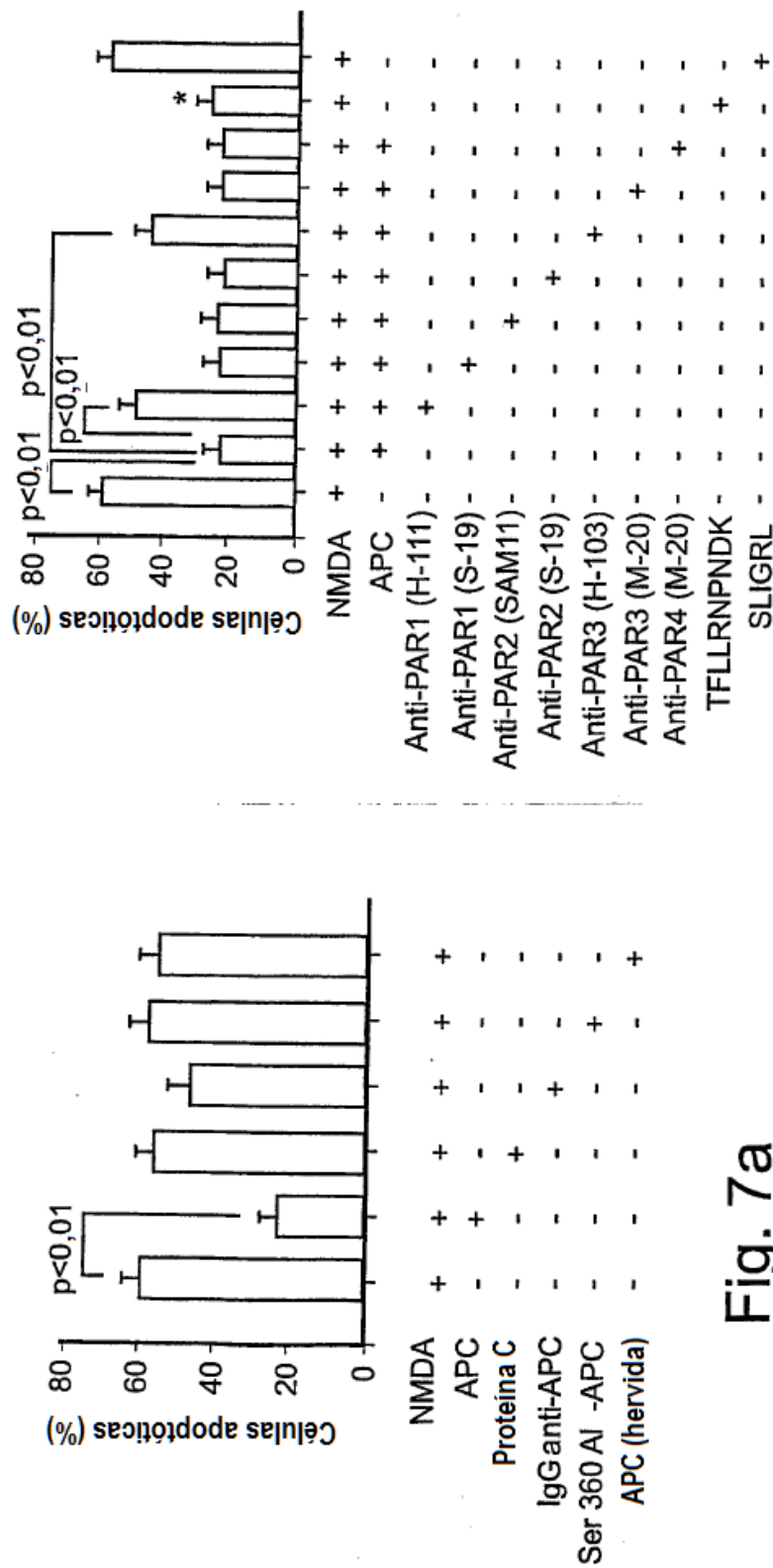


Fig. 6d





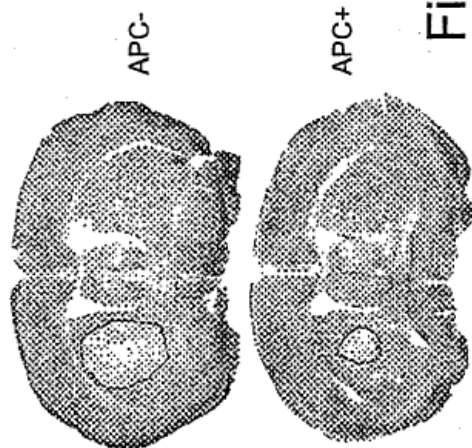


Fig. 7c

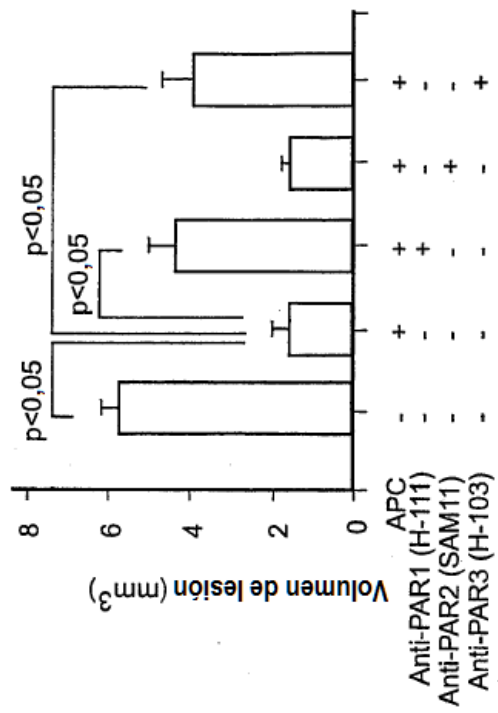


Fig. 7e

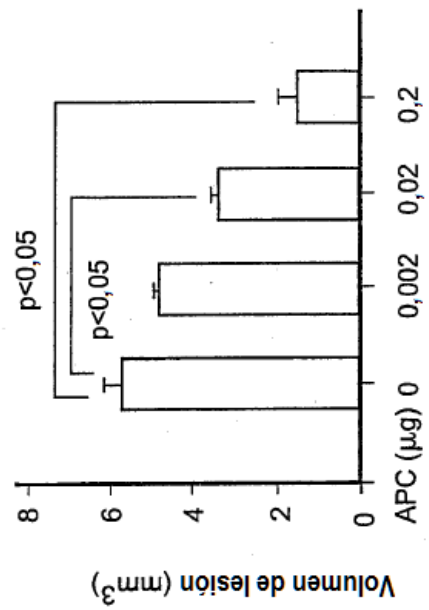
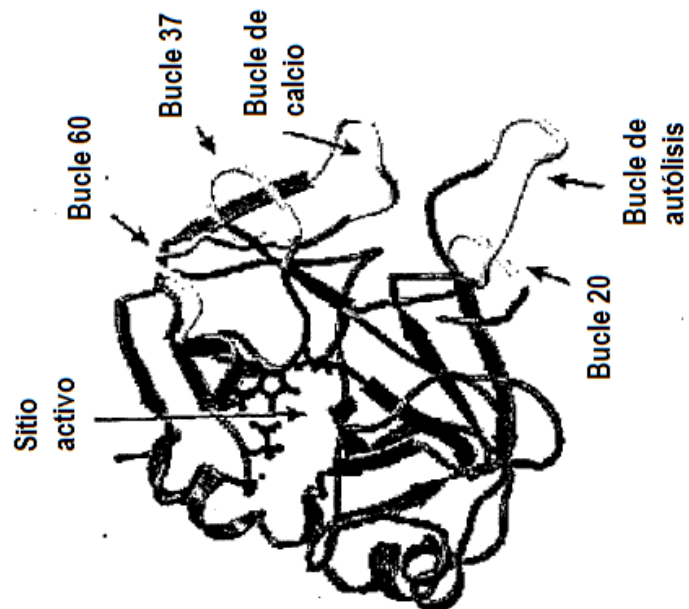


Fig. 7d

Los bucles de superficie afectan a la actividad anticoagulante de APC



Bucle	Mutante de APC	Actividad anticoagulante
37	KKK191/193AAA	<10%
60	KK217/218AA	140%
60	R222A (actividad amidolítica)	~ 20 %
Calcio	RR229/230AA	~ 5 %
Autólisis	RR306/312AA	17%
Autólisis	RKRR306/314AAAA	<2%

Fig. 8

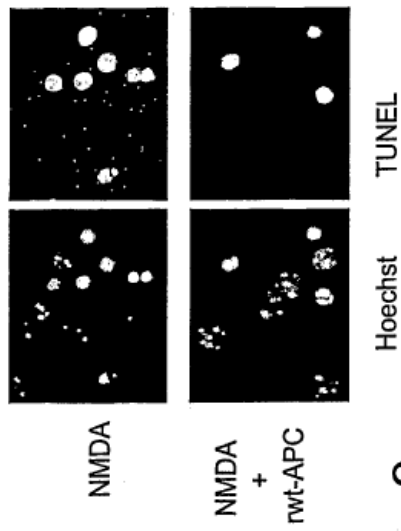


Fig. 9a

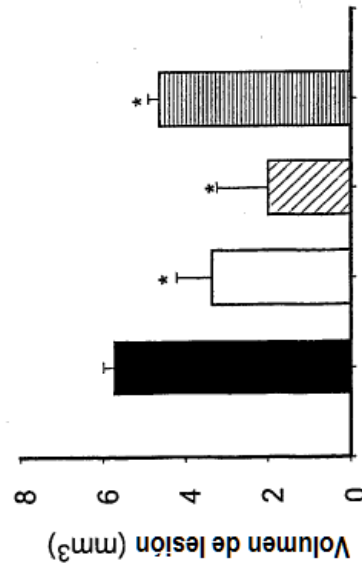


Fig. 9c

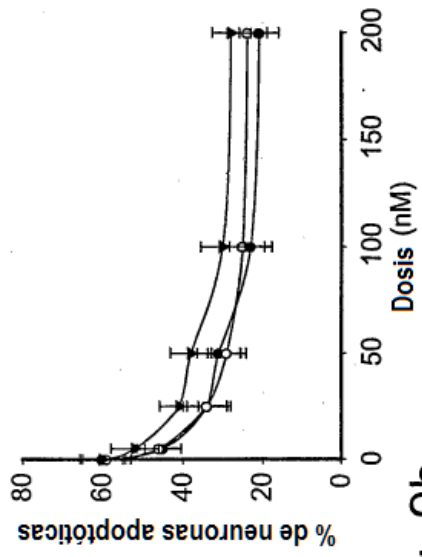


Fig. 9b

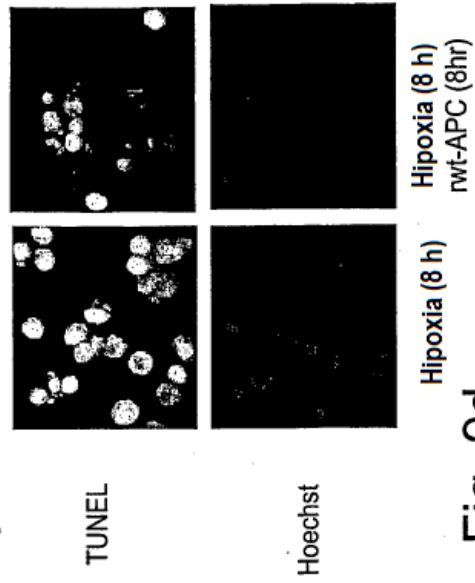


Fig. 9d

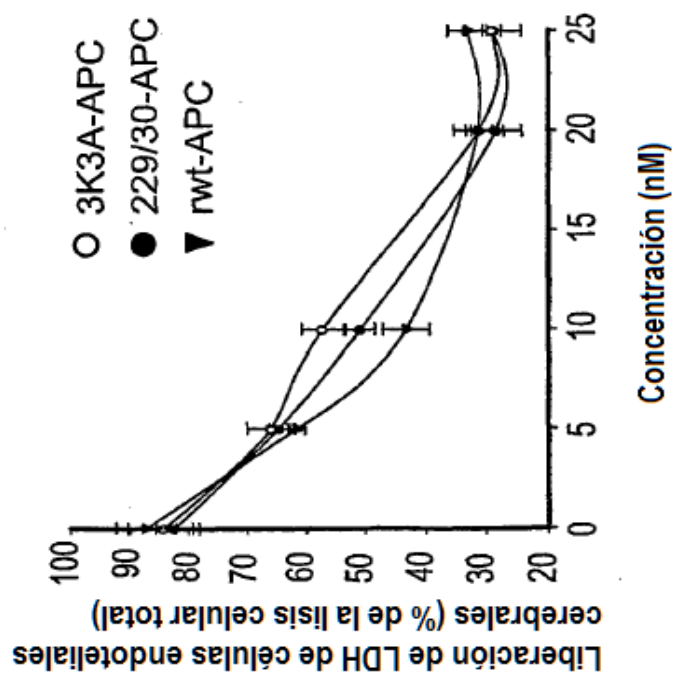


Fig. 9e

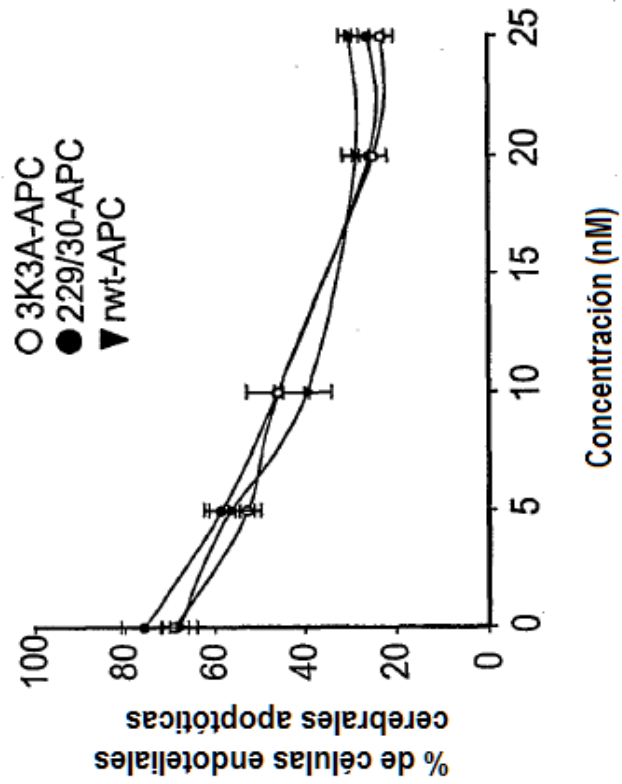


Fig. 9f