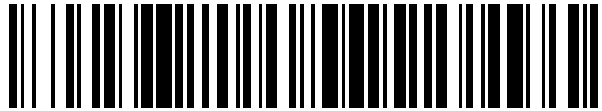


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 820**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/72** (2006.01)

**A61K 38/49** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2009 E 09723475 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2260100**

54 Título: **Mutante de tPA en el tratamiento de lesiones cerebrales agudas y trastornos neurodegenerativos**

30 Prioridad:

**16.03.2008 IL 19018408**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.09.2015**

73 Titular/es:

**HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES &  
DEVELOPMENT LTD. (100.0%)  
P.O. Box 12000  
91120 Jerusalem, IL**

72 Inventor/es:

**HIGAZI, ABD y  
HIJAZI, NUHA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 546 820 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

Mutante de tPA en el tratamiento de lesiones cerebrales agudas y trastornos neurodegenerativos

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento, mejora y prevención de afecciones que implican daño neuronal. Más particularmente, la invención se refiere a mutante de tPA desprovisto de actividad proteasa y a usos del mismo en composiciones para usar en el tratamiento y prevención de ictus, lesión cerebral aguda y trastornos neurodegenerativos.

**Antecedentes de la invención**

10 La lesión cerebral traumática (LCT) es una de las principales causas de muerte y discapacidad grave, con una incidencia estimada de 1,5 millones de casos nuevos al año en Estados Unidos, por desgracia, lo que resulta en 50.000 muertes. Un total de 5,3 millones de americanos, aproximadamente el 2 % de la población estadounidense, viven actualmente con discapacidades resultantes de LCT. La activación de la coagulación dentro del sistema nervioso central (SNC) es un acontecimiento temprano y casi universal que acompaña a las LCT graves. El cerebro es rico en el factor tisular, el iniciador de la cascada de la coagulación [Goodnight, S.H. y col., N. Engl. J. Med. 290:1043 - 1047 (1974)], que se libera en respuesta a la LCT. La formación del coágulo en la circulación sistémica es evidente en cuestión de minutos y es probable que se produzca incluso antes en el sitio de la lesión [Stein, S.C. y col., J. Neurosurg. 97:1373 - 1377 (2002)]. Existe una fuerte correlación entre el grado en que la coagulación se activa, el desarrollo de cambios progresivos observados en la TC, y la probabilidad de un resultado adverso, que no depende de la gravedad de la lesión por sí sola [Stein, S.C. y col., Neurosurgery 32:25 - 30; discussion 30 - 21(1993)]. De hecho, la coagulopatía grave ocupa el segundo lugar después del shock como factor predictor independiente de resultados adversos.

Los activadores del plasminógeno son enzimas que activan el plasminógeno zimógeno para generar la plasmina serínproteína, que degrada la fibrina. Entre los activadores del plasminógeno estudiados se encuentran estreptoquinasa, uroquinasa y el activador del plasminógeno tisular humano (tPA) y la dismutasa.

25 El activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), una serínproteasa glicosilada de varios dominios, es un activador específico de fibrina de plasminógeno y un agente trombolítico muy eficaz. El tPA es una proteína cuya aplicación principal es en el tratamiento de pacientes con ataque cardíaco y accidente cerebrovascular. Se caracterizó por primera vez en 1979 como agente farmacéutico biológico importante y potente en el tratamiento de diversas enfermedades vasculares debido a su alta especificidad por la fibrina y su potente capacidad para disolver coágulos de sangre in vivo. El complejo activador plasminógeno-estreptoquinasa anisolado de disolución de coágulos de Beechem Laboratories, de nombre comercial Eminase, se reivindica que reduce la tasa de mortalidad en las víctimas de ataque cardíaco en un 50 %. El tPA de Gene Tech (Activase) también es muy eficaz en la disolución de coágulos de sangre.

35 El tPA natural tiene una semivida en plasma de aproximadamente seis minutos o menos. Debido a su rápido aclaramiento de la circulación, el tPA tiene que profundirse para lograr la trombolisis. La dosificación de carga frontal con concentraciones crecientes de tPA se ha mostrado una lisis más rápida y completa en comparación con el protocolo de perfusión estándar y la potencia temprana se correlaciona con una mejor tasa de supervivencia.

*Activadores del plasminógeno y TBI*

40 La existencia continua de los coágulos de fibrina está regulada no solo por la exposición del factor tisular, sino también por el sistema fibrinolítico. La fibrina es lisada por la plasmina. La plasmina se forma a partir de la proenzima plasminógeno a través de la escisión de un solo enlace peptídico, principalmente por el activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) o de tipo uroquinasa (uPA). La actividad de la plasmina está restringida por la formación de complejos enzimáticamente inactivos con el inhibidor circulante  $\alpha_2$ -antiplasmina, mientras que el tPA y el uPA están regulados de una manera similar mediante la formación de complejos con el inhibidor 1 del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). Estos complejos se eliminan rápidamente de la circulación a través de la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP).

50 Los ratones transgénicos deficientes en tPA endógeno (tPA<sup>-/-</sup>) tienen propensión a acumular fibrina espontáneamente [Carmeliet, P. y col., Nature, 369:419 - 424 (1994)] y son menos capaces de lisar coágulos añadidos exógenamente [Carmeliet, P. y col., (1994) Ibid.; Bdeir, K. y col., Blood, 96:1820 - 1826 (2000)]. Por otro lado, los ratones tPA - / - muestran lesiones corticales más pequeñas y menos edema después de una LCT [Mori, T. y col., Clinical Neuroscience and Neurology, 12:4117 - 4120 (2001)] y tienen lesiones más pequeñas y una mejor recuperación de la función neurológica después de una lesión medular [Abe, Y. y col., Journal of Neurotrauma, 20:43 - 57 (2003)] que los ratones SV. En modelos de accidente cerebrovascular iniciados por oclusión mecánica, el tamaño de la zona infartada en ratones tPA - / - también es menor que en los animales SV [Wang, Y. y col., Nat Med, 4:228 - 231 (1998)], mientras que en los modelos caracterizados por trombosis cerebral, la deficiencia de tPA exacerba el depósito de fibrina cerebrovascular y la lesión en el SNC [Tabrizi, P. y col., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 19:2801 - 2806 (1999)]. Estas observaciones sugieren que el tPA puede tener efectos perjudiciales sobre la

función del SNC en el contexto de una LCT, a pesar del beneficio atribuible a su actividad fibrinolítica.

*Vasoactividad cerebral de tPA y sus posibles efectos neurotóxicos*

5 Los presentes inventores han informado anteriormente de que la inyección IV de tPA disminuye la resistencia vascular cerebral en ratas y, por lo tanto, el tPA altera el tono vascular. Los inventores han encontrado previamente que las altas concentraciones (> 20 nm) de tPA estimulan la contracción de los anillos aórticos aislados y aumentan la presión arterial sistémica en ratas [Nassar, T. y col., *Blood*, 103:897 - 902 (2004)]. Por el contrario, el tPA en estas y todas las concentraciones analizadas indujo vasorelajación en la circulación cerebral de cerdos y ratas. La disminución resultante de la resistencia vascular cerebral (RVC) puede estar relacionada con el desarrollo de edema cerebral, una de las complicaciones más graves del accidente cerebrovascular y la revascularización de áreas isquémicas inducidas por tPA. En apoyo de esta idea se encuentra el hallazgo de que los ratones tPA - / - desarrollan menos edema cerebral después de una LCT [Mori, T. y col., (2001) *Ibid.*].

*Receptor de NMDA en la LCT y efecto del tPA en la hemodinámica cerebral*

15 El receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) es un receptor ionotrópico que se une al transmisor aminoacídico excitatorio glutamina. La activación del NMDA-R provoca vasodilatación cerebral y puede representar un mecanismo que acopla el metabolismo local al flujo sanguíneo [Faraci, F.B., *KR. Circulation Research*. 1993,72:476 - 480 (1993)]. Se ha implicado a todos los subtipos de receptores de glutamato en la neurotoxicidad. Sin embargo, se cree que el subtipo NMDA desempeña un papel crucial en la muerte celular neuronal excitotóxica [Choi, D. *Journal of Neurobiology*, 23:1261 - 1276 (1992)]. La hiperactividad del sistema glutamatérgico se ha demostrado en modelos animales de LCT y los antagonistas del NMDA-R protegen contra la lesión cerebral experimental [Katayama Y, B.D. y col., *Journal of Neurosurgery*, 73:889 - 900 (1990); Kawamata, T.K. y col., *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 12:12 - 24 (1992)]. Se ha informado que el tPA señala dentro del SNC mediante la escisión de la subunidad NR-1 del NMDA-R [Nicole O, D.F. y col., *Nat. Med.*, 7:59 - 64 (2001)].

25 En estudios anteriores, los inventores examinaron el papel desempeñado por el receptor de glutamato NMDA (NMDA-R) en la lesión del SNC mediada por tPA después de una LCT. Los resultados de estos experimentos mostraron que el péptido derivado de PAI-1 EEIIMD (también indicado por la SEC ID N° 3) inhibe la vasoactividad mediada por el NMDA-R, incluida la posterior a una LCT.

30 Teniendo en cuenta que el tPA ejerce su efecto sobre el NMDA-R mediante la escisión de su subunidad NR-1, los inventores especularon que el tPA mutante que carece de la actividad catalítica puede competir con el tPA endógeno que se libera y alcanza concentraciones altas en el LCR durante la LCT. Este efecto competitivo puede reducir o incluso prevenir la neurotoxicidad inducida por tPA.

35 Por otra parte, se sabe que el tPA tiene una ventana terapéutica limitada, cuando se utiliza para terapia. Específicamente, el tPA mejora el resultado clínico en pacientes, pero solo si se administra en un plazo de tres horas desde la aparición de un accidente cerebrovascular isquémico en pacientes humanos. Además de su breve ventana terapéutica, la necesidad de una definición radiológica del tamaño del ictus y su etiología y el aumento de la incidencia de hemorragia intracerebral sintomática (HIC) han limitado su uso clínico. Además, como también se ha indicado anteriormente, varios estudios sugieren que el tPA puede aumentar (directa o indirectamente) la degeneración neuronal postictus. Por el contrario, la molécula de tPA mutada de la invención no demuestra una ventana terapéutica limitada. Como se muestra en la Figura 2, la administración de la molécula de tPA mutada de la invención a un modelo animal de HIC incluso dos horas (corresponde con diez horas en el ser humano), tuvo como resultado un efecto neuroprotector beneficioso significativo como se refleja por la mejora de la NSS, específicamente en comparación con los controles de solución salina y con el efecto nocivo del tPA SV sobre el resultado de la NSS.

45 Las alteraciones en la producción de glutamato pueden contribuir además a un traumatismo craneal secundario. Los niveles de glutamato aumentados clínicamente después de una LCT [Choi, D.(1992) *Ibid.*; Katayama Y, B.D. y col.,(1990) *Ibid.*], pueden afectar a otros trayectos relacionados con la lesión cerebral secundaria, incluyendo el iniciación de apoptosis por activación del NMDA-R, la producción dependiente de calcio de óxido nítrico y el desarrollo de superóxidos y daños de radicales libres en el ADN y las membranas celulares. La barrera hematoencefálica (BHE) intacta después de una LCT o ictus puede contribuir a la acumulación de glutamato y se supone que tiene un efecto perjudicial sobre la función cerebral. El tPA aumenta la permeabilidad de la BHE y por lo tanto facilita el aclaramiento de agentes neurotóxicos tales como el glutamato. Este efecto de tPA sobre la BHE está mediado por la LRP (la proteína relacionada con el receptor de LDL es LRP) y otros han demostrado que requiere su actividad catalítica.

55 Sorprendentemente, y en contraste con Yepes y col., [Yepes y col., *J. Clin. Invest.* 112:1533 - 1540 (2003)], los inventores han encontrado ahora que la molécula de tPA mutada de la invención que carece de cualquier actividad catalítica todavía es capaz de imitar algunas de las actividades extracatalíticas del tPA SV, en particular la de aumentar la permeabilidad de la BHE. Por lo tanto, de modo que claramente muestra por primera vez que el efecto de tPA en la reducción de la integridad de la BHE, no está relacionado con su actividad catalítica. Los inventores han demostrado que este mutante estimula el aclaramiento del aminoácido glutamato neurotóxico y del lactato del LCR y, de este modo, impide su acumulación tras una LIC y también aumenta el efecto saludable del mutante sobre el

resultado neurológico. Estos resultados plantean la posibilidad de que la interrupción transitoria de la BHE en el área de la lesión por el tPA mutante contribuye directamente a la mejora del desenlace de la LCT. Eso es opuesto a las visiones ampliamente aceptadas en el campo.

5 Jung-Sun Yi y col., [Experimental Neurology 2004 189(2):354 - 360] divulgan la reducción del infarto en ratas después de la administración intraventricular de activador del plasminógeno tisular (tPA) o de su mutante no proteasa S478A-tPA.

10 Tanto tPA como S478A-tPA mostraron efectos neuroprotectores contra la toxicidad por cinc, pero no contra la muerte neuronal excitotóxica por sobrecarga de calcio en cultivos de células corticales. El efecto mostrado estaba limitado a aproximadamente 15 minutos, ya que no se ha revelado ningún efecto después de 1 hora. Sin embargo, la sorprendente capacidad del mutante de tPA de la presente invención, tPA Ser481-Ala, para permeabilizar la BHE con un efecto terapéutico prolongado que permite su administración parenteral, no se ha divulgado en esta publicación.

15 Yang-Hee Kim y col., [Science 1999 284:647 - 650] pertenecen a la neurotoxicidad mediada por la translocación de cinc endógeno con el fin de estudiar el mecanismo de la muerte neuronal en la isquemia. Yang-Hee Kim demuestra que la exposición de cultivos corticales a cinc durante 24 horas tenía como resultado la muerte neuronal generalizada al día siguiente y que la adición de tPA bloqueaba completamente la muerte celular inducida por el cinc. Sin embargo, en contraste con este efecto protector contra la toxicidad por cinc, Yang-Hee Kim y col., admiten que el tPA no alteró la muerte neuronal excitotóxica inducida por la exposición a NMDA, kainita o glutamato. Por el contrario, en la presente invención, el mutante de tPA mostró sorprendentemente que aliviaba la acumulación de glutamato y lactato.

20 William F. Bennett y col., [The Journal of Biological Chemistry 1991 266(8): 5191 - 5201] se refiere a variantes de tPA y analiza sus determinantes funcionales. Bennett afirma que la estructura primaria de tPA consiste en 5 dominios identificables y los residuos que constituyen el sitio activo incluyen H322, G371 y S478. Bennett y col., han utilizado mutantes dirigidos al sitio para localizar algunas de las regiones funcionales de la molécula de tPA.

25 Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad catalítica serina proteasa, que tiene capacidad para aumentar la permeabilidad de la BHE y, de este modo, facilita el aclaramiento de aminoácidos neurotóxicos y del lactato, como una molécula segura que tiene una amplia ventana terapéutica, para su uso en el tratamiento, mejora y prevención de accidentes cerebrovasculares y afecciones que implican daño neuronal, más particularmente, lesión cerebral aguda y trastornos neurodegenerativos.

30 Estos y otros objetos de la invención serán más evidentes a medida que la descripción proceda.

### **Sumario de la invención**

35 En un primer aspecto, la invención se refiere a una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad proteasa total o parcial o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma. En una realización, la molécula mutada lleva al menos una mutación puntual localizada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con otra realización, la molécula mutada lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala. Un ejemplo específico de dicho mutante lo proporciona un mutante que tiene la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N° 1.

40 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para SI uso en el tratamiento, mejora o profilaxis de una afección patológica que implica lesión neurológica, o una enfermedad o afección isquémica, dicha composición comprende como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad proteasa total o parcial o cualquier fragmento péptido funcional de la misma, y opcionalmente cualquier vehículo, diluyente, excipiente y / o aditivo farmacéuticamente aceptable. La composición de la invención puede comprender además opcionalmente un agente terapéutico adicional, específicamente, un compuesto secuestrante de glutamato.

45 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad serina proteasa total o parcial, o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, mejora o profilaxis de una afección patológica que implica lesión neurológica o de una enfermedad o afección isquémica.

50 La invención proporciona además una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad serínproteasa total o parcial o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, para tratar una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a una forma de dosificación farmacéutica unitaria que comprende al menos una molécula de tPA mutado desprovista de actividad de serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma o cualquier combinación o mezcla de los mismos, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma, y opcionalmente al menos de un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), glucagón, insulina o cualquier combinación de los mismos, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para conseguir un efecto terapéutico en un sujeto en necesidad del mismo que comprende:

(a) al menos una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad de serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma o cualquier combinación o mezcla de los mismos, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una primera forma de dosificación unitaria;

(b) al menos un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), glucagón, insulina o cualquier combinación de los mismos y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación unitaria; y

(c) recipiente significa para contener dichas primera y segunda formas de dosificación

Estos y otros aspectos de la invención se pondrán de manifiesto de la mano de los siguientes ejemplos.

### **Breve descripción de la invención**

**Figure 1.** El tPA mutante mejora significativamente el resultado en un modelo de LCC. La figura representa la puntuación de gravedad neurológica (NSS) de una lesión craneal cerrada (LCC) en un modelo de animales a los que se ha inyectado por vía intraperitoneal (i.p.) tPA mutante (100 µg/ratón) en solución salina o solución salina sola dos horas después del traumatismo craneal.

Abreviaturas: m (mutante), S (solución saina), NSS (puntuación de gravedad neurológica).

**Figura 2.** El tPA mutante mejora significativamente el resultado en un modelo de LCC en comparación con el tPA SV y solución salina.

Se inyectó a ratones SV con LCC Por vía intraperitoneal (i.p.) tPA mutante (MTPA) o tPA SV (100 µg/ ratón) en solución salina o solución salina sola, dos horas después del traumatismo craneal. Se usaron ratones defectivos en tPA (tPA - / -) como control de tPA SV endógeno. La figura muestra un histograma que resume la NSS el día 20 después de la LCC. Se muestran la media ± SEM de 16 a 18 animales / grupo. Abreviaturas: C (control), SV (de tipo salvaje), m (mutante), rat. (ratones), NSS (puntuación de gravedad neurológica).

**Figura 3.** El tPA mutante permeabilizan la BHE

La captación de colorante azul de Evans en un tejido cerebral sirvió como marcador para la cuantificación de la alteración de la barrera hematoencefálica y el aumento de la permeabilidad de la BHE. La figura muestra UN histograma que ilustra la absorbancia del azul de Evans inyectado con solución salina o solución salina que contiene tPA o tPA mutante. Los datos se expresaron como absorbancia a 620 nm por gramo de tejido. Se muestran la media ± SEM de los datos de 8 - 9 animales / grupo. Abreviaturas: m (mutante), S (solución saina), Abs (Absorbancia).

**Figura 4A-4B.** Efecto de péptidos derivados de PAI-1 sobre la permeabilidad de la BHE inducida por el tPA mutante

**Fig. 4A.** Se inyectó a los ratones i.p. 25 µl de solución salina o solución salina que contiene tPA SV o mtPA (1 mg/kg cada uno) solo o junto con PAI-1 derivado de 18 aminoácidos (aa) (como se indica en la SEC ID N° 8) o 6 aa (como se indica en la SEC ID N° 3) péptidos (1 mg / kg cada uno). Diez minutos más tarde se administró a los ratones una inyección i.v. de 2 % de azul de Evans (EB) en solución salina. Una hora después de la inyección del colorante, se retiró la sangre de los órganos mediante perfusión transcardíaca. Se extrajeron los cerebros, se fotografiaron, se pesaron, se homogeneizaron en N,N-dimetilformamida y se centrifugaron. Se cuantificó el colorante extruido mediante absorbancia a 620 nm. La figura presenta una ilustración en histograma de la absorbancia del EB a 620 nm por gramo de tejido. Se muestran la media ± SEM de los datos de 8 - 9 animales / grupo.

**Fig. 4B.** Una distribución típica del EB después de LCC. Abreviaturas: S (solución salina), 18 (péptido de 18 aa, como se indica en la SEC ID N° 8.), 6 (péptido de 6 aa, como se indica en la SEC ID N° 8.), Abs (absorbancia).

**Figura 5.** Duración prolongada de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) tras la LCC por el mutante de tPA

Se trató a los ratones con inyección i.p. de mtPA 1, 2 o 3 horas después de la LCC. Cinco minutos después de la inyección de tPA, se administró a los animales una inyección IV de 2 % de azul de Evans (EB) en solución salina. La extravasación del EB se midió una hora después de la inyección del colorante. La figura presenta una ilustración en histograma de la absorbancia del EB a 620 nm por gramo de tejido. Se muestran la media ± SEM

de los datos de 8 - 9 animales / grupo. Abreviaturas: Abs (Absorbancia), T (tiempo), h (horas), min. (minutos).

**Figura 6A-6B** *El tPA mutante facilita el aclaramiento de agentes neurotóxicos durante la lesión*

La figura muestra un histograma que ilustra los niveles de lactato (Fig. 6A) y glutamato (Fig. 6B) en muestras de LCR obtenidas de ratones inyectados con el tPA mutante, (100 µg/ ratón) en solución salina o solución salina sola por vía intraperitoneal (i.p.), 2 horas después de la LCC. Los ratones que no sufrieron LCC sirvieron como controles. Abreviaturas: Lac (lactato), Glu (glutamato), C (control) LCC (lesión craneal cerrada).

**Figura 7.** *Efecto neuroprotector de la administración combinada de tPA mutante y secuestrante de glutamato*

Se inyectó a los ratones i.v. un secuestrante que comprende oxaloacetato (0,005 mmol /100 g de ratón) y GOT recombinante (0,14 nmol / 100 g) 10 minutos o 2 horas después de la LCC. Se administró 1 mg/kg de mtPA 2 horas después de la LCC solo o con el secuestrante. La figura muestra la NSS el día 20 (media ± SEM de 16 a 18 animales / grupo).

Abreviaturas: T (tiempo), m (minutos), h (hora), sec (secuestrante), NSS (puntuación de gravedad neurológica).

**Descripción detallada de la invención**

Debe entenderse que la invención no está limitada a su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La invención puede abarcar otras realizaciones o se puede practicar de varias formas. Asimismo, debe entenderse que las expresiones y la terminología empleadas en el presente documento se usan con una finalidad descriptiva y no deben considerarse limitantes.

En un primer aspecto, la invención se refiere a una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad proteasa total o parcial, específicamente actividad serínproteasa, o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma.

El activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA), una serínproteasa glicosilada de múltiples dominios, es un activador específico de fibrina del plasminógeno y un agente trombolítico muy eficaz. Se debe apreciar que "tPA mutado" o "mtPA" como se usa en el presente documento incluye un tPA nativo mutado y tPA mutado recombinante, así como formas modificadas de tPA que están desprovistas de las actividades enzimáticas del tPA nativo. Más específicamente, como se utiliza en el presente documento en la especificación y en la sección de reivindicaciones siguiente, la expresión "desprovisto de actividad catalítica de proteasa o serínproteasa" y sus derivados se refiere a una molécula de tPA mutado que tiene una expresión alterada, disminuida o reducida de la actividad. Una molécula de tPA mutado preferida carece de cualquier actividad catalítica. De acuerdo con una realización de la presente invención, al menos aproximadamente el 10-100 %, más específicamente aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % e incluso 100 % de la actividad de tPA es abolida por la mutación puntual realizada por la invención, en comparación con la actividad de tPA SV (de tipo salvaje). Cabe señalar que la actividad enzimática de tPA se puede medir mediante la evaluación de la capacidad de la molécula para convertir el plasminógeno en plasmina.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de tPA mutado de la invención lleva al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en mutaciones puntuales, de sentido erróneo, sin sentido, inserciones, deleciones o reordenamiento. En una realización específica, la molécula de tPA de la invención lleva una mutación puntual.

En una realización, la molécula mutada lleva al menos una mutación puntual localizada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con otra realización, la molécula mutada lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala. Un ejemplo específico para tal mutante lo proporciona un mutante que tiene la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEC ID N° 1. Debe indicarse que esta molécula de tPA mutado de la invención se designa tPA-S481A o tPA S-<sup>481</sup>A y en algunas realizaciones la molécula mutada se conoce como mtPA. Cabe señalar que esta molécula mutada particular lleva dos residuos adicionales de aminoácidos (RS) en el extremo N introducidos con el propósito de clonar. Por lo tanto, la invención proporciona una molécula de tPA mutado que comprende ambos residuos RS como se muestra en la SEC ID N° 1. La invención proporciona además una molécula de tPA mutado, que tiene una parte de SEC ID N° 1, por ejemplo, sin RS adicionales.

Por "fragmentos o péptidos" se entiende una fracción de dicha molécula de tPA. Un "fragmento" de una molécula, tal como cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la presente invención, se entiende que se refiere a cualquier subconjunto de aminoácidos de la molécula de tPA mutado. Esto también puede incluir "variantes" o "derivados" de los mismos. Un "péptido" se entiende que se refiere a un subconjunto particular de aminoácidos que tiene actividad funcional. Por "funcional" se entiende que tienen la misma función biológica, por ejemplo, que tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE y de ese modo facilitar la eliminación de aminoácidos neurotóxicos, o que tiene la capacidad de competir con el tPA SV y, por tanto, inhibir la activación del NMDA -R mediante tPA. Una "variante" de dicha molécula se entiende que se refiere una molécula de origen natural sustancialmente similar a la molécula entera o a un fragmento de la misma. El término "derivados" como se usa en el presente documento significa una molécula que comprende la secuencia de aminoácidos de la molécula de tPA mutado, como se indica por la SEC ID N° 1 con cualquier inserción, deleción, sustitución y modificación que no interfiere con la capacidad de

dicha molécula para aumentar la permeabilidad de la BHE y de ese modo facilita la eliminación de aminoácidos neurotóxicos, o como alternativa o adicionalmente, para reconocer el sitio de escisión la NR = 1 del NMDA-R, competir con la molécula de tPA de tipo salvaje y, con ello, inhibir la activación de NMDA-R. Un derivado debe mantener una homología mínima con dicha secuencia de aminoácidos, por ejemplo, incluso menos del 30 %, preferiblemente, de 90 % a 40 % de homología, de 80 % a 50 % o de 70 % a 60 %. Debe apreciarse que con los términos "inserciones" y "eliminaciones" se entiende cualquier adición o reducción, respectivamente, de residuos de aminoácidos en el péptido tPA mutado utilizado por la invención, de entre 1 a 50 residuos de aminoácidos, preferiblemente, de entre 1 y 20 residuos de aminoácidos y, lo más preferiblemente, de entre 1 y 10 residuos de aminoácidos. Más particularmente, las inserciones o deleciones, respectivamente, pueden incluir la adición o reducción de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos a la molécula de tPA mutado de la SEC ID N° 1. Una realización específica para tal derivado es una molécula mutada sin residuos RS adicionales en el extremo N-terminal de la molécula.

El amino ácido L-glutámico (glutamato) media muchas de las señales excitatorias entre las neuronas en el sistema nervioso central. En condiciones normales, la acumulación de glutamato en el espacio extracelular se evita mediante la operación de un mecanismo de reciclaje que sirve para mantener los niveles de glutamato neuronales a pesar de la pérdida continua a través de la liberación del transmisor. El glutamato, liberado por las neuronas glutamatérgicas, es captado por las células gliales en las que se convierte en glutamina. La glutamina vuelve a entrar en las neuronas y es hidrolizada por la glutaminasa para formar glutamato, de modo que repone el conjunto de neurotransmisores.

Esta vía bioquímica también sirve como un mecanismo neuroprotector endógeno, que funciona mediante la eliminación del glutamato liberado sinápticamente desde el espacio extracelular y su conversión en el aminoácido no tóxico glutamina antes de que se produzca toxicidad. El potencial excitotóxico del glutamato (es decir, definido como la capacidad del exceso de glutamato para sobreexcitar las neuronas y provocar su muerte) se mantiene bajo control, siempre y cuando el proceso de transporte está funcionando correctamente. Sin embargo, el fracaso o la reducción en el proceso de transporte, como en condiciones isquémicas, tiene como resultado la acumulación de glutamato en el fluido sináptico extracelular y la estimulación excesiva de los receptores excitatorios, situación que lleva a la muerte neuronal. Dos factores adicionales mejoran la acumulación de glutamato, (i) las neuronas sobreestimuladas comienzan a liberar cantidades excesivas de glutamato en las uniones sinápticas adicionales, lo que hace que incluso más neuronas se sobreestimen, lo que las lleva a una cascada neurotóxica que llega más allá de la zona inicial de la isquemia; y, (ii) las neuronas sobreestimuladas comienzan utilizando todos los suministros disponibles de glucosa o de oxígeno aún más rápido de lo normal, lo que conduce al agotamiento acelerado de estos recursos energéticos limitados y a mayores daños en el proceso de transporte de glutamato. Esta cascada bioquímica de la inducción y progresión puede continuar durante horas o días y causa la muerte neuronal retardada. Niveles anormalmente altos de glutamato en los fluidos intersticial y cefalorraquídeo del cerebro son el sello característico de varios trastornos neurodegenerativos. Estos incluyen anoxia / isquemia cerebral aguda, es decir accidente cerebrovascular, daño cerebral perinatal, lesión cerebral traumática, meningitis bacteriana, hemorragia subaracnoidea, choque hemorrágico, epilepsia de diagnóstico reciente, migraña, estrés y diversas enfermedades neurodegenerativas crónicas tales como glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica, demencia por VIH y la enfermedad de Alzheimer.

El glutamato se une o interacciona con uno o más receptores de glutamato que se pueden diferenciar farmacológicamente en varios subtipos. En el sistema nervioso central de los mamíferos (SNC) hay tres subtipos principales de receptores ionotrópicos de glutamato, definidos farmacológicamente por los agonistas selectivos N-metil-D-aspartato (NMDA), kainato (KA), y ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxazol-4-propiónico (AMPA).

En condiciones patológicas de formas agudas y crónicas de neurodegeneración, la sobreactivación de los receptores de NMDA es un acontecimiento clave para disparar la muerte celular neuronal. Los receptores de NMDA están compuestos por miembros de dos familias de subunidades, a saber, NR-1 (8 variantes de corte y empalme diferentes) y NR-2 (A a D) procedentes de diferentes genes. Los miembros de las dos familias de subunidades muestran una distribución distinta en diferentes áreas del cerebro.

Cuando se activa por medio del glutamato, el neurotransmisor endógeno, el receptor NMDA permite el influjo del calcio extracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y del sodio ( $\text{Na}^+$ ), a través de un canal de iones asociado. El receptor NMDA posibilita un influjo considerablemente mayor de  $\text{Ca}^{2+}$  que los receptores de kainato o AMPA y es un ejemplo de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  accionado por medio de un receptor. Normalmente, el canal se abre solo brevemente, lo que permite que se produzca un aumento localizado y transitorio de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), que a su vez, altera la actividad funcional de la célula. Sin embargo, los aumentos prolongados de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , resultantes de la estimulación crónica del receptor NMDA, son tóxicos para la célula y conducen a la muerte celular. Se considera que la elevación crónica de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  resultante de la estimulación de los receptores NMDA constituye una causa principal de la degeneración neuronal posterior a un ictus. Asimismo se dice que la estimulación excesiva de los receptores NMDA está implicada en la patogenia de algunas formas de epilepsia, ansiedad, enfermedades neurodegenerativas y estados hiperalérgicos.

El efecto perjudicial de los activadores del plasminógeno tisular (tPA) sobre el tejido cerebral después de una lesión neurológica y la necesidad de encontrar nuevos enfoques para el tratamiento, mejora o profilaxis de estados patológicos que implican lesión neuronal, han conducido a los presentes inventores a examinar si una molécula de

tPA mutado podría ser capaz de competir con tPA endógeno y, por lo tanto, inhibir, mejorar o prevenir tales afecciones patológicas. Cabe señalar además que la molécula de tPA mutado de la invención está desprovista de cualquier actividad serínproteasa y, por lo tanto, exhibe una capacidad deteriorada (no presenta capacidad) para disolver coágulos de sangre. Por lo tanto, la molécula de tPA mutado de la invención proporciona un compuesto seguro que tiene una probabilidad reducida de causar un sangrado incontrolado interno que puede estar causado por la molécula de tPA SV.

Los datos mostrados por los presentes inventores indican que al disminuir la concentración de glutamato después de TBI en la circulación, presumiblemente mediante el aumento de la permeabilidad de la BHE, el resultado de los animales mejora. Adicionalmente, como se muestra en la Figura 7, el tratamiento usando compuestos secuestrantes de glutamato fue ineficaz cuando se administró después de la recuperación de la BHE. Solo una combinación de los compuestos secuestrantes de glutamato con la molécula de tPA mutado de la invención produjo un aumento de la permeabilidad de la BHE y, por lo tanto, se produjo un efecto beneficioso sinérgico sobre la NSS, incluso más de dos horas después de la lesión. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, tales resultados sugieren fuertemente que el aumento de la permeabilidad de la BHE por el mutante de la invención contribuye a la eficiencia del aclaramiento de los reactivos neurotóxicos.

Por lo tanto, la invención proporciona además un compuesto capaz de aumentar la permeabilidad y reducir la integridad de la BHE y, de ese modo, mejorar el aclaramiento de los agentes neurotóxicos. La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura membránica que actúa principalmente para proteger al cerebro de sustancias químicas en la sangre, al tiempo que permite la función metabólica esencial. Se compone de células endoteliales, que se empaquetan muy firmemente en los capilares cerebrales. Esta mayor densidad restringe el paso de sustancias desde el torrente sanguíneo mucho más que las células endoteliales en los capilares de otras partes del cuerpo. Proyecciones celulares de los astrocitos, denominados pies astrocíticos (también conocidos como "limitans gliales") rodean a las células endoteliales de la BHE, de modo que proporcionan apoyo bioquímico a esas células.

De acuerdo con una realización, la molécula de tPA mutado de la invención es capaz de disminuir la integridad, incrementar la permeabilidad o "abrir" una barrera hematoencefálica en aproximadamente un 10-95 % en comparación con un control. De acuerdo con una forma de realización, el control es la integridad, la permeabilización o la apertura de la BHE después de una LCC, en ausencia de la molécula de tPA mutado. De acuerdo con otra forma de realización, el control es la integridad o la permeabilidad de la BHE, antes de que ocurriera la LCC. Más específicamente, la molécula de tPA mutado de la invención es capaz de aumentar la permeabilidad de la BHE en aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % e incluso 99 % en comparación con el control. Cabe señalar que el aumento de permeabilidad de la BHE tiene como resultado una disminución correspondiente de la acumulación de agentes neurotóxicos en el tejido dañado. Más específicamente, tal reducción puede ser de aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % e incluso 99 % en comparación con el control.

De acuerdo con una realización, dicho compuesto puede ser una molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma. Como se muestra por la invención, este mutante es capaz de aumentar la permeabilidad de la BHE, y, de ese modo, mejorar la eliminación de agentes neurotóxicos. Como se muestra en la Figura 5, la molécula de tPA mutado de la invención aumenta la permeabilidad de la BHE, incluso cuando se inyecta tres horas después de la aparición de la lesión. Estos resultados indican claramente que la molécula de tPA mutado de la invención es un fármaco seguro, ya que carece de propiedades de disolución de coágulos de sangre, y es un fármaco eficaz, que tiene una amplia ventana terapéutica. Por ventana terapéutica como se usa en el presente documento se entiende que la molécula de tPA mutado de la invención es eficaz en el aumento de la permeabilidad de la BHE y la reducción de la NSS cuando se administra entre 10 minutos a varios días después de la aparición de la lesión. Más específicamente, la molécula mutada de la invención es eficaz cuando se administra a un sujeto dañado después de 10', 20', 30', 45', 50', 60', 90', 150', 180', 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días e incluso 7 días o más después de la aparición de la lesión.

Se debe apreciar que la invención abarca además el uso de la molécula de tPA mutado de la invención para facilitar la liberación de diferentes fármacos en un tejido cerebral diana mediante el aumento de la permeabilidad de la BHE.

En aún otra realización, la molécula de tPA mutado de la invención exhibe un efecto terapéutico beneficioso sobre la lesión cerebral, como se refleja en la reducción de la NSS. Como se indica en el presente documento, dicha reducción o disminución puede ser de aproximadamente 10 a 95 %, en concreto, aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % e incluso 99 % de la NSS en un sujeto en necesidad del mismo.

Además, sin estar limitado por ninguna teoría, la molécula de tPA mutado puede ejercer su efecto neuroprotector mediante la prevención de la activación de NMDA-R por el tPA SV. Por otra parte, EL posible mecanismo por el cual EL tPA ejerce su efecto neurotóxico A través de la activación deL NMDA-R, plantea la posibilidad de identificar



compuestos que inhiben la activación del NMDA-R por tPA, como potencial enfoque terapéutico.

De acuerdo con una realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado o fragmentos de la misma es capaz de inhibir la activación por el tPA de NMDA-R.

5 Por lo tanto, la invención proporciona además un compuesto capaz de inhibir la activación del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA-R) por EL tPA (activador del plasminógeno tisular) para el tratamiento, mejora o profilaxis de los trastornos mediados por el NMDA-R.

10 Como se usa en el presente documento, los trastornos mediados por NMDA-R pueden ser una cualquiera de las formas agudas de neurodegeneración o afecciones de anoxia / isquemia causadas, por ejemplo, por un accidente cerebrovascular, daño cerebral perinatal, lesión cerebral traumática, meningitis bacteriana, hemorragia subaracnoidea, choque hemorrágico, epilepsia de diagnóstico reciente, ansiedad, migraña, estrés y diversos trastornos neurodegenerativos crónicos tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), glaucoma, esclerosis lateral amiotrófica, demencia por VIH, estados hiperalgésicos y neurodegeneración asociada con infecciones bacterianas o virales, o depresión y dolor crónico y agudo.

15 De acuerdo con una realización, el compuesto de la invención puede ser una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma capaz de inhibir la activación de NMDA-R y, por lo tanto, inhibir, mejorar o prevenir los trastornos mediados por NMDA-R.

Más específicamente, dicho mutante puede ser la molécula mutada de la invención.

20 Las alteraciones en la producción de glutamato contribuyen a aspectos de lesión craneal secundaria. Los niveles de glutamato aumentan clínicamente después de una LCT [Choi, D.(1992) *Ibid.*; Katayama Y, B.D. y col.,(1990) *Ibid.*], y afectan a otros trayectos relacionados con la lesión cerebral secundaria, incluyendo la activación de la apoptosis por activación del NMDA-R, la producción dependiente de calcio de óxido nítrico y el desarrollo de superóxidos y daños de radicales libres en el ADN y las membranas celulares [Kawamata (1992) *ibid.*; LaPlaca (1998) *ibid.*].

25 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende al menos una molécula de tPA mutado (activador del plasminógeno tisular) desprovista de actividad serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma. La composición de la invención opcionalmente comprende además un agente terapéutico adicional. Cabe señalar además que la composición de la invención comprende además cualquier vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

30 De acuerdo con una realización, el agente terapéutico adicional comprendido dentro de la composición de la invención puede ser al menos un compuesto secuestrante de glutamato, específicamente, un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato – oxaloacetato transaminasa (GOT), insulina, glucagón o cualquier composición o combinación de los mismos. En una realización específica, el secuestrante de glutamato es al menos uno de glutamato-piruvato transaminasa(GPT) y glutamato – oxaloacetato transaminasa (GOT), o cualquier combinación de los mismos.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para SI uso en el tratamiento, mejora o profilaxis de una afección patológica que implica lesión neurológica, o una enfermedad o afección isquémica, dicha composición comprende como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad proteasa total o parcial o cualquier fragmento péptido funcional de la misma, y opcionalmente cualquier vehículo, diluyente, excipiente y / o aditivo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con  
40 una realización, la composición de la invención opcionalmente comprende además un agente terapéutico adicional.

45 Una "enfermedad o afección isquémica" como se usa en el presente documento se refiere a una afección caracterizada por inflamación local que resulta de una interrupción en la irrigación sanguínea a un tejido debido a una obstrucción o hemorragia del vaso sanguíneo responsable del suministro de sangre al tejido, tal como se ve en el infarto de miocardio o cerebral. Un accidente isquémico cerebral o isquemia cerebral es una forma de afección isquémica en la que se bloquea el suministro de sangre al cerebro. Esta interrupción en el suministro de sangre al cerebro puede ser el resultado de varias causas, incluyendo un bloqueo intrínseco o la oclusión del propio vaso sanguíneo, una fuente de oclusión de origen remoto, disminución de la presión de perfusión o aumento de la viscosidad de la sangre que resulta en un flujo sanguíneo cerebral inadecuado, o un vaso sanguíneo roto en el espacio subaracnoideo o e tejido intracerebral.

50 Por tanto, la invención proporciona una molécula de tPA mutado para tratar la enfermedad o afección isquémica, más específicamente, para el tratamiento de la isquemia cerebral. La isquemia cerebral puede tener como resultado déficit transitorios o permanentes y la gravedad del daño neurológico en un paciente que ha experimentado isquemia cerebral depende de la intensidad y la duración del acontecimiento isquémico. Un ataque isquémico transitorio (AIT) es uno en el que el flujo de sangre al cerebro se interrumpe solo brevemente y causa déficit neurológicos  
55 temporales, que a menudo están claros en menos de 24 horas. Los síntomas de un AIT incluyen entumecimiento o debilidad de la cara o las extremidades, pérdida de la capacidad de hablar con claridad y / o entender el habla de los otros, una pérdida de la visión o visión borrosa y sensación de mareo. Los ataques isquémicos cerebrales

5 permanentes, también denominado accidente cerebrovascular, están causados por una interrupción más prolongada en el flujo de sangre al cerebro resultante ya sea de una tromboembolia o hemorragia. Un ictus causa una pérdida de neuronas que normalmente produce un déficit neurológico que puede mejorar, pero que no resuelve por completo. El ictus tromboembólico se debe a la oclusión de un vaso sanguíneo extracraneal o intracraneal por un trombo o émbolo. Debido a que a menudo es difícil discernir si un ictus está causado por una trombosis o una embolia, el término "tromboembolia" se utiliza para cubrir los ictus causados por cualquiera de estos mecanismos. El término tromboembolia se utilizará en toda esta solicitud de patente para describir ictus trombóticos e ictus embólicos. El ictus hemorrágico está causado por la rotura de un vaso sanguíneo en un espacio subaracnoideo o tejido intracerebral.

10 Por lo tanto, la molécula de tPA mutado de la invención o cualquier composición de la misma, está particularmente destinado al uso en el tratamiento del ictus.

En aún otra realización, la molécula de tPA mutado de la invención puede usarse para uso en el tratamiento de un ataque al corazón.

15 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden ser aplicables para su uso en el tratamiento, mejora y la profilaxis de condiciones patológicas que implican lesión neurológica, tales como, por ejemplo, lesión cerebral aguda o traumática, anoxia cerebral, daño cerebral prenatal, ictus hemorrágico e isquémico global y focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, intervención de neurocirugía, daño de las células nerviosas inducido por hipoxia (tal como en la parada cardíaca o el sufrimiento neonatal), epilepsia, ansiedad, y un trastorno neurodegenerativo.

20 De acuerdo con una realización específica, la composición de la invención puede ser aplicable específicamente para el tratamiento de la LCT.

25 La LCT como se utiliza en el presente documento incluye las lesiones cerebrales que se producen en accidentes de vehículos de motor, después de caídas, causadas por un asalto y en el deporte cuando se aplica la suficiente fuerza en la cabeza como para producir daños en la estructura del cerebro. Dicha lesión puede incluir hematomas, lagrimeo e inflamación del tejido cerebral. Puede incluir hemorragia intracraneal, tal como hemorragia subdural, epidural, subaracnoidea, intraparenquimatosa e intraventricular. El tejido cerebral puede estar dañado debido a, por ejemplo, el corte de los axones, aun cuando no se produzca sangrado. A pesar de la amplia investigación durante muchos años en varios ensayos clínicos grandes, actualmente no existen tratamientos eficaces para la LCT aparte de la atención de soporte meticoloso.

30 Una definición de LCT se proporciona en la Ley de Educación para Personas con Discapacidades que define la lesión cerebral traumática como "una lesión adquirida del cerebro causada por una fuerza física externa, que tiene como resultado una discapacidad funcional total o parcial o deterioro psicosocial, o ambos, que afecta adversamente el rendimiento académico del niño. El término que se usa en el presente documento se aplica a lesiones cerebrales tanto abiertas como cerradas que tienen como resultado deterioros en una o más áreas, tales como la cognición, el lenguaje, la memoria, la atención, el razonamiento, el pensamiento abstracto, el juicio, la resolución de problemas, las capacidades sensorial, de percepción y motoras, el comportamiento psicosocial, las funciones físicas, el procesamiento de la información, y el habla.

35 La LLC se produce en personas de todas las edades, incluyendo bebés y niños, jóvenes, adultos y ancianos. Una definición similar se aplica a las personas de todas las edades, con la modificación de que pueden estar implicados deterioros del funcionamiento relacionados con el trabajo, cognitivo, conductual, emocional y social, además de los efectos adversos sobre el rendimiento educativo.

40 Los signos y síntomas de la LCC incluyen alteración de la función cognitiva, alteración del comportamiento, alteración de la regulación emocional, convulsiones, dolores de cabeza, alteración de la estructura o la función del sistema nervioso y un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. La función cognitiva alterada incluye, entre otras cosas, dificultades con la memoria, la atención, la concentración, el pensamiento abstracto, la creatividad, la función ejecutiva, la planificación y la organización. El comportamiento alterado incluye, entre otros, agresión física o verbal, impulsividad, disminución de la inhibición, apatía, disminución de la iniciación, cambios en la personalidad, abuso de alcohol, tabaco o drogas, y otros comportamientos relacionados con la adicción. La alteración de la regulación emocional incluye, entre otros, depresión, ansiedad, manía, irritabilidad e incontinencia emocional. Las convulsiones incluyen, entre otros, crisis tónico-clónicas generalizadas, crisis parciales complejas y crisis psicogénicas no epilépticas. Los dolores de cabeza incluyen, entre otros, migraña común, migraña clásica, migraña compleja o atípica, cefalea en racimos y cefalea tensional. La alteración de la estructura o la función del sistema nervioso incluyen, entre otras, hidrocefalia, parkinsonismo, trastornos del sueño, psicosis, deterioro del equilibrio y la coordinación. Esto incluye deficiencias motoras, tales como monoparesia, hemiparesia, tetraparesia, ataxia, balismo y temblor. Esto también incluye la pérdida o disfunción sensorial, incluyendo las sensaciones olfativa, táctil, gustativa, visual y auditiva. Además, esto incluye alteraciones en el sistema nervioso autónomo, tales como disfunción intestinal y vesical, disfunción sexual, alteración de la regulación de la presión arterial y la temperatura. Finalmente, esto incluye las deficiencias hormonales atribuibles a una disfunción del hipotálamo y la hipófisis, tales como deficiencias y alteración de la regulación de la hormona del crecimiento, la hormona estimulante del tiroides, la hormona luteinizante, la hormona estimulante de foliculo, la hormona liberadora de gonadotropina, la prolactina, y

otras numerosas hormonas y moduladores. El aumento del riesgo de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer incluye el riesgo que es mayor que el riesgo esperado dada la edad del paciente, los antecedentes familiares, el estado genético y otros factores de riesgo conocidos.

5 Cabe señalar que la lesión cerebral aguda o traumática puede ser una cualquiera de las lesiones cerebrales que se producen en accidentes de vehículos de motor, tras caídas, causada por una asalto o en los deportes, dicha lesión incluye hematomas, lagrimeo e hinchazón del tejido cerebral, hemorragia intracraneal (tal como hemorragia subdural, epidural, subaracnoidea, intraparenquimatosa e intraventricular), y el corte de los axones.

De acuerdo con otra realización específica, las composiciones de la invención pueden ser aplicables a sujetos que sufren trastornos neurodegenerativos o trastornos neurológicos.

10 Un "trastorno neurológico" es una enfermedad o trastorno caracterizado por una anomalía o mal funcionamiento de las células neuronales o las células de apoyo neuronales. El trastorno puede afectar el sistema nervioso central y / o al sistema nervioso periférico. Enfermedades neurológicas de ejemplo incluyen neuropatías, atrofia del músculo esquelético y enfermedades neurodegenerativas.

15 Los "trastornos neurodegenerativos" son enfermedades complejas y perniciosas, y a su aparición le sigue un deterioro progresivo. Las manifestaciones clínicas están determinadas por la localización y la gravedad del trastorno. Aunque las causas pueden ser diferentes, es probable que los pacientes con trastornos neurodegenerativos muestren atrofia localizada o generalizada de las células del cerebro, lo que da lugar a compromisos tanto en la función mental como física. Las enfermedades neurodegenerativas de ejemplo incluyen: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), enfermedad de Huntington, taupatías como enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, degeneración cortico-basal y parálisis supranuclear progresiva, y encefalopatías espongiiformes, tales como tembladera, enfermedad de las vacas locas y encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Insomnio familiar mortal, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker y Kuru.

25 Mentalmente, los pacientes pueden presentar olvidos, falta de memoria, disminución de la capacidad mental, trastornos emocionales, y / o alteraciones del habla. Físicamente, los pacientes pueden presentar incontinencia parcial o completa, aspiración de partículas de alimentos, temblores, falta de equilibrio, rigidez muscular, y / o parálisis muscular.

30 Las expresiones "cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" de la molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa y cualquier fragmento o péptido funcional de la misma comprendidas dentro de las composiciones farmacéuticas de la invención significa una cantidad necesaria para lograr un resultado seleccionado. La "cantidad terapéutica eficaz" se determina por la gravedad de la enfermedad en relación con los objetivos preventivos o terapéuticos, la vía de administración y el estado general del paciente (edad, sexo, peso y otras consideraciones conocidas por el médico responsable de la atención).

35 De acuerdo con una realización específica, la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, y cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, se puede administrar dentro de una forma unitaria de dosificación en el intervalo de aproximadamente 1 µg / kg a aproximadamente 100 mg / kg de peso corporal, específicamente, de aproximadamente 10 µg / kg a aproximadamente 10 mg / kg de peso corporal, más específicamente, aproximadamente 10 µg / kg, 20 µg / kg, 30 µg / kg, 40 µg / kg, 50 µg / kg, 60 µg / kg, 70 µg / kg, 80 µg / kg, 90 µg / kg, 100 µg / kg, 200 µg / kg, 300 µg / kg, 400 µg / kg, 500 µg / kg, 600 µg / kg, 700 µg / kg, 800 µg / kg, 900 µg / kg, 1000 µg / kg, 2 mg / kg, 3 mg / kg, 4 mg / kg, 5 mg / kg, 6 mg / kg, 7 mg / kg, 8 mg / kg, 9 mg / kg y 10 mg / kg. Una realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 1 mg / kg. Otra forma de realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal.

45 De acuerdo con otra realización, la molécula de tPA mutado comprendida dentro de las composiciones farmacéuticas de la invención lleva al menos una mutación puntual localizada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con otra realización, la molécula mutada lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala. Un ejemplo específico de dicho mutante lo proporciona un mutante que tiene la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N° 1, denominada tPA-S481A, o tPA-S<sup>481</sup>A.

50 De acuerdo con una realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado es específicamente tal como se describe en la invención.

55 En muchos casos, las terapias de combinación que emplean dos o más compuestos terapéuticos son necesarias para tratar adecuadamente la afección médica y / o los efectos secundarios a la afección bajo tratamiento. Por lo tanto, la molécula de tPA mutado de la invención se puede emplear solo o, como alternativa, junto con diversos otros agentes terapéuticos para tratar un espectro más amplio de anomalías de lesiones cerebrales, específicamente, elevando permeabilidad de la BHE facilitando de este modo el aclaramiento de reactivos neurotóxicos. La combinación de dos medicamentos permeabilizantes de la BHE mejora con seguridad y eficacia el efecto beneficioso global sobre todas las anomalías de lesiones cerebrales y reduce los factores de riesgo de enfermedades isquémicas.

De acuerdo con una realización, la composición de la invención puede comprender un agente terapéutico adicional. Como se muestra en la Figura 7, la molécula de tPA mutado de la invención exhibe un efecto beneficioso sinérgico sobre la NSS de sujetos con LCC, cuando se combinan con compuestos secuestrantes de glutamato. Por lo tanto, en una realización específica, la composición de la invención puede comprender como agente terapéutico adicional, un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) o cualquier composición o combinación de las mismas. El secuestrante de glutamato es un grupo de compuestos que aumentan el flujo de salida del glutamato que se acumula en el cerebro después de una LCC a la sangre. La glutamato piruvato transaminasa (GPT) y la glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) en plasma transforman el glutamato en 2-cetoglutarato en presencia de sus cosustratos respectivos, piruvato y oxaloacetato.

Como se muestra en la Figura 3 el Ejemplo 2 siguiente, la molécula de tPA mutado de la invención es capaz de aumentar la permeabilidad de la BHE y, de este modo, facilitar el aclaramiento de agentes neurotóxicos tales como glutamato y lactato (demostrado por la Figura 6). Por consiguiente, la invención proporciona además una composición para mejorar el aclaramiento de agentes neurotóxicos que comprenden como ingrediente activo una molécula de tPA mutado desprovista de actividad catalítica serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, en la que dicha molécula de tPA mutado es capaz de aumentar la permeabilidad de la BHE y, por lo tanto, inhibir, mejorar o prevenir la acumulación de agentes neurotóxicos. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, la composición de la invención es particularmente aplicable al aumento de la permeabilidad de la BHE (barrera hematoencefálica) en un sujeto en necesidad del mismo. Más específicamente, la composición de la invención puede utilizarse para aumentar la permeabilidad o reducir de la integridad de la BHE, y extender la duración de la permeabilidad de la BHE durante aproximadamente 10 minutos a siete días después de la lesión cerebral, lo que facilita el aclaramiento de agentes neurotóxicos del tejido cerebral dañado.

De acuerdo con otra realización, la composición de la invención reduce eficazmente la NSS (puntuación de gravedad neurológica) en un sujeto en necesidad de la misma. Más específicamente, la composición de la invención puede conducir a la reducción de aproximadamente 10 a 95 %, específicamente de aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % e incluso 99 % de la NSS en un sujeto en necesidad de la misma, en comparación con los sujetos no tratados..

En otra realización específica más de este aspecto, la molécula de tPA mutado o fragmentos o péptidos funcionales de la misma pueden ser capaces de inhibir la activación por el tPA de NMDA-R.

Por tanto, la invención proporciona además una composición para inhibir la activación por el tPA del NMDA-R que comprende como ingrediente activo una molécula de tPA mutado desprovista de actividad catalítica serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, en la que dicha molécula de tPA mutado es capaz de inhibir la activación por el tPA del NMDA-R y, por lo tanto, inhibir, mejorar o prevenir los trastornos mediados por el NMDA-R. De acuerdo con una realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado es tal como se describe en la invención.

La preparación de composiciones farmacéuticas es bien conocida en la técnica y se ha descrito en muchos artículos y libros de texto, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro A. R. ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, y especialmente las págs. 1521 - 1712 del mismo.

Las formulaciones terapéuticas se pueden administrar en cualquier formulación de dosificación convencional. Normalmente, las formulaciones comprenden al menos un ingrediente activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más excipientes, vehículos aceptables de las mismas.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitaciones, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Cada vehículo deberá ser farmacéutica y fisiológicamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes y no dañinos para el paciente. Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluidas las vías subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). Las formulaciones pueden presentarse cómodamente en una forma de monodosis y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. La naturaleza, la disponibilidad y las fuentes, y la administración de todos estos compuestos, incluyendo las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un sujeto, son bien conocidos en la técnica y no tienen que describirse adicionalmente en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar y dosificar de acuerdo con la buena práctica médica.

Las composiciones de la invención pueden comprender el principio activo en forma libre y administrarse directamente al sujeto a tratar. Normalmente, las formulaciones comprenden al menos un ingrediente activo, como se ha definido anteriormente, junto con uno o más vehículos aceptables. Cada vehículo deberá ser farmacéutica y

fisiológicamente aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes y no dañinos para el paciente.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para administración parenteral (incluyendo intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) e intradérmica), oral o nasal. Las formulaciones pueden presentarse cómodamente en una forma de monodosis y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia. La naturaleza, la disponibilidad y las fuentes, y la administración de todos estos compuestos, incluyendo las cantidades eficaces necesarias para producir efectos deseables en un sujeto, son bien conocidos en la técnica y no tienen que describirse adicionalmente en el presente documento.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden en general un agente tampón, un agente que ajusta la osmolaridad de las mismas y, opcionalmente, uno o más vehículos, excipientes y / o aditivos farmacéuticamente aceptables, tal como se conocen en la técnica. Ingredientes activos complementarios también se pueden incorporar en las composiciones. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos.

Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en la técnica. Excepto cuando alguno de los medios o agentes convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en la composición terapéutica.

En casos en los que la administración oral está en forma de un comprimido o cápsula, los componentes de fármaco activo (preparación de inmunoglobulina) se pueden combinar con un vehículo inerte no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, azúcares modificados, almidones modificados, metilcelulosa y sus derivados, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol, y otros azúcares reductores y no reductores, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearil fumarato sódico, behenato de glicerilo, estearato de calcio y similares. Para la administración oral en forma líquida, los componentes de fármaco activo se pueden combinar con vehículos inertes no tóxicos farmacéuticamente aceptables tales como etanol, glicerol, agua y similares. Cuando se desee o sea necesario, también se pueden incorporar en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes y aromatizantes adecuados. Agentes estabilizantes tales como antioxidantes, galato de propilo, ascorbato de sodio, ácido cítrico, metabisulfito de calcio, hidroquinona, y 7-hidroxycumarina también pueden añadirse para estabilizar las formas de dosificación. Otros compuestos adecuados pueden incluir gelatina, edulcorantes, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, goma de tragacanto o alginatos, carboximetilcelulosa, polietileno, glicol, ceras y similares.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la invención proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos para su uso en el tratamiento de una afección patológica. Los términos "tratar, que trata, tratamiento" como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones significan mejorar uno o más indicios clínicos de actividad de enfermedad en un paciente que tiene una afección patológica que implica lesión neuronal o una enfermedad neurodegenerativa.

"Tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico. Los que están en necesidad de tratamiento son sujetos mamíferos que sufren cualquier afección patológica que implica lesión neuronal. Por "paciente" o "sujeto en necesidad" se entiende cualquier mamífero para el que se desea la administración de una molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, y cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, o cualquier composición farmacéutica que comprende estos compuestos o derivados de los mismos con el fin de prevenir, superar o retrasar dicha imposición. Cabe señalar que el efecto protector y terapéutico de la molécula de tPA mutado se demuestra claramente en el Ejemplo 1 y las Figuras 1, 2 y 7. Estos ejemplos muestran que el tratamiento con la molécula de tPA mutado atenúa significativamente el daño neurológico que sigue a un traumatismo craneal. Cabe señalar además que este efecto es un efecto a largo plazo que dura aproximadamente más de 20 días. Por otra parte, los resultados presentados por la presente invención demuestran claramente una amplia ventana terapéutica para la molécula mutada de la invención, lo que indica que la administración de la composición de la invención es eficaz incluso cuando se realiza entre 10 minutos a 7 días después de la aparición de la lesión.

Proporcionar un "tratamiento preventivo" o "tratamiento profiláctico" es actuar de una manera protectora, para defender o evitar algo, especialmente una afección o enfermedad.

"Mamífero", para los efectos del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales de investigación, animales domésticos y de granja, animales de zoo, para deportes o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. En una realización particular, dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.

Como se usa en el presente documento, el término "trastorno" se refiere a una afección en la que hay una perturbación del funcionamiento normal. Una "enfermedad" es cualquier condición anormal del cuerpo o de la mente

que causa malestar, disfunción, o sufrimiento a la persona afectada o a aquellos en contacto con la persona. A veces el término se utiliza ampliamente para incluir lesiones, discapacidades, síndromes, síntomas, conductas desviadas, y variaciones atípicas de la estructura y la función, mientras que en otros contextos estas pueden considerarse categorías distinguibles. Cabe señalar que los términos "enfermedad", "trastorno", "afección" y "dolencia" se utilizan igualmente en el presente documento.

Como se ha indicado anteriormente, en general, la dosis de la molécula de tPA mutado desprovista de actividad de serínproteasa y cualquier fragmento o péptido funcional de la misma necesaria para lograr un efecto terapéutico dependerá no solo de factores tales como la edad, el peso y el sexo del paciente y el modo de administración, sino también del grado de progresión de la enfermedad y la potencia del derivado particular que se está utilizando para el trastorno o enfermedad particular de que se trate.

De acuerdo con una realización preferida, la afección patológica que implica lesión o daño neurológico puede ser una cualquiera de lesión cerebral aguda o traumática, ictus, anoxia cerebral, daño cerebral prenatal, ictus hemorrágico e isquémico global y focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, intervención de neurocirugía, daño de las células nerviosas inducido por hipoxia (tal como en la parada cardíaca o el sufrimiento neonatal), epilepsia, ansiedad, y un trastorno neurodegenerativo.

La lesión cerebral aguda o traumática puede ser una cualquiera de las lesiones cerebrales que se producen en accidentes de vehículos de motor, tras caídas, causada por una asalto o en los deportes, dicha lesión incluye hematomas, lagrimeo e hinchazón del tejido cerebral, hemorragia intracraneal (tal como hemorragia subdural, epidural, subaracnoidea, intraparenquimatosa e intraventricular), y el corte de los axones.

De acuerdo con otra realización, el procedimiento de la invención puede ser aplicable a sujetos que sufren trastornos neurodegenerativos tales como, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), enfermedad de Huntington, taupatías como enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, degeneración cortico-basal y parálisis supranuclear progresiva, y encefalopatías espongiiformes, tales como tembladera, enfermedad de las vacas locas y encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Insomnio familiar mortal, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker y Kuru.

Aunque se prefiere la administración intraperitoneal (i.p.), se debe apreciar que cualquier otra vía de administración puede ser aplicable, por ejemplo, administración intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.), oral, intranasal, parenteral, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica, rectal o subcutánea, o cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con una realización preferida, la molécula de tPA mutado utilizada mediante el procedimiento de la invención es la molécula mutada tal como se describe en la invención.

De acuerdo con otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, y cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, administrada mediante el procedimiento de la invención puede variar de aproximadamente 1 µg / kg a aproximadamente 100 mg / kg de peso corporal, más específicamente, aproximadamente 10 µg / kg, 20 µg / kg, 30 µg / kg, 40 µg / kg, 50 µg / kg, 60 µg / kg, 70 µg / kg, 80 µg / kg, 90 µg / kg, 100 µg / kg, 200 µg / kg, 300 µg / kg, 400 µg / kg, 500 µg / kg, 600 µg / kg, 700 µg / kg, 800 µg / kg, 900 µg / kg, 1000 µg / kg, 2 mg / kg, 3 mg / kg, 4 mg / kg, 5 mg / kg, 6 mg / kg, 7 mg / kg, 8 mg / kg, 9 mg / kg y 10 mg / kg. Una realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 1 mg / kg. Otra forma de realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal. Esta cantidad efectiva está comprendida preferiblemente dentro de un forma de dosificación unitaria.

De acuerdo con una realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado usada mediante el procedimiento de la invención lleva al menos una mutación puntual localizada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con otra realización, la molécula mutada lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala. Un ejemplo específico de dicho mutante lo proporciona un mutante que tiene la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N° 1.

Como se muestra en los Ejemplos, la molécula de tPA mutado de la invención aumenta la permeabilidad de la BHE y de este modo facilita el aclaramiento de aminoácidos neurotóxicos. Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, la molécula de tPA mutado o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma es capaz de aumentar la permeabilidad de la BHE. Más específicamente, el procedimiento de la invención puede utilizarse para aumentar la permeabilidad o reducir de la integridad de la BHE, y extender la duración de la permeabilidad de la BHE durante aproximadamente 10 minutos a siete días después de la lesión cerebral, lo que facilita el aclaramiento de agentes neurotóxicos del tejido cerebral dañado.

Por lo tanto, la invención proporciona además un procedimiento para aumentar el aclaramiento de agentes neurotóxicos del cerebro de sujetos que sufren daños posteriores a una LCC, dicho procedimiento comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una molécula de tPA mutado desprovista de actividad catalítica serínproteasa, cualquier fragmentos o péptido funcional de la misma o cualquier composición que comprenda los mismos o cualquier combinación de los mismos, con un agente terapéutico adicional tal como un compuesto secuestrante de glutamato. Cabe señalar que la molécula de tPA mutado es capaz de aumentar la permeabilidad de la BHE, y por lo tanto inhibir, mejorar o prevenir la acumulación de agentes neurotóxicos.

De acuerdo con una realización, el procedimiento de la invención reduce eficazmente la NSS (puntuación de gravedad neurológica) en un sujeto en necesidad de la misma. Más específicamente, el procedimiento de la invención puede conducir a la reducción de aproximadamente 10 a 95 %, específicamente de aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % e incluso 99 % de la NSS en un sujeto en necesidad de la misma, en comparación con los sujetos no tratados..

De acuerdo con una realización, la composición usada mediante el procedimiento de la invención puede comprender un agente terapéutico adicional. Como se muestra en la Figura 7, la molécula de tPA mutado de la invención exhibe un efecto beneficioso sinérgico sobre la NSS de sujetos con LCC, cuando se combinan con compuestos secuestrantes de glutamato. Por lo tanto, en una realización específica, la composición usada mediante el procedimiento de la invención puede comprender como agente terapéutico adicional, un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT) y glutamato-oxaloacetato transaminasa(GOT), insulina, glucagón o cualquier composición o combinación de las mismas. El secuestrante de glutamato es un grupo de compuestos que aumentan el flujo de salida del glutamato que se acumula en el cerebro después una LCC a la sangre. La glutamato piruvato transaminasa (GPT) y la glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) en plasma transforman el glutamato en 2-cetoglutarato en presencia de sus cosustratos respectivos, piruvato y oxaloacetato. De acuerdo con una realización específica, el secuestrante de glutamato utilizado como un agente terapéutico adicional mediante el procedimiento de la invención puede ser al menos uno de glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) y cualquier combinación de los mismos.

En otra realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado o fragmentos o péptidos funcionales de la misma usados mediante el procedimiento de la invención son capaces de inhibir la activación por el tPA de NMDA-R.

Por consiguiente, la invención proporciona además un procedimiento para inhibir la activación mediante tPA del NMDA-R en un sujeto que sufre un trastorno mediado por el NMDA-R, dicho procedimiento comprende la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de tPA mutado desprovista de actividad catalítica serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcionales de la misma o de cualquier composición de los mismos, en el que dicha molécula de tPA mutado es capaz de inhibir la activación mediante tPA del NMDA-R y, por lo tanto, inhibe, mejora o previene trastornos mediados por el NMDA-R.

De acuerdo con una realización específica, la molécula de tPA mutado usada mediante el procedimiento de la invención lleva al menos una mutación puntual localizada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con otra realización, la molécula mutada lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala. Un ejemplo específico de dicho mutante lo proporciona un mutante que tiene la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N° 1.

De acuerdo con otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula de tPA mutado y cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, administrada mediante el procedimiento de la invención puede variar de aproximadamente 1µg / kg a aproximadamente 100 mg / kg de peso corporal, más específicamente, aproximadamente 10 µg / kg, 20 µg / kg, 30 µg / kg, 40 µg / kg, 50 µg / kg, 60 µg / kg, 70 µg / kg, 80 µg / kg, 90 µg / kg, 100 µg / kg, 200 µg / kg, 300 µg / kg, 400 µg / kg, 500 µg / kg, 600 µg / kg, 700 µg / kg, 800 µg / kg, 900 µg / kg, 1000 µg / kg, 2 mg / kg , 3 mg / kg, 4 mg / kg, 5 mg / kg, 6 mg / kg, 7 mg / kg, 8 mg / kg, 9 mg / kg y 10 mg / kg. Una realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 1 mg / kg. Otra forma de realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal. Esta cantidad efectiva está comprendida preferiblemente dentro de un forma de dosificación unitaria.

Cabe destacar que la cantidad, o dosificación, terapéutica eficaz depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de enfermedad que se va a tratar y el curso de tratamiento que dura de varios días a varios meses o hasta que se efectúa una cura y se consigue una disminución del estado de la enfermedad. Pautas de dosificación óptimas se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos normales pueden determinar fácilmente las dosificaciones, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición óptimas. En general, la dosis se calcula según el peso corporal y puede administrarse una o más veces al día, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para dosis basadas en los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones de la composición de la invención en fluidos o tejidos corporales. Tras un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad, en el que la composición de la invención se administra en dosis de mantenimiento, una vez o más al día.

También debe apreciarse que la prevención o reducción del riesgo de desarrollar un trastorno neurodegenerativo también se incluye dentro del alcance de la invención. Dicho procedimiento puede comprender la administración de una cantidad profilácticamente eficaz de la composición de la invención o de los ingredientes activos comprendidos dentro de dicha composición, a una persona en riesgo de desarrollar una enfermedad.

Con el término "cantidad profilácticamente eficaz" se pretende decir la cantidad de una composición farmacéutica combinada que provocará o reducirá el riesgo de aparición de un acontecimiento biológico o médico en un tejido, un sistema, un animal o un ser humano buscada por un investigador, veterinario, médico u otro clínico.

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad serina proteasa total o parcial, o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, mejora o profilaxis de una afección patológica que implica lesión neurológica.

- 5 La invención proporciona además una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad serínproteasa total o parcial o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, para tratar una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica.

De acuerdo con una realización, la molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, se utiliza para tratar y prevenir una afección patológica que implica lesión o daño neurológico. Dicha afección patológica puede ser una cualquiera de lesión cerebral aguda o traumática, ictus, anoxia cerebral, daño cerebral prenatal, ictus hemorrágico e isquémico global y focal, traumatismo craneal, lesión de la médula espinal, intervención de neurocirugía, daño de las células nerviosas inducido por hipoxia (tal como en la parada cardíaca o el sufrimiento neonatal), epilepsia, ansiedad, y un trastorno neurodegenerativo.

10 En otra realización, el uso de una molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma de acuerdo con la invención puede ser adecuado para un sujeto que sufre un trastorno neurodegenerativo tal como, por ejemplo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), enfermedad de Huntington, taupatías como enfermedad de Pick, demencia frontotemporal, degeneración cortico-basal y parálisis supranuclear progresiva, y encefalopatías espongiiformes, tales como tembladera, enfermedad de las vacas locas y encefalopatía espongiiforme bovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, Insomnio familiar mortal, síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker y Kuru.

15 En otra realización más, la molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, usada mediante la invención deberá estar en una cantidad terapéuticamente eficaz que, preferentemente, es una forma de dosificación unitaria que comprende de aproximadamente 1 µg / kg a aproximadamente 100 mg / kg de peso corporal, más específicamente, aproximadamente 10 µg / kg, 20 µg / kg, 30 µg / kg, 40 µg / kg, 50 µg / kg, 60 µg / kg, 70 µg / kg, 80 µg / kg, 90 µg / kg, 100 µg / kg, 200 µg / kg, 300 µg / kg, 400 µg / kg, 500 µg / kg, 600 µg / kg, 700 µg / kg, 800 µg / kg, 900 µg / kg, 1000 µg / kg, 2 mg / kg, 3 mg / kg, 4 mg / kg, 5 mg / kg, 6 mg / kg, 7 mg / kg, 8 mg / kg, 9 mg / kg y 10 mg / kg. Una realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 1 mg / kg. Otra forma de realización específica es una cantidad eficaz de aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal.

20 De acuerdo con una realización preferida, la molécula de tPA mutado usada por la invención lleva al menos una mutación puntual localizada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 y cualquier combinación de los mismos. De acuerdo con otra realización, la molécula mutada lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala. Un ejemplo específico de dicho mutante lo proporciona un mutante que tiene la secuencia de aminoácidos indicada por la SEC ID N° 1.

25 De acuerdo con una realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado usada es tal como se describe en la invención.

En otra realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado o fragmentos o péptidos funcionales de la misma usados mediante el procedimiento de la invención son capaces de aumentar la permeabilidad de la BHE.

30 Por tanto, la invención proporciona además el uso de una molécula de tPA mutado desprovista de actividad catalítica serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, en la preparación de una composición para aumentar el aclaramiento de agentes neurotóxicos, en el que dicha molécula de tPA mutado es capaz de aumentar la permeabilidad de la BHE y, por lo tanto, inhibir, mejorar o prevenir la acumulación de agentes neurotóxicos.

35 En otra realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado o fragmentos o péptidos funcionales de la misma usados por la invención son capaces de inhibir la activación por el tPA de NMDA-R.

40 Por tanto, la invención proporciona además el uso de una molécula de tPA mutado desprovista de actividad catalítica serínproteasa o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, en la preparación de una composición para inhibir la activación por el tPA del NMDA-R, en el que dicha molécula de tPA mutado es capaz de inhibir la activación por el tPA del NMDA-R y, por lo tanto, inhibir, mejorar o prevenir los trastornos mediados por el NMDA-R.

45 De acuerdo con una realización específica de este aspecto, la molécula de tPA mutado usada es tal como se describe en la invención.

50 La invención proporciona además una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad serínproteasa total o parcial o cualquier fragmento o péptido funcional de la misma, para tratar una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica.

55 En el presente documento se divulga una nueva formulación terapéuticamente eficaz que implica una combinación



de al menos una molécula de tPA mutado y al menos un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), insulina, glucagón y cualquier combinación de los mismos, específicamente al menos una de GPT y GOT.

5 Como se muestra en la Figura 7, una combinación de la molécula de tPA mutado de la invención con compuestos  
secuestrantes de glutamato conducen a un aumento significativo en la permeabilidad de la BHE y, de ese modo, a  
un efecto beneficioso sinérgico sobre la NSS de un sujeto que sufre de una LCC. Por tanto, la presente invención se  
refiere particularmente a combinaciones seguras, no interferentes, aditivas y sinérgicas de tPA mutante y moléculas  
10 secuestrantes de glutamato, o de sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, con lo que esas  
combinaciones aditivas y sinérgicas son útiles en el tratamiento de sujetos que sufren un trastorno patológico, tal  
como ictus y cualquier lesión neurológica. Las composiciones que no interfieren, sinérgicas y aditivas de la invención  
también se pueden usar para el tratamiento de sujetos que presentan síntomas o signos de tales trastornos.

Por combinación sinérgica se entiende que el efecto de ambas moléculas de tPA mutado de la invención y los  
fármacos secuestrantes de glutamato es mayor que la suma de los efectos terapéuticos de la administración de  
cualquiera de estos compuestos por separado, como tratamiento único.

15 La combinación del agente secuestrante de glutamato y la molécula de tPA mutado de la invención se puede  
preparar en una proporción cuantitativa de entre 1:0,1 a 1:1000. Se debe apreciar que se puede usar cualquier  
relación cuantitativa, por ejemplo, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:100, 1:150,  
1:200, 1:250, 1:300, 1:350, 1:400, 1:450, 1:500 y cualquier posible combinación de los mismos.

20 De acuerdo con una realización, la composición combinada de la invención está destinada a elevar la permeabilidad  
de la BHE o la reducción de la integridad de la BHE, en un sujeto en necesidad de la misma. La permeabilidad de la  
BHE puede aumentar en al menos un 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al  
menos 30 %, 35 %, al menos 40 %, 45 %, al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o  
incluso al menos 95 % o 99 % en comparación con el nivel de antes del tratamiento.

25 Por tanto, la invención proporciona además una forma de dosificación farmacéutica unitaria que comprende al  
menos una molécula de tPA mutado desprovista de actividad de serínproteasa o cualquier fragmento o péptido  
funcional de la misma o cualquier combinación o mezcla de los mismos, o un derivado farmacéuticamente aceptable  
de la misma, y opcionalmente al menos de un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en  
glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), insulina, glucagón, y cualquier  
combinación de los mismos, específicamente al menos una de GPT y GOT, o cualquier combinación de los mismos.

30 Los compuestos combinados de la presente invención se administran generalmente en forma de una composición  
farmacéutica que comprende todos los compuestos combinados de la presente invención junto con un vehículo o  
diluyente farmacéuticamente aceptable. Por tanto, los compuestos usados en la presente invención se pueden  
administrar de forma individual en un kit o juntos en cualquier forma de dosificación parenteral, oral o transdérmica  
convencional.

35 Más particularmente, ya que la presente invención se refiere a composiciones con una combinación de ingredientes  
activos que pueden administrarse por separado, la invención se refiere también, como aspecto adicional, a la  
combinación de composiciones farmacéuticas separadas en forma de kit. El kit incluye dos composiciones  
farmacéuticas separadas: al menos un molécula de tPA mutado, cualquier fragmento de la misma o cualquier  
combinación o mezcla de la misma, opcionalmente, en una primera forma de dosificación unitaria, y al menos un  
40 agente secuestrante de glutamato, cualquier combinación de los mismos o una sal farmacéuticamente aceptable de  
los mismos, opcionalmente, en una segunda forma de dosificación unitaria. El kit incluye medios recipientes para  
contener tanto las composiciones separadas; tal como una botella dividida o un paquete de aluminio dividido, sin  
embargo, las composiciones separadas también pueden estar contenidas dentro de un único recipiente no dividido  
De forma típica, el kit incluye instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma de kit es  
45 particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferentemente en formas de  
dosificación diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), se administran a diferentes intervalos de dosificación, o  
cuando el médico que prescribe desea la valoración de los componentes individuales de la combinación.

50 De acuerdo con una realización, el kit de la invención está destinado a lograr un efecto terapéutico en un sujeto que  
padece una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica, por ejemplo,  
ictus, lesión cerebral aguda o traumática y un trastorno neurodegenerativo.

Con lograr un efecto terapéutico se quiere decir, por ejemplo, ralentizar la progresión de la afección de la lesión  
neurológica. De acuerdo con una realización, dicho efecto terapéutico puede estar reflejado por la reducción de la  
NSS en el sujeto tratado.

55 Se debe apreciar que ambos componentes del kit, la molécula de tPA mutado de la invención en la primera forma de  
dosificación y los diferentes compuestos secuestrantes de glutamato en la segunda forma de dosificación se pueden  
administrar simultáneamente.

Como alternativa, dicho primer compuesto o forma de dosificación y dicho segundo compuesto o forma de

dosificación se administran secuencialmente en cualquier orden.

La invención proporciona además un procedimiento para prevenir o reducir el riesgo de enfermedad con lesión neuronal que comprende la administración de una cantidad profilácticamente eficaz de una primera y una segunda formas de dosificación unitarias comprendidas en el kit de la invención, a una persona en riesgo de desarrollar enfermedad o afección isquémica.

Divulgado y descrito, se ha de entender que la presente invención no se limita a los ejemplos particulares, etapas de procedimientos y composiciones divulgados en el presente documento, ya que tales etapas de procedimientos y composiciones pueden variar algo. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento se usa para el fin de describir únicamente formas de realización concretas y no se pretende que limite el ámbito de la presente invención, que solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

También cabe indicar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "uno", "una" y "el/la" comprenden las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y los ejemplos y reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entiende que la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo aspectos de la presente invención.

## Ejemplos

### Procedimientos experimentales

#### *Animales*

Ratones C57 de ocho a doce semanas de edad obtenidos de Harlan, Israel.

Se administró a los ratones comida estándar de laboratorio y agua *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de temperatura y luz controladas. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Comité Institucional Universidad para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad Hebrea, y con la aprobación del comité.

#### *Construcción del mutante de tPA:*

El fragmento de ADNc que codifica la secuencia de tPA humano maduro se amplificó mediante PCR con los cebadores de las SEC ID N° 4 y 5, diseñados para introducir los sitios de restricción flanqueantes en 5' Bgl II y flanqueantes en 3' Xho I, respectivamente. El fragmento amplificado se digirió con las enzimas de restricción Bgl II y Xho I, y se clonó en los correspondientes sitios del plásmido pMT / Bip / V5-HisA (Invitrogen).

La mutación S481A en la secuencia del tPA se obtuvo mediante PCR con el par de cebadores anti-paralelos de las SEC ID N° 6 y 7, usando el kit de mutagénesis QuickChange (Stratagen). Ambas secuencias para las construcciones de tipo salvaje y mutantes se secuenciaron completamente para confirmar la ausencia de errores introducidos en la PCR. Tanto las secuencias de proteína salvaje recombinante y S481A mutante contienen 2 aminoácidos adicionales, RS-, en el extremo N-terminal como resultado de la introducción del sitio de clonación Bgl II en la secuencia de ADNc original que codifica el tPA humano.

#### *Expresión y purificación del mutante de tPA*

El tPA humano recombinante y su homólogo inactivo catalíticamente S481A tPA se expresaron en el sistema de expresión en *Drosophila* S2 (Invitrogen). Las proteínas se purificaron por afinidad utilizando el Mab contra el tPA PAM-1 de American Diagnostica (Producto n° 371, actualmente descatalogado) acoplado a Sepharose activada con CNBr 4 Fast Flow (Amersham Biosciences). Las proteínas se eluyeron con tampón de glicina 0,1 M-HCl, a pH 2,8 que contienen Arg 0,2 M. El eluato se recogió en PBS / Arg 0,2 M que contiene 80 microlitros de Tris-HCl 1 M, a pH 8,0 por cada ml del eluato.

El cambio de concentración de proteínas/tampón para PBS / Arg 0,2 M se realizó en el dispositivo de filtración Amicon 30K. 3 - 5 microgramos de las proteínas purificadas aparecen en el SDS-PAGE como una única banda del tamaño previsto sin contaminantes. Las proteínas se almacenaron a -70 °C o se liofilizaron.

#### *Modelo experimental de LCC:*

Se indujo un traumatismo cerebral mediante el uso de un dispositivo de caída de peso modificado, como se ha descrito anteriormente [Chen, Y., Constantini, S., Trembovier, V., Weinstock, M. y Shohami, E. (1996) *J. Neurotrauma* 13, 557 - 568].

Brevemente, después de la inducción de anestesia con éter, se realizó una incisión longitudinal en la línea media, la piel se retrajo y se expuso el cráneo. Se identificó la zona frontal anterior izquierda y se colocó un cono con punta de teflón (2 mm de diámetro) 1 mm lateral a la línea media, en el plano mediocoronal. La cabeza se mantuvo en su lugar de forma manual y se dejó caer un peso de 75 g en el cono desde una altura de 18 cm, lo que tuvo como resultado una lesión focal en el hemisferio izquierdo. Después del traumatismo, los ratones recibieron oxigenación de soporte con 95 % de O<sub>2</sub> durante no más de 2 minutos y después se les devolvió a sus jaulas. En controles simulados solo se realizó la anestesia y la incisión de la piel.

#### *Evaluación neuroconductual*

La puntuación de la gravedad neurológica (NSS) es una escala de 10 puntos que evalúa el estado neurológico funcional de los ratones en base a la presencia de varios reflejos y la capacidad de realizar tareas motoras y conductuales tales como caminar en el balancín, equilibrio en balancín y locomoción espontánea [Beni-Adani, L. J. Pharmacol. Exp. Ther. 296:57 - 63 (2001)]. Se otorgó a los animales un punto por incapacidad para realizar un elemento, por lo que las puntuaciones pueden variar desde cero (animales no dañados sanos) a un máximo de 10, lo que indica una disfunción neurológica grave, con incapacidad para realizar todas las tareas. La NSS obtenida 1 hora después de un traumatismo refleja la gravedad inicial de la lesión y se correlaciona inversamente con el resultado neurológico. Se evaluó a los animales 5 horas después de la LCC y cada dos o tres días hasta 20 días después. Cada animal fue evaluado por un observador que desconocía el tratamiento.

#### *Evaluación de la concentración de lactato y glutamato en el cerebro*

Se tomaron muestras de LCR de la cisterna magna en ratones anestesiados, utilizando un microcapilar como han descrito otros. Las muestras se congelaron inmediatamente a - 70 °C hasta el análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El glutamato y lactato se derivaron usando orto-ftaldialdehído / b-mercaptoetanol, y las muestras se inyectaron en la columna. Los picos se detectaron usando un detector de fluorescencia.

#### *Análisis estadístico:*

Las diferencias se analizaron utilizando la prueba t y el nivel de significación se corrigió mediante un análisis post-hoc con la prueba de Bonferroni. La significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

#### **Ejemplo 1**

***Atenuación del deterioro neurológico después de una LCC por un mutante de tPA.*** Se ha informado que el tPA señala dentro del sistema nervioso central mediante la activación del NMDA-R, un receptor de la glutamina, implicado en la neurotoxicidad y la muerte celular neuronal excitotóxica, a través de la escisión de la subunidad NR-1 subunidad del NMDA-R. Por tanto, los inventores examinaron el efecto de la inhibición de la activación por tPA del NMDA-R sobre el traumatismo cerebral agudo, usando una molécula de tPA mutado desprovista de actividad catalítica serínproteasa. Por lo tanto, se ha sintetizado un mutante de tPA que porta una sola sustitución de Ser 481 a Ala. Este mutante carece de cualquier actividad catalítica PA (datos no mostrados), pero todavía es capaz de imitar algunas de las actividades catalíticas adicionales del tPA, por ejemplo, la abertura de la barrera hematoencefálica. Se ha usado la lesión cerebral cerrada (LCC) experimental para examinar el efecto del mutante de tPA mutante sobre la respuesta posterior a la LCT, por lo tanto, se inyectó a grupos de 8-9 animales tPA mutante, tPA SV (100 µg/ / ratón) en solución salina o solución salina sola por vía intraperitoneal (i.p.) dos horas después del traumatismo cerebral. El efecto de la administración de composiciones de mutantes de tPA se evaluó mediante la evaluación neuroconductual según la determinación de una puntuación de la gravedad neurológica (NSS).

Como se muestra en la Figura 1, la administración del mutante de tPA mejoró el estado neurológico de los ratones con LCC. La NSS de los animales tratados con el mutante de tPA fue significativamente menor que la de los animales de control (0,43 en ratones tratados con el mutante de tPA en comparación con 3,25 en los ratones control tratados con solución salina), lo que indica un efecto neuroprotector inducido por el mutante de tPA.

En contraste con este efecto neuroprotector, la inyección de tPA SV ejerció un efecto perjudicial sobre los ratones con LCC, como se muestra en la Figura 2. La NSS de los ratones en este grupo el día 20 tras la LCC fue significativamente mayor que la de los ratones control tratados con solución salina o con el mutante de tPA. En este experimento, la inyección de tPA-S481A (MTPA) dos horas después de la LCC mejoró significativamente el desenlace neurológico inicial (no mostrado) y a largo plazo (Fig. 2).

Después de la última evaluación NSS (el día 20 tras la LCC), se extrajeron los cerebros y se seccionaron coronalmente en segmentos de 1 mm. Las secciones se fotografiaron y el área de cada sección se determinó utilizando el programa de análisis de imagen por ordenador NHI. Cualquier área ausente se estimó mediante la superposición de la sección afectada con imágenes del lado contralateral del mismo animal. El volumen de la porción del cerebro que falta se definió como la suma de las áreas que faltan en todas las secciones multiplicada por su espesor expresado en píxeles cúbicos. El tamaño de la lesión fue significativamente ( $p < 0,005$ ) menor en los animales que habían recibido tPA-S<sup>481</sup>A en comparación con los animales control ( $41525 \pm 10987$  frente a  $64309 \pm 21345$  píxeles), mientras que el tPA SV aumentó el tamaño de la lesión significativamente ( $p < 0,005$ ) en comparación con los controles ( $167289 \pm 31456$  píxeles). Tomados en conjunto, los datos recogidos indican que el

tPA-S481A tiene un efecto neuroprotector.

Sin quedar ligado a teoría alguna, estos resultados pueden indicar que el tPA mutante que carece de la actividad catalítica, pero todavía capaz de imitar algunas de las actividades catalíticas adicionales de tPA, compite con el tPA endógeno inducida por LCC. Este efecto competitivo ayuda a mejorar la neurotoxicidad inducida por tPA.

## 5 Ejemplo 2

### **Permeabilización de la barrera hematoencefálica (BHE) por un mutante de tPA**

La pérdida de integridad de la BHE después de una LCC o un ictus en general se supone que tiene un efecto perjudicial sobre la función cerebral. Esto se debe a la acumulación de glutamato que conduce a lesiones cerebrales secundarias. La integridad de la BHE está comprometida aún más por las concentraciones terapéuticas de tPA. El efecto del tPA sobre la BHE está mediado a través la proteína relacionada con el receptor de LDL, LRP, y requiere su actividad catalítica.

Para determinar el efecto de la inyección de tPA S-<sup>481</sup>A sobre la función de la BHE, se inyectaron a ratones anestesiados 25 µl de solución salina o solución salina que contiene tPA o mutante de tPA (tPA-Ser<sup>481</sup>Ala) (1 mg / kg cada uno), seguido de la inyección intravenosa de 2 % de azul de Evans en solución salina. Se cuantificó el azul de Evans mediante absorbancia a 620 nm. Como se muestra claramente en la Figura 3, una sola inyección i.p. de la molécula de tPA mutado de la invención, tPA S-<sup>481</sup>A, aumentó la permeabilidad de la BHE similar a los resultados con el tPA SV, de tipo salvaje.

El inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) es reconocido como el inhibidor de tPA. Los inventores han desarrollado dos péptidos derivados de PAI-1; el primero como se indica en la SEC ID N° 3 tiene 6 aminoácidos (aa) de longitud, y el segundo, como se indica en la SEC ID N° 8 es un péptido de 18 aminoácidos. Los inventores utilizaron estos dos péptidos derivados de PAI-1 para evaluar adicionalmente si son capaces de inhibir la abertura de la BHE mediada por tPA. Para este propósito, se inyectó a grupos de 8-9 ratones anestesiados fueron i.p. 25 µl de solución salina o solución salina que contenía tPA SV o tPA-Ser<sup>481</sup>Ala (1 mg / kg de cada uno), solo o junto con los péptidos derivados de PAI-1 de 18-aa (SEC ID N° 8) o de 6 aa (SEC ID N1 3) (1 mg / kg cada uno). Los ratones recibieron una inyección i.v. de 2 % de azul de Evans (EB) en solución salina 10 minutos después de la inyección i.p. de los tPA con o sin los péptidos. Una hora después de la inyección del colorante, se retiró la sangre de los órganos mediante perfusión transcardíaca. Se extrajeron los cerebros, se fotografiaron, se pesaron, se homogeneizaron en N,N-dimetilformamida y se centrifugaron. Se cuantificó el colorante extruido mediante absorbancia a 620 nm. Los datos se expresan en la Figura 4A como la absorbancia por gramo de tejido. Los resultados presentados en la Figura 4A son coherentes con los resultados de la Figura 3, lo que demuestra claramente que una sola inyección i.p. de tPA S-<sup>481</sup>A aumenta permeabilidad de la BHE en la misma medida que el tPA SV. Curiosamente, mientras que el EEIIMD (SEC ID N° 3) no logró disminuir la permeabilidad de la BHE inducida por tPA, la inyección del péptido derivado de PAI-1 de 18 aa (SEC ID N° 8) dio lugar a una inhibición casi total de la abertura de la BHE mediada por rtPA.

La Figura 4B muestra una imagen representativa de la distribución del EB inyectado i.v. 10 minutos después de la LCC.

### *Duración prolongada de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) tras la LCC por el mutante de tPA*

Para examinar el efecto de tPA-S481A (mtPA) sobre la permeabilidad de la BHE después de la apertura debido a la LC, el mutante tPA se inyectó i.p. a 8-9 ratones 1, 2 o 3 horas después de la LCC. Los ratones sometidos a LCC solo sirvieron como controles para la indicación de un comportamiento normal de la BHE después de un traumatismo craneal. En ambos grupos, la extravasación del EB se midió una hora después de la inyección del colorante. Los resultados presentados en la Figura 5 muestran que la integridad de la BHE se pierde 10 minutos después de la LCC, y esta integridad se restaura casi completamente al nivel observado antes del traumatismo en un plazo de 3 horas. Por el contrario, la exposición a mtPA en un plazo de 2-3 horas desde la LCC amplió marcadamente la duración del incremento de la permeabilidad de la BHE.

## Ejemplo 3

### **La reducción de glutamato en el cerebro es neuroprotectora**

Después, los inventores postulan la hipótesis de que un mecanismo por el cual el mtPA aumenta la permeabilidad de la BHE al tiempo que proporciona neuroprotección, es mediante la estimulación de la eliminación de aminoácidos neurotóxicos del cerebro. Se ha demostrado previamente que la disminución de los niveles de glutamato en la sangre aumenta el transporte de glutamato radiomarcado se inyecta en el cerebro desde el SNC hacia la circulación periférica. [Zotnik, A. y col., Exp. Neurology 203:213 - 220 (2007)]. Por lo tanto, los inventores examinaron el efecto de la molécula de tPA mutado para facilitar el aclaramiento de agentes neurotóxicos durante lesión en la cabeza, utilizando el modelo experimental de traumatismo craneal cerrado (LCC). Por lo tanto, se inyectó a grupos de 8-9 animales tPA mutante, (100 µg/ratón) en solución salina o solución salina sola por vía intraperitoneal (i.p.) dos horas después del traumatismo cerebral y se ha medido la concentración de lactato y glutamato en el LCR.

Como se muestra en la Figura 6, el mutante inactivo de la invención, tPA-S<sup>481</sup>A, alivia claramente la acumulación de glutamato (Fig.6A) y lactato (Fig.6B) en el daño posterior a LCT, probablemente activando la permeabilización de la BHE en la misma medida que el tPA SV (como se muestra en la Figura 5).

5 La glutamato piruvato transaminasa (GPT) y la glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT) en plasma transforman el glutamato en 2-cetoglutarato en presencia de sus cosustratos respectivos, piruvato y oxaloacetato. En este modelo, la administración i.v. de oxaloacetato (0,005 mmol / 100 g), combinada con GOT recombinante (0,14 nmol / 100 g) disminuyó el glutamato en sangre en un 40 % en ratas y proporcionó una extensa neuroprotección y mejoró la recuperación tras la LCC [Gottlieb, y col., J. Neurochem. 87:119 - 126 (2003)]. Por lo tanto, los inventores analizaron si el efecto neuroprotector del secuestrante de glutamato en la sangre, que estimula la eliminación de glutamato del cerebro después de un traumatismo, mejoraría mediante la abertura de la BHE con mtPA. El secuestrante que comprende oxaloacetato y GOT recombinante se administró i.v. 10 minutos (la BHE es permeables) o 2 horas (la permeabilidad de la BHE se ha restaurado) después de la LCC. El tPA mutado se administró dos horas después de la LCC solo o con el secuestrante, momento en que la integridad de la BHE se ha recuperado. La NSS se evaluó el día 20.

15 Como se muestra claramente en la figura 7, el secuestrante de glutamato proporcionó una neuroprotección significativa cuando se administró 10 minutos después de la LCC, un hallazgo que está en consonancia con los informes anteriores [Gottlieb (2003) *ibid.*]. En contraste, la inyección del secuestrante dos horas después de la inducción de la lesión cerebral no proporcionó ningún efecto protector. El efecto beneficioso del secuestrante de glutamato mostrado en la Figura 7 es paralelo a la pérdida natural y restauración de la integridad de la BHE como se demuestra en la Figura 5. Este resultado es consistente con la idea de que la eficacia del secuestrante depende de la abertura de la BHE requerida para que el glutamato salga del cerebro a la sangre, entre otros mecanismos posibles. Además, la figura 7 muestra claramente una sinergia del efecto beneficioso del secuestrante de glutamato y la molécula de tPA mutado de la invención, lo que tiene como resultado una mejora significativa de las funciones neurológicas. El efecto sinérgico se correlacionó con la capacidad de la molécula mutada de la invención, tPA-S<sup>481</sup>A, para abrir la BHE. En conjunto, los datos presentados en la Figura 7 apoyan el concepto de que la reapertura de la BHE por la molécula de tPA mutado de la invención permite el flujo de salida de glutamato del cerebro a la circulación. Además, los datos indican que la permeabilidad de la BHE es esencial para que el secuestrante sea eficaz.

30 Sin quedar ligado a teoría alguna, estos resultados pueden indicar que el mutante de tPA que carece de la actividad catalítica todavía es capaz de imitar algunas de las actividades catalíticas adicionales de tPA, específicamente la apertura o el aumento de la permeabilidad de la BHE y que es esta abertura que facilita el aclaramiento de agentes neurotóxicos tales como glutamato y lactato desde el cerebro y el LCR estimula aún más el efecto saludable del mutante de tPA sobre el desenlace neurológico.

**Tabla 1:** Listado de secuencias:

SEC ID N°	Descripción de la secuencia
1	tPA-Ser481Ala mutante
2	tPA SV
3	El péptido derivado de PAI-1 de 6 aa
4	Cebador htPA-Bgl II
5	Cebador htPA-Xho I
6	Cebadores antiparalelos para la introducción de la mutación Ser481Ala
7	Cebadores antiparalelos para la introducción de la mutación Ser481Ala
8	El péptido derivado de PAI-1 de 18 aa

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hadasit Medical Research Services & Development Ltd.

40 <120> MUTANTE DE tPA EN EL TRATAMIENTO DE LESIONES CEREBRALES AGUDAS Y TRASTORNOS NEURODEGENERATIVOS

<130> 23536-WO-09

<150> IL 190184

<151> 2008-03-16

<160> 8

5 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 532

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Ser Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr  
 1 5 10 15  
 Gln Met Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg  
 20 25 30  
 Ser Asn Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys  
 35 40 45  
 His Ser Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly  
 50 55 60  
 Gly Thr Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr  
 85 90 95  
 Cys Tyr Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala  
 100 105 110  
 Glu Ser Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln  
 115 120 125  
 Lys Pro Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly  
 130 135 140  
 Asn His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro  
 165 170 175  
 Ala Cys ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly ser Ala

ES 2 546 820 T3

180 185 190  
 Tyr Arg Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro  
 195 200 205  
 Trp Asn Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro  
 210 215 220  
 Ser Ala Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Asp Gly Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu  
 245 250 255  
 Thr Trp Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg  
 260 265 270  
 Gln Tyr Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp  
 275 280 285  
 Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg  
 290 295 300  
 Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His  
 325 330 335  
 His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu  
 340 345 350  
 Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe  
 355 360 365  
 Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser  
 370 375 380  
 Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys  
 385 390 395 400  
 Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu  
 405 410 415  
 Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg  
 420 425 430  
 Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser  
 435 440 445  
 Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly

ES 2 546 820 T3

450                      455                      460

Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln  
465                      470                      475                      480

Gly Asp Ala Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr  
485                      490

Leu Val Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val  
500                      505                      510

Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp  
515                      520                      525

Asn Met Arg Pro  
530

<210> 2  
 <211> 530  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 2

Gly Ala Arg Ser Tyr Gln Val Ile Cys Arg Asp Glu Lys Thr Gln Met  
1                      5                      10                      15

Ile Tyr Gln Gln His Gln Ser Trp Leu Arg Pro Val Leu Arg Ser Asn  
20                      25                      30

Arg Val Glu Tyr Cys Trp Cys Asn Ser Gly Arg Ala Gln Cys His Ser  
35                      40                      45

Val Pro Val Lys Ser Cys Ser Glu Pro Arg Cys Phe Asn Gly Gly Thr  
50                      55                      60

Cys Gln Gln Ala Leu Tyr Phe Ser Asp Phe Val Cys Gln Cys Pro Glu  
65                      70                      75                      80

Gly Phe Ala Gly Lys Cys Cys Glu Ile Asp Thr Arg Ala Thr Cys Tyr  
85                      90                      95

Glu Asp Gln Gly Ile Ser Tyr Arg Gly Thr Trp Ser Thr Ala Glu Ser  
100                      105                      110

Gly Ala Glu Cys Thr Asn Trp Asn Ser Ser Ala Leu Ala Gln Lys Pro  
115                      120                      125

Tyr Ser Gly Arg Arg Pro Asp Ala Ile Arg Leu Gly Leu Gly Asn His  
130                      135                      140

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Asp Ser Lys Pro Trp Cys Tyr Val  
145                      150                      155                      160

10



ES 2 546 820 T3

Phe Lys Ala Gly Lys Tyr Ser Ser Glu Phe Cys Ser Thr Pro Ala Cys  
 165 170 175  
 Ser Glu Gly Asn Ser Asp Cys Tyr Phe Gly Asn Gly Ser Ala Tyr Arg  
 180 185 190  
 Gly Thr His Ser Leu Thr Glu Ser Gly Ala Ser Cys Leu Pro Trp Asn  
 195 200 205  
 Ser Met Ile Leu Ile Gly Lys Val Tyr Thr Ala Gln Asn Pro Ser Ala  
 210 215 220  
 Gln Ala Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly  
 225 230 235 240  
 Asp Ala Lys Pro Trp Cys His Val Leu Lys Asn Arg Arg Leu Thr Trp  
 245 250 255  
 Glu Tyr Cys Asp Val Pro Ser Cys Ser Thr Cys Gly Leu Arg Gln Tyr  
 260 265 270  
 Ser Gln Pro Gln Phe Arg Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala  
 275 280 285  
 Ser His Pro Trp Gln Ala Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro  
 290 295 300  
 Gly Glu Arg Phe Leu Cys Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile  
 305 310 315 320  
 Leu Ser Ala Ala His Cys Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu  
 325 330 335  
 Thr Val Ile Leu Gly Arg Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu  
 340 345 350  
 Gln Lys Phe Glu Val Glu Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp  
 355 360 365  
 Asp Thr Tyr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser  
 370 375 380  
 Ser Arg Cys Ala Gln Glu Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro  
 385 390 395 400  
 Pro Ala Asp Leu Gln Leu Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly  
 405 410 415  
 Tyr Gly Lys His Glu Ala Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys  
 420 425 430

ES 2 546 820 T3

Glu Ala His Val Arg Leu Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His  
 435 440 445

Leu Leu Asn Arg Thr Val Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr  
 450 455 460

Arg Ser Gly Gly Pro Gln Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp  
 465 470 475 480

Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Leu Asn Asp Gly Arg Met Thr Leu Val  
 485 490 495

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly  
 500 505 510

Val Tyr Thr Lys Val Thr Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met  
 515 520 525

Arg Pro  
 530

5 <210> 3  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Glu Ile Ile Met Asp  
 1 5

10 <210> 4  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 4

gcccgattca gatctggagc cgcagctac caagtgatc 39

20 <210> 5  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 5

ttttgaggac tcgagtggtc ctatcacgg tcgcatg 37

30 <210> 6  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 6

gcctgccagg gcgatgccgg aggcccccctg gtg 33

40 <210> 7  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 546 820 T3

caccaggggg cctccggcat cgcctggca ggc 33

<210> 8

5 <211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

10

Arg Met Ala Pro Glu Glu Ile Ile Met Asp Arg Pro Phe Leu Phe Val  
1 5 10 15

Val Arg

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende al menos una molécula de tPA (activador del plasminógeno tisular) mutado desprovista de actividad de serínproteasa que tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE (barrera hematoencefálica), en la que dicha molécula mutada lleva al menos una mutación puntual situada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 de la molécula de tPA de tipo salvaje como se indica en la SEC ID N° 2 o cualquier combinación de los mismos y en la que dicha composición es para su uso en el tratamiento, mejora o profilaxis de una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica, dicha composición es para administración parenteral, en la que dicha administración parenteral es una cualquiera de administración intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) e intradérmica.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha molécula lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala, y tiene la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEC ID N° 1, o un fragmento de la misma sin residuos RS de aminoácidos adicionales en N-terminal, dicho fragmento tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE (barrera hematoencefálica).
- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una molécula de tPA mutado desprovista de actividad serínproteasa, que tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE, dicha composición comprende además un agente terapéutico adicional, en el que dicho agente terapéutico es un secuestrante glutamato y en el que dicha molécula mutada lleva al menos una mutación puntual situada en cualquier posición de los residuos Ser481, His325, Asp374, Asp475 y Ser500 Gly502 de la molécula de tPA de tipo salvaje como se indican en la SEC ID N° 2 o cualquiera de sus combinaciones.
- 20 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha molécula lleva una mutación puntual en Ser481 a Ala, y tiene la secuencia de aminoácidos como se indica en la SEC ID N° 1, o un fragmento de la misma sin residuos RS de aminoácidos adicionales en N-terminal, dicho fragmento tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE.
- 25 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en la que dicha composición es para su uso en el tratamiento, mejora o profilaxis de una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica.
- 30 6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha enfermedad o afección isquémica es ictus y en la que dicha afección patológica que implica lesión neurológica es una cualquiera de lesión cerebral aguda o traumática y un trastorno neurodegenerativo, preferiblemente, dicha afección patológica que implica lesión neurológica es una lesión cerebral aguda o traumática (LCT).
- 35 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para aumentar la permeabilidad de la BHE (barrera hematoencefálica) en un sujeto en necesidad de la misma.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en la que dicho secuestrante de glutamato se selecciona del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), glucagón, insulina o cualquier composición o combinación de los mismos.
- 40 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha composición conduce a la reducción de la NSS (puntuación de la gravedad neurológica) en un sujeto en necesidad de la misma.
- 45 10. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de tPA mutado desprovista de actividad de serínproteasa, que tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE, en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento, mejora o profilaxis de una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica, en el que dicha composición es para administración parenteral, dicha administración parenteral es una cualquiera de administración intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.), intravenosa (i.v.) e intradérmica.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad o afección isquémica ictus y en el que dicha afección patológica que implica lesión neurológica es uno cualquiera de lesión cerebral aguda o traumática y un trastorno neurodegenerativo.
- 50 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho mutante de tPA o cualquier composición o combinación del mismo conduce a al menos una de reducción de la NSS (puntuación de la gravedad neurológica) en un sujeto en necesidad del mismo y el aumento de la permeabilidad de la BHE (barrera hematoencefálica) en un sujeto en necesidad del mismo.
- 55 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha composición comprende un agente terapéutico adicional, un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), glucagón, insulina o cualquier composición o combinación de los mismos.

14. Una forma de dosificación farmacéutica unitaria que comprende al menos una molécula de tPA mutado desprovista de actividad de serínproteasa que tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE, o cualquier combinación o mezcla de los mismos, o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos, y al menos de un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), glucagón, insulina o cualquier combinación de los mismos, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 5
15. Un kit para conseguir un efecto terapéutico en un sujeto en necesidad del mismo que comprende:
- 10
- a. al menos una molécula de tPA mutado desprovisto de actividad de serínproteasa que tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la BHE o cualquier combinación o mezcla de los mismos, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una primera forma de dosificación unitaria;
- 15
- b. al menos un secuestrante de glutamato seleccionado del grupo que consiste en glutamato-piruvato transaminasa (GPT), glutamato-oxaloacetato transaminasa (GOT), glucagón, insulina o cualquier combinación de los mismos y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable en una segunda forma de dosificación unitaria; y
- c. medio de recipiente para contener dichas primera y segunda formas de dosificación; preferentemente, dicho sujeto está sufriendo una afección patológica que implica lesión neurológica o una enfermedad o afección isquémica.

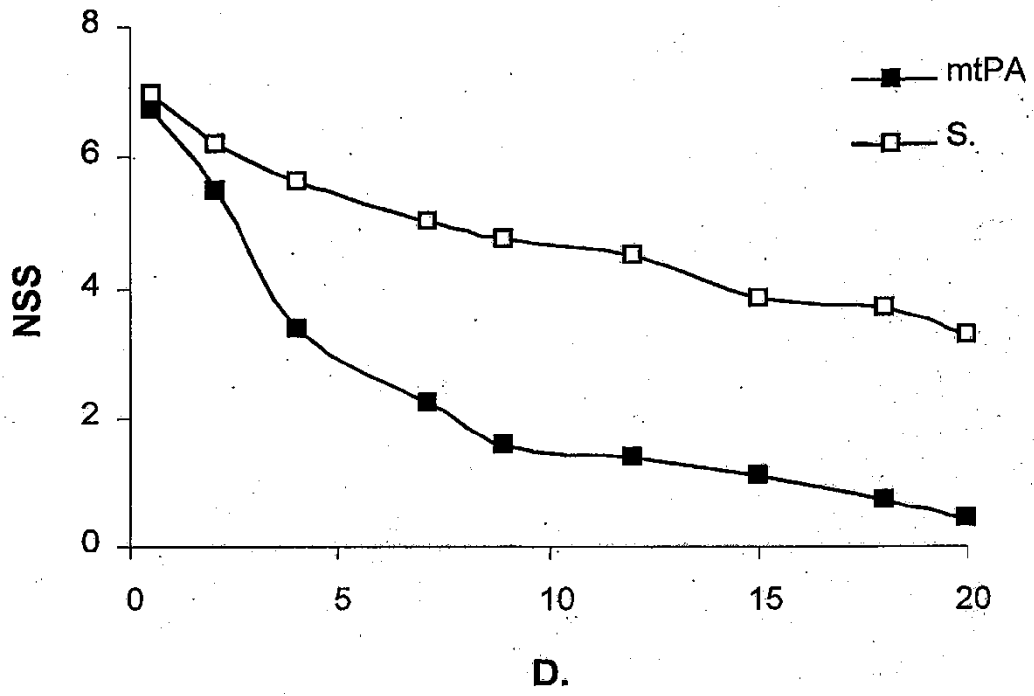


Fig. 1

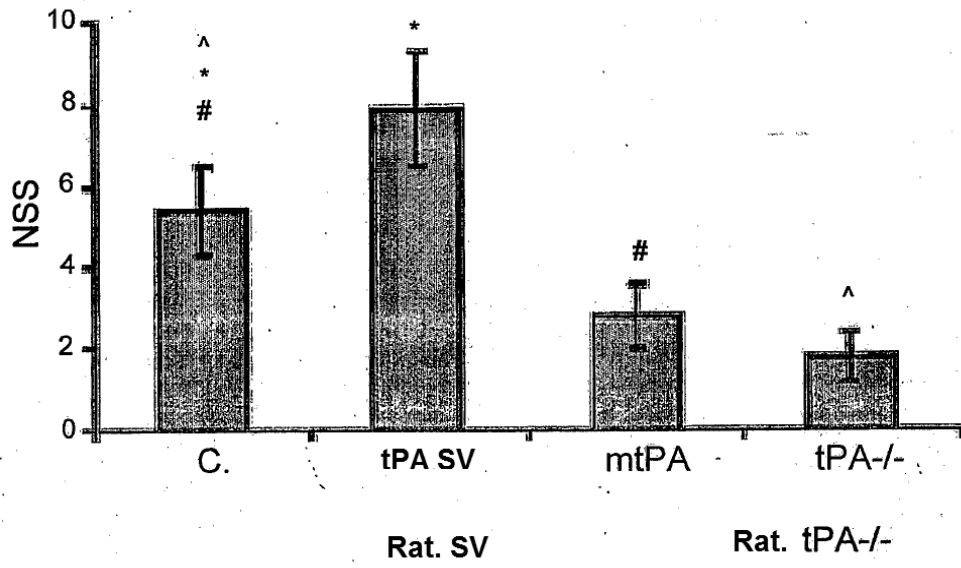


Fig. 2

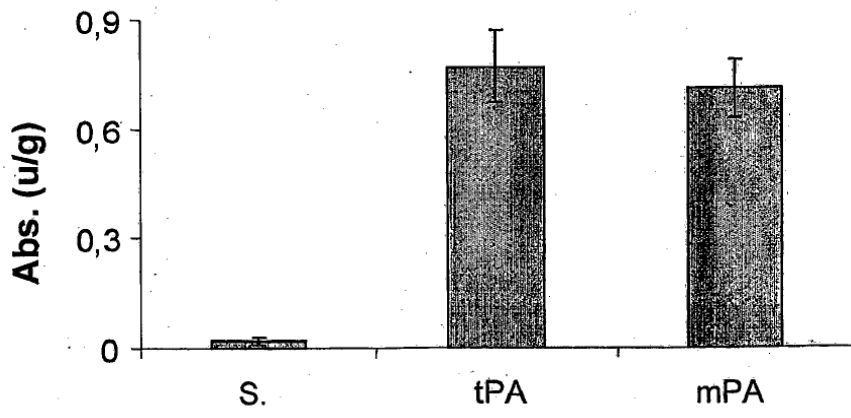


Fig. 3

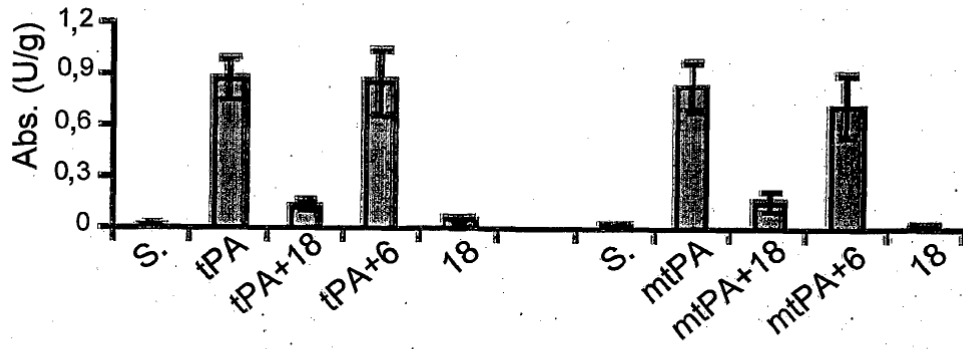
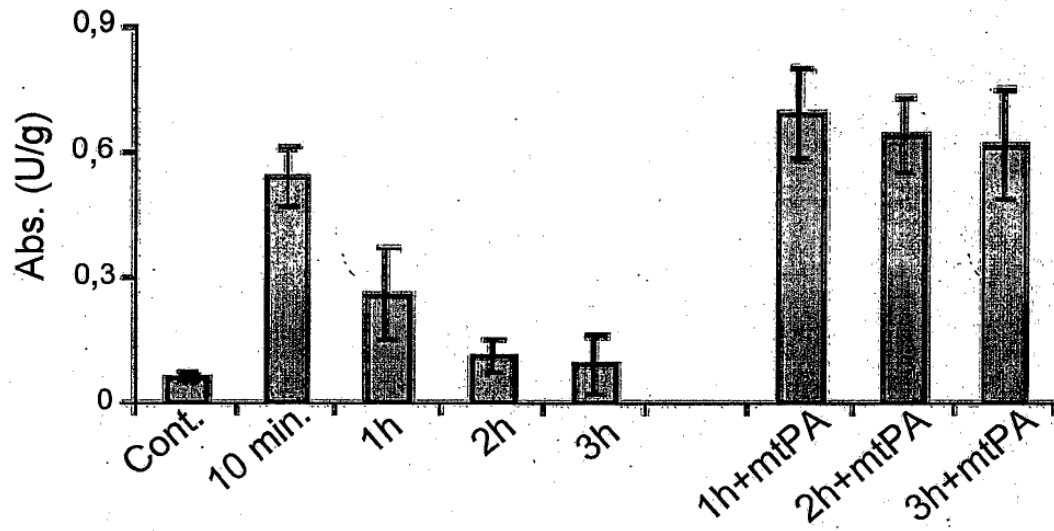


Fig. 4A



Fig. 4B





T.  
Fig. 5

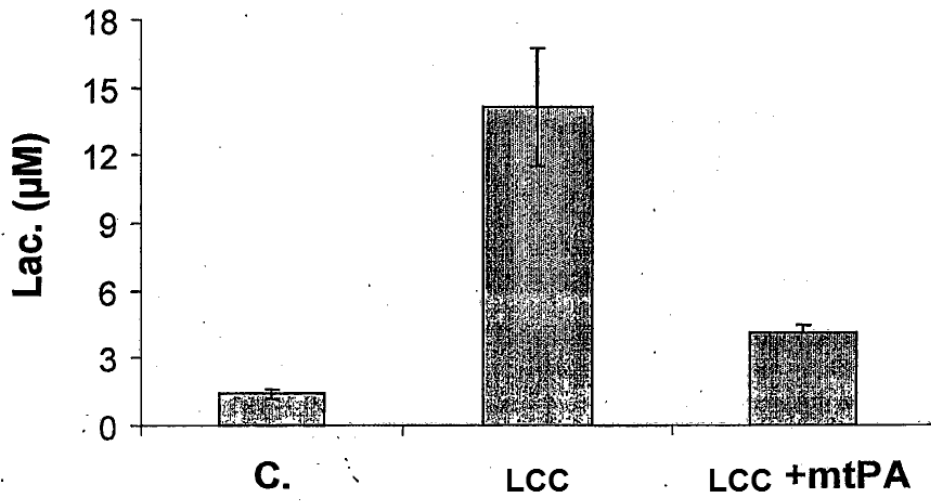


Fig. 6A

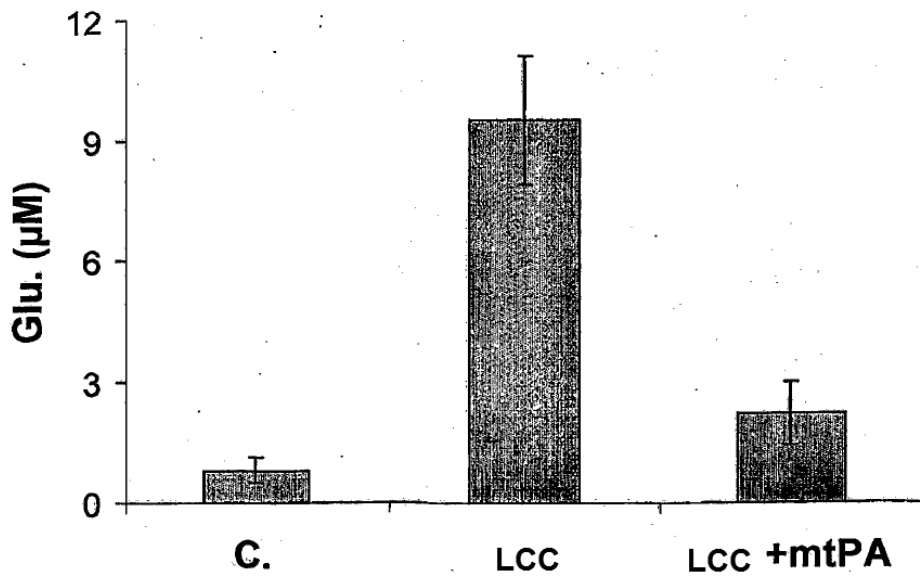
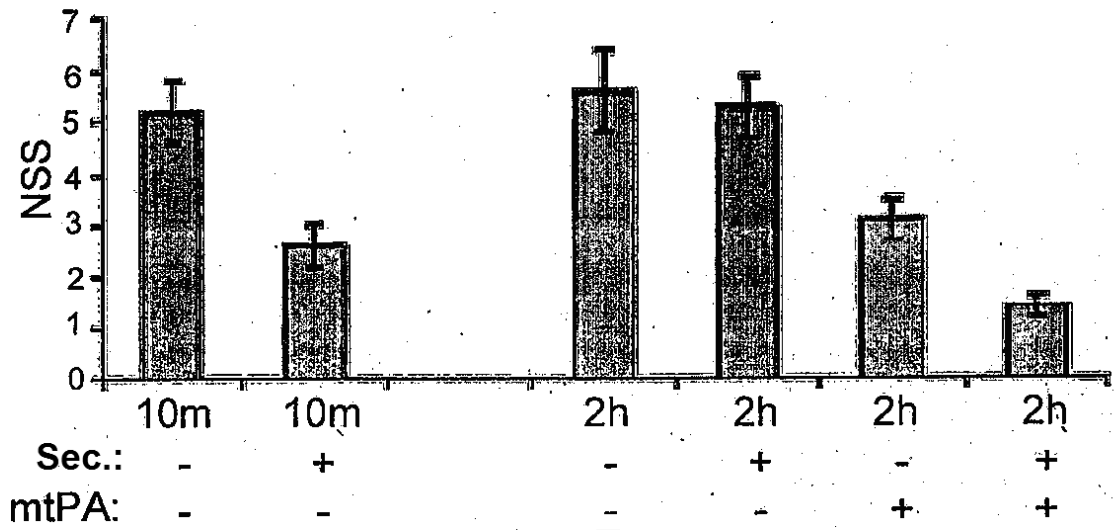


Fig. 6B



T.  
Fig. 7