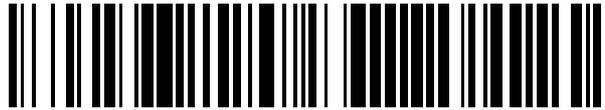


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 697**

51 Int. Cl.:

**A61P 9/00** (2006.01)

**C12Q 1/60** (2006.01)

**A61K 38/49** (2006.01)

**A61K 38/57** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2015 PCT/US2015/058878**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073514**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2015 E 15856204 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3215221**

54 Título: **Métodos y composiciones para trombólisis segura y eficaz**

30 Prioridad:

**03.11.2014 US 201462074374 P**

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

**22.10.2020**

73 Titular/es:

**THROMBOLYTIC SCIENCE, LLC (100.0%)  
763D Concord Avenue  
Cambridge, Massachusetts 02138, US**

72 Inventor/es:

**GUREWICH, VICTOR**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 788 697 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**

Métodos y composiciones para trombólisis segura y eficaz

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a métodos y composiciones para trombólisis segura y eficaz.

Antecedentes

10

La trombosis se produce cuando un coágulo sanguíneo (trombo) se forma dentro un vaso sanguíneo y obstruye el flujo de sangre a través del sistema circulatorio. Cuando se lesiona un vaso sanguíneo, el cuerpo usa las plaquetas y la fibrina para formar un coágulo sanguíneo para sellar los vasos lesionados y evitar la pérdida de sangre. Este proceso se llama hemostasis. Incluso cuando un vaso sanguíneo no se lesiona, pueden formarse coágulos sanguíneos en el

15 cuerpo en determinadas circunstancias. Los coágulos sanguíneos consisten en gran medida en plaquetas agregadas y una malla de fibrina reticulada, que es un polímero natural de fibrinógeno de la sangre. Cuando un trombo es suficientemente grande para reducir el flujo de sangre a un tejido, se puede producir hipoxia o anoxia, dando lugar a daño tisular o incluso muerte tisular. Dependiendo de la ubicación en el sistema arterial, es decir, el corazón, el cerebro o una pierna, un trombo puede activar un ataque cardíaco, apoplejía o gangrena periférica. En la circulación venosa,

20 el mismo proceso puede causar tromboflebitis (trombosis venosa profunda) o una embolia pulmonar. Conjuntamente, estas enfermedades cardiovasculares constituyen las causas principales de muerte y discapacidad en países industrializados.

20

25

La trombólisis implica principalmente el uso de fármacos trombolíticos para disolver el coágulo sanguíneo que causa enfermedad y restaurar el flujo sanguíneo. Los fármacos trombolíticos tales como tPA y sus derivados en uso actual funcionan activando la proenzima plasminógeno en la proteasa plasmina, que degrada la malla de fibrina en el coágulo sanguíneo y hace que el coágulo sea soluble, restaurando de este modo el flujo sanguíneo a través de los vasos sanguíneos ocluidos. Sin embargo, los presentes fármacos trombolíticos también inducen degradación de la fibrina hemostática que sella las heridas, y generan plasmina en el plasma que degrada tres factores de coagulación, el

30 fibrinógeno, el factor V y el factor VII (factor hemofílico). Por tanto, el tratamiento trombolítico actual porta el riesgo de causar hemorragia por los efectos secundarios de tipo hemofilia o por la degradación de fibrina hemostática. Esto impone limitaciones importantes en varios pacientes elegibles para el tratamiento y limita la dosis de trombolítico que puede usarse. Como resultado, aproximadamente un 5 % únicamente de los pacientes con apoplejía reciben tratamiento y la eficacia de este tratamiento es limitada.

35

40

Una apoplejía puede estar causada por un coágulo sanguíneo o por un vaso hemorrágico en el cerebro. Sin embargo, el diagnóstico apropiado de la causa específica de una apoplejía requiere una exploración CT o imágenes de RM, que pueden retardar el tratamiento si no está disponible inmediatamente. En ausencia de dicho diagnóstico apropiado, puede ser muy peligroso administrar un agente que disuelva los coágulos, tal como un activador del plasminógeno tisular ("tPA"), si la causa resulta ser una hemorragia en lugar de un coágulo sanguíneo, ya que los resultados de

45 administrar tPA u otro agente trombolítico a un paciente que ha tenido una hemorragia cerebral puede ser mortal.

45

Zarich et al. describe en la Journal of the American College of Cardiology, vol. 26, n.º 2, 1 de agosto de 1995, en las páginas 374-379, un estudio de pacientes con infarto de miocardio agudo a los que se ha administrado una inyección intravenosa rápida de activador de plasminógeno de tipo tisular recombinante (rt-PA) y una infusión de prourocinasa.

50

Liu Jian-Ning et al. describe en Circulation Research of the American Heart Association, vol. 90, n.º 7, 19 de abril de 2002 en las páginas 757-763, un mutante de prourocinasa que induce la lisis eficaz de coágulos sin impedir la hemostasis.

Sumario

55

La presente invención se define por las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes representan realizaciones adicionales de la invención.

60

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que las distintas y diferentes especificidades de tPA y el mutante de prourocinasa (mutante de "proUK" o "mproUK") significa que pequeñas dosis de cada uno en combinación induce trombólisis que es más rápida y más segura, es decir, más específica y con menor incidencia de complicaciones hemorrágicas, por ejemplo, para tratar la apoplejía o el infarto de miocardio agudo ("AMI"), de lo que es posible usando uno cualquiera en solitario (monoterapia) con altas dosis que consiguen una tasa máxima de lisis del coágulo sanguíneo, pero con un alto riesgo de complicaciones hemorrágicas.

65

La mproUK puede comprender una sustitución de histidina en lugar de lisina en la posición del aminoácido 300 (Lys300→His) de prourocinasa, denominada en este documento "M5". La mproUK, como la proUK, es una proenzima, es decir, el precursor inactivo de la enzima activa. Difiere de la proUK en que su forma enzimática urocinasa mutante o mUK, a diferencia de la urocinasa (UK), se inhibe por un inhibidor plasmático, el inhibidor de C1, que adicionalmente

a las dosis inferiores necesarias, ayuda a reducir los efectos secundarios hemorrágicos observados con proUK, que se deben a UK para la que hay insuficiente inhibidor (inhibidor-1 del activador de plasminógeno, PAI-1) en el plasma.

Para pacientes con apoplejía o AMI, el tiempo necesario para la trombólisis y la reperfusión es crucial para el resultado clínico y la tasa de supervivencia. Esto significa que el tratamiento debe ser suficientemente seguro para administrarse fuera del hospital sin ensayo diagnóstico preliminar. Sin embargo, esto posible únicamente si el riesgo hemorrágico se reduce o elimina en gran medida como es el caso con los nuevos métodos descritos en este documento que incluyen la administración de una minidosis de tPA (por ejemplo, un bolo de menos de 5,0 mg, por ejemplo, menos de o igual a 4,5 mg, 4,0 mg, 3,5 mg, 3,0 mg, 2,5 mg o 2,0 mg) y baja dosis de mproUK (por ejemplo, una infusión durante 60 a 90 minutos (por ejemplo, 60, 70, 80 o 90 minutos) a una tasa de 60 a 120 mg/hora, por ejemplo, de 60 a 90 mg/hora, por ejemplo, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 mg/hora) en combinación.

Si la concentración endógena de inhibidor de C1 es insuficiente en un sujeto dado, pueden complementarse en los nuevos métodos administrando una cantidad eficaz de un inhibidor de C1, por ejemplo, un inhibidor de C1 disponible en el mercado tal como CINRYZE®, CETOR®, BERINERT® y RUCONEST®. El inhibidor de C1 es una precaución adicional en caso de que se produzca algo de conversión de mproUK en UK mutante, pero puede no ser necesario debido a la baja dosis de mproUK requerida y al hecho de que el inhibidor de C1 es un reactivo de fase aguda, que se eleva automáticamente por el cuerpo inmediatamente después de un ataque cardíaco o apoplejía.

En este documento se proporcionan en un primer aspecto composiciones para su uso en métodos de tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, con síntomas de apoplejía o infarto de miocardio agudo (AMI) a una tasa máxima de lisis del coágulo sanguíneo y con efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos, incluyendo los métodos (a) identificar a un sujeto que posiblemente haya tenido una apoplejía o AMI observando uno o más síntomas de una apoplejía o AMI sin determinar la causa de la apoplejía; y (b) administrar al sujeto una inyección intravenosa rápida de una primera composición que incluye de 2 a 4,5 mg de activador del plasminógeno tisular (tPA), por ejemplo, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 o 4,5 mg de tPA, seguido de una infusión intravenosa de una segunda composición que incluye una dosis baja de mutante de prourocinasa (mproUK) que incluye una sustitución de histidina en el lugar de la lisina en la posición del aminoácido 300 (Lys300→His) de prourocinasa infundida durante 60 a 90 minutos, por ejemplo, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 minutos, a una tasa de dosificación baja de 60 a 120 mg, por ejemplo, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 100 o 120 mg/hora; en los que una tasa de lisis máxima del coágulo se consigue con efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos.

En algunas realizaciones de estas composiciones para su uso, los efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos pueden determinarse como un nivel de degradación de fibrinógeno en la sangre del sujeto de menos de aproximadamente un 30 por ciento, por ejemplo, menos de un 27,5 %, 25 %, 22,5 % o un 20 % de degradación de fibrinógeno (mientras que la degradación del fibrinógeno es de aproximadamente 50 % a un 80 % con monoterapia mediante cualquier composición en solitario). En algunas realizaciones, la tasa de lisis máxima del coágulo se indica por haber conseguido una puntuación de 2 o mayor en trombólisis en infarto de miocardio (TIMI - Thrombolysis In Myocardial Infarction). En otras realizaciones, la tasa de lisis máxima del coágulo se indica por haber conseguido una lisis de aproximadamente un 50 % de la masa de al menos un coágulo en el sujeto que se consigue en 75 minutos, por ejemplo, en 70, 60, 50, 40, 04 30 minutos.

Las composiciones para su uso pueden incluir empezar la administración de la segunda composición en cinco, 10 o 15 minutos después de la administración de la primera composición. En algunas realizaciones, la primera composición y la segunda composición conjuntamente lisan un 50 % de una masa de al menos un coágulo sanguíneo en el sujeto en menos de una hora.

En determinadas realizaciones, las composiciones para su uso pueden incluir además administrar al sujeto una tercera composición que incluye una inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1. La tercera composición puede administrarse al sujeto antes o aproximadamente al mismo tiempo, por ejemplo, en 5 minutos, de la administración de la segunda composición. En determinadas composiciones, la tercera composición se administra en una cantidad suficiente para establecer una concentración de inhibidor de C1 que es de aproximadamente 500-750 µg/ml en la sangre del sujeto. En algunas realizaciones, la tercera composición es una inyección intravenosa rápida de aproximadamente 500-1000 mg de inhibidor de C1.

En algunas de estas composiciones para su uso, la primera composición y la segunda composición conjuntamente lisan los coágulos sanguíneos en presencia del inhibidor de C1 con menos de un 30 % de degradación de fibrinógeno en comparación con monoterapia por tPA o prourocinasa en solitario.

En otro aspecto, la divulgación proporciona kits que incluyen una primera composición en un primer recipiente que incluye 2-5 mg de activador del plasminógeno tisular (tPA) formulado adecuadamente para su administración como una inyección intravenosa rápida; y una segunda composición en un segundo recipiente que incluye 60-120 mg de un mutante de prourocinasa (mproUK) que tiene una sustitución de histidina en el lugar de la lisina en la posición del aminoácido 300 (Lys300→His) de prourocinasa. En estos kits, la segunda composición puede formularse adecuadamente para infusión intravenosa. En determinadas realizaciones, los kits incluyen además una tercera composición que incluye 500-1500 mg de inhibidor de C1, por ejemplo, formulado adecuadamente para su

administración como una inyección intravenosa rápida.

La divulgación proporciona composiciones para uso en cualquiera de los métodos descritos en este documento. En determinadas realizaciones, las composiciones para su uso en el tratamiento de un sujeto con síntomas de apoplejía o infarto de miocardio agudo (AMI) a una tasa máxima de lisis del coágulo y con efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos. Estas composiciones incluyen una primera composición que incluye menos de 5 mg de activador del plasminógeno tisular (tPA), en las que la primera composición es o se prepara para que se administre a un sujeto en una pauta posológica de una inyección intravenosa rápida; y una segunda composición que incluye un mutante de prourocinasa (mproUK), en las que la segunda composición o se prepara para que se administre a un sujeto por infusión intravenosa en una pauta posológica de 60 a 120 mg/hora durante 60 a 90 minutos después de la administración de la primera composición; en las que el sujeto se identifica como uno que posiblemente ha tenido una apoplejía o AMI observando uno o más síntomas de apoplejía o AMI sin determinar la causa de la apoplejía antes de la administración de la primera composición; y en las que se consigue una tasa de lisis máxima del coágulo con efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos. Estas composiciones pueden incluir todas las características y elementos descritos en este documento.

La expresión "tratamiento" o "tratamiento terapéutico" significa la administración de uno o más agentes farmacéuticos a un sujeto o la realización de un procedimiento médico sobre el cuerpo de un sujeto. La expresión tratamiento terapéutico también incluye un ajuste (por ejemplo, aumento o disminución) en la dosis o la frecuencia de uno o más agentes farmacéuticos que un sujeto puede estar tomando, la administración de uno o más agentes farmacéuticos nuevos al sujeto o la eliminación de uno o más agentes farmacéuticos del plan de tratamiento del sujeto.

Como se usa en este documento, un "sujeto" o "paciente" es un ser humano.

Una "cantidad eficaz" usada en este documento es una cantidad suficiente para conseguir la trombólisis sin causar efectos secundarios hemorrágicos o de tipo hemofilia significativos. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica (es decir, una dosificación eficaz) depende de la composición farmacéutica seleccionada.

La "tasa de lisis máxima" de los coágulos sanguíneos se define en este documento como una tasa de lisis de coágulos sanguíneos al menos tan rápida como la que puede conseguirse por monoterapia con tPA, proUK o mproUK a una dosificación eficaz de forma máxima (es decir, una dosis del fármaco a la que no puede conseguirse una lisis del coágulo más rápida añadiendo fármaco adicional, por ejemplo, se muestra un estancamiento en la tasa de lisis del coágulo a la dosificación eficaz de forma máxima) sin ningún efecto secundario hemorrágico asociado. Es importante observar que la tasa de lisis máxima conseguida usando monoterapia, por ejemplo, con tPA o M5, causaría hemorragia significativa en un paciente, como se indica, por ejemplo, por un nivel de degradación de fibrinógeno de más de un 30 %. Sorprendentemente, los presentes métodos terapéuticos consiguen la tasa de lisis máxima sin efectos secundarios hemorrágicos, lo que puede indicarse por un nivel de degradación de fibrinógeno de menos de un 30 %, que no se asociaría con un exceso de hemorragia y sería clínicamente aceptable.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto entre las referencias mencionadas en este documento y la presente memoria descriptiva, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

#### Descripción de los dibujos

La fig. 1A es un gráfico lineal que muestra la lisis de coágulos plasmáticos marcados con fluoresceína por tPA a tres dosis: 1, 2 o 3 µg/ml. El tiempo usado por tPA para lisar un 50 % de los coágulos plasmáticos a una dosis saturada es de 60 minutos. La fig. 1B es un gráfico de barras que muestra el fibrinógeno restante al final de la lisis del coágulo, expresado como el porcentaje de la medida inicial (BL).

La fig. 2A es un gráfico lineal que muestra la lisis de coágulos plasmáticos marcados con fluoresceína por mproUK (M5) a tres dosis: 10, 12,5 o 15 µg/ml. El tiempo usado por M5 para lisar un 50 % de los coágulos plasmáticos a una dosis saturada es de 50 minutos. La fig. 2B es un gráfico de barras que muestra el fibrinógeno restante al final de la lisis del coágulo, expresado como el porcentaje de la medida inicial (BL). La fig. 2C es un gráfico lineal que muestra el tiempo usado por mproUK (M5) para lisar los coágulos plasmáticos marcados con fluoresceína que no se vio alterada por el inhibidor de C1 (750 µg/ml). La fig. 2D es un gráfico de barras que muestra la fibrinogenólisis por M5 que se evitó por el inhibidor de C1 (750 µg/ml).

La fig. 3 es un gráfico lineal que muestra la tasa de lisis máxima del coágulo por una combinación de (0,2 µg/ml) y M5 (6 µg/ml) (círculo). La combinación indujo la lisis del coágulo mucho más rápido que 0,2 µg/ml de tPA (cuadrado) o 6 µg/ml de M5 (triángulo) en solitario. Los resultados son representativos de un solo experimento realizado por triplicado.

La fig. 4A es un gráfico lineal que muestra la lisis del coágulo por una combinación de tPA (0,2 µg/ml) y M5 (6 µg/ml) (círculo). La combinación indujo la lisis del coágulo mucho más rápido que 0,2 µg/ml de tPA (cuadrado) o 6 µg/ml de M5 (triángulo) en solitario. La fig. 4B es un gráfico de barras que muestra el fibrinógeno plasmático restante al final de la lisis del coágulo, expresado como el porcentaje de la medida inicial (BL) de fibrinógeno. Los resultados son representativos de 10 experimentos realizados por triplicado.

La fig. 5A es un gráfico lineal que muestra la tasa de lisis máxima del coágulo por una combinación de tPA (0,2 µg/ml) y M5 (6 µg/ml) además de inhibidor de C1 (750 µg/ml). La adición de inhibidor de C1 a la combinación no inhibió la lisis, sin embargo, si inhibió la lisis mediante tPA en solitario. La fig. 5B es un gráfico de barras que muestra el fibrinógeno plasmático restante al final de la lisis del coágulo, expresado como el porcentaje de la medida inicial (BL) de fibrinógeno. El inhibidor de C1 atenuó la fibrinogenólisis.

La fig. 6 es un gráfico lineal que muestra que dosis de tPA mayores de 0,2 µg/ml no potencian adicionalmente la tasa de lisis del coágulo cuando se combinan con 6 µg/ml de M5.

La fig. 7 es un gráfico de barras que muestra el promedio de tiempo necesario para lisar un 50 % de los coágulos plasmáticos por la combinación de 0,2 µg/ml de tPA y 6 µg/ml de M5 ("tPA+M5"), 0,2 µg/ml de tPA ("tPA 0,2"), 6 µg/ml de M5 ("M5 6"), 15 µg/ml de M5 ("M5 15"), 3 µg/ml de tPA ("tPA 3"). Los datos se combinan de múltiples experimentos (el número de experimentos se muestra por encima de cada barra).

La fig. 8 es un gráfico de barras que muestra el fibrinógeno restante (% de BL) al final de la lisis del coágulo por una combinación de 0,2 µg/ml de tPA y 6 µg/ml de M5 en diferentes condiciones ensayadas, concretamente, (1) en 2 ml de plasma; (2) en 2 ml de plasma más inhibidor de C1 (500 µg/ml); y (3) en 5 ml de plasma. Aumentos en el volumen de plasma disminuyen de forma natural la degradación del fibrinógeno (los volúmenes de plasma en sujetos humanos son de aproximadamente 3000 ml de promedio) y, por tanto, el uso de un inhibidor de C1 probablemente no sea necesario *in vivo*, pero es útil en estudios *in vitro* para imitar mejor las condiciones *in vivo*.

La fig. 9 es un gráfico lineal que muestra que, en ausencia de un coágulo sanguíneo, no se producía fibrinogenólisis por la combinación de 0,2 µg/ml de tPA y 6 µg/ml de M5 durante al menos 3 horas, lo que sugiere que en ausencia de un coágulo *in vivo* la combinación también sería inactiva.

La fig. 10A es un gráfico de barras que muestra el volumen de hematoma después de hemorragia intracerebral en un modelo de rata. El volumen de hematoma se midió por el contenido de hemoglobina a las 2 horas después de la dosis. No se determinó diferencia significativa ( $p = 0,5194$ ) entre los animales a los que se dosificó inhibidor de C1/M5 y a los que se dosificó con solución salina/solución salina. El inhibidor de C1 se incluyó ya que la rata carece de este inhibidor de M5/UK.

La fig. 10B es un gráfico de barras que muestra la determinación histológica del volumen de hemorragia después de hemorragia intracerebral en un modelo de rata. No se determinó diferencia significativa ( $p = 0,6899$ ) en el volumen de hemorragia entre los animales a los que se dosificó inhibidor de C1/M5 y a los que se dosificó solución salina/solución salina.

#### Descripción detallada

La presente divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la trombólisis puede conseguirse a una tasa de lisis máxima del coágulo para conseguir un flujo sanguíneo aumentado, por ejemplo, en una puntuación de 2 o mejor en trombólisis en infarto de miocardio (TIMI) en aproximadamente 75 minutos y sin el riesgo hemorrágico esperado administrando una combinación de una minidosis de activador del plasminógeno tisular (tPA) y una dosis baja de mutante de prourocinasa ("mutante de proUK" o "mproUK"), por ejemplo, una mproUK que comprende una sustitución de histidina en el lugar de la lisina en la posición del aminoácido 300 (Lys300→His) de prourocinasa, denominada en este documento "M5". Para pacientes con apoplejía o infarto de miocardio agudo, el tiempo necesario para trombólisis y reperfusión es crucial para el resultado clínico y la tasa de supervivencia. Para hacer esto posible, el tratamiento también debe ser suficientemente seguro de modo que los pacientes puedan tratarse antes de la hospitalización. En este documento se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto que tuvo posiblemente una apoplejía o infarto de miocardio.

Estos métodos pueden usarse para tratar a pacientes con síntomas de apoplejía o infarto de miocardio agudo sin el retardo causado por los procedimientos de diagnóstico lentos, potenciando de ese modo las posibilidades de un mejor resultado clínico y tasa de supervivencia para esos pacientes. Como la fibrinólisis puede conseguirse con minidosis de tPA y dosis bajas de mproUK en la combinación, la activación no específica del plasminógeno y los efectos secundarios de tipo hemofílico asociados con regímenes de activador del plasminógeno de dosis alta pueden reducirse

hasta niveles mínimos mientras aún se consigue una tasa de lisis máxima del coágulo. También se proporcionan en este documento kits que incluyen una primera composición que comprende tPA y una segunda composición que comprende mproUK, para su uso en los métodos descritos en este documento.

5 Los coágulos sanguíneos se lisan en tres etapas por la proteasa plasmina, que es la forma activada del plasminógeno. Etapa 1: el plasminógeno presente en el plasma sanguíneo se une al coágulo de fibrina intacto en un sitio de unión específico en el dominio D que está adyacente al sitio de unión a tPA. El tPA activa el plasminógeno en este denominado "complejo ternario", que consiste en fibrina, plasminógeno y tPA, e inicia la fibrinólisis. Etapa 2: la plasmina escinde la fibrina preferentemente después de un residuo de lisina, creando lisinas carboxiterminales que representan nuevos sitios de unión a plasminógeno. Uno de estos sitios de unión recién creados es un sitio de unión de alta afinidad que consiste en tres lisinas C terminales en el dominio E de fibrina. Cuando el plasminógeno se une a este sitio en el dominio E de fibrina, experimenta un cambio conformacional especial que posibilita que se active por la actividad catalítica intrínseca de proUK y mproUK. Etapa 3: activación del plasminógeno por la activación del plasminógeno por proUK/mproUK va acompañada por la activación recíproca de proUK/mproUK por plasmina en la enzima urocinasa (UK/mUK). UK/mUK entonces activa el plasminógeno unido a fibrina restante, completando de ese modo la fibrinólisis (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 5 055 295; 5 472 692; 5 626 841; 5 759 542; 7 074 401; 7 837 992; 8 187 592; Pannell, J. Clin. Invest. 81: 853-859, 1988; Zarich, J Am Coll Cardiol 1995; 26: 374-379; Lee, AJNR Am J Neuroradiol 25: 1470-1475, 2004).

20 El autor de la presente invención ha descubierto la manera en que los nuevos métodos de tratamiento de combinación descritos en este documento están respaldados por las etapas de fibrinólisis descritas anteriormente. Únicamente tPA puede realizar de manera eficaz la etapa 1, ya que solamente el tPA se une a fibrina, forma un complejo ternario con plasminógeno y se promueve específicamente por la fibrina intacta o por el fragmento D de fibrina. ProUK/mproUK no se une a fibrina *in vivo* en condiciones normales (es decir, pueden unirse a fibrina únicamente a dosis no específicas muy altas). Por tanto, la etapa 2 puede realizarse de forma eficaz únicamente por proUK/mproUK, porque tiene una alta afinidad por el sustrato para la confirmación del plasminógeno que se forma cuando se une al dominio E de fibrina de la fibrina degradada. El fragmento E de la fibrina no tiene efecto sobre tPA, que no se une a este dominio, y promueve la activación del plasminógeno únicamente por proUK/mproUK. Por tanto, la etapa 3 también se promueve únicamente por proUK/mproUK porque, cuando la proUK activa el plasminógeno unido al dominio E de fibrina, hay activación recíproca de proUK en UK por la plasmina y la UK completa la lisis activando el plasminógeno unido a fibrina restante (por el contrario, el tPA no experimenta activación, porque sus formas de una y dos cadenas tienen actividades idénticas). La única manera en que tPA puede realizar las etapas 2 y 3 es a dosis no específicas altas que están asociadas con un alto riesgo de hemorragia.

35 El autor de la presente invención ha descubierto que la fibrinólisis puede conseguirse con una combinación de una minidosis de tPA (únicamente un 2-5 % de la dosis de 100 mg convencional) más una dosis baja de una mproUK, por ejemplo, M5 (40-50 % de la dosis en monoterapia) a una tasa máxima de lisis del coágulo con un nivel mínimo de degradación de fibrinógeno de menos de aproximadamente un 30 % (por ejemplo, menos de aproximadamente un 25 o un 20 %). Esta combinación de tPA-mproUK consigue la fibrinólisis a una tasa de lisis máxima que es al menos igual a la tasa máxima de lisis que puede conseguirse por monoterapia con tPA o mproUK a una dosis máxima, pero con niveles muy inferiores de degradación de fibrinógeno que son seguros y clínicamente aceptables, ya que no surgen riesgos de hemorragia a estos niveles más bajos, lo que no es posible con las monoterapias conocidas. Por tanto, los presentes métodos descritos en este documento proporcionan trombólisis que es claramente superior a cualquier combinación sinérgica pretendida, que no incluiría los beneficios dobles recién descubiertos de una tasa de lisis máxima del coágulo sanguíneo con seguridad máxima para el paciente, es decir, efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos.

50 La "tasa máxima de lisis" de los coágulos sanguíneos se define en este documento como una tasa de lisis de coágulos sanguíneos al menos tan rápida como la que puede conseguirse por monoterapia con tPA, proUK o mproUK a una dosificación eficaz de forma máxima (es decir, una dosis del fármaco a la que no puede conseguirse una lisis del coágulo más rápida añadiendo fármaco adicional, por ejemplo, un estancamiento en la tasa de lisis del coágulo se muestra a la dosificación eficaz de forma máxima). Sin embargo, es importante observar que la tasa máxima de lisis conseguida usando monoterapia, por ejemplo, con tPA o M5, causaría hemorragia significativa en un paciente, como se indica, por ejemplo, por un nivel de degradación de fibrinógeno de más de un 30 %. Sorprendentemente, la "seguridad máxima" conseguida por los nuevos métodos descritos en este documento se define como una degradación de fibrinógeno de menos de un 30 %, que no se asociaría con un exceso de hemorragia y sería clínicamente aceptable.

60 Por ejemplo, la combinación de tPA-mproUK puede lisar un 50 % de la masa de al menos un coágulo sanguíneo, por ejemplo, múltiples coágulos sanguíneos, en menos de una hora, por ejemplo, 48, 50, 55, 60, 65, 70, 75 o 80 minutos. La combinación también permite usar dosis significativamente menores, que son muchos más específicas para la fibrina, más seguras y más económicas. La mproUK, por ejemplo, M5, se usa en lugar de la proUK natural porque la mproUK es más estable en plasma a dosis terapéuticas y permanece en su forma de proenzima específica de fibrina, mientras que la proUK natural tiende a convertirse espontáneamente en urocinasa, que es un activador del plasminógeno no específico que puede causar complicaciones hemorrágicas. Es por esto por lo que se denegó la aprobación en el mercado de proUK por el EMEA en Europa, después de lo que se interrumpió su desarrollo en esta

región.

Como se muestra en los ejemplos a continuación, cuando se incuban en plasma en ausencia de un coágulo sanguíneo, las dosis muy bajas usadas en la combinación de tPA-mproUK no inducen ninguna degradación de fibrinógeno y, por tanto, se espera que la misma combinación tenga poco o ningún efecto sobre la coagulación o la curación de heridas. Además, como M5 es una proenzima y requiere fibrina para su activación, se espera que sea segura incluso en presencia de hemorragia, por ejemplo, durante una apoplejía hemorrágica. Además, el inhibidor de C1, que está disponible como agente farmacológico, puede usarse para inactivar cualquier actividad no específica de cualquier mUK que pueda formarse durante la fibrinólisis (Pannell, J Thromb Haemost. 5(5):1047-54, 2007), por ejemplo, en ensayos realizados *in vitro*, así como en tratamiento *in vivo*, si se requiere. Este efecto del inhibidor de C1 no está compartido por UK, y es único para el mutante de proUK.

Clínicamente, el tratamiento de combinación de tPA-mproUK puede usarse para tratar a pacientes con apoplejía o síntomas de ataque cardíaco sin el retardo causado por los procedimientos de diagnóstico lentos, que son actualmente obligatorios debido al riesgo hemorrágico significativo asociado con tPA en el tratamiento de apoplejía. El tratamiento puede administrarse por sospecha o en la ambulancia. Como el tiempo es esencial para la supervivencia y el resultado clínico de esos pacientes, el tratamiento de combinación ofrece una mejor eficacia y resultado que tPA como monoterapia, que es el único tratamiento actualmente aprobado y disponible. El beneficio terapéutico de monoterapia con tPA en el tratamiento de apoplejía sigue siendo controvertido, y su autorización se ha cuestionado recientemente (Sandercock P, Lancet. 23 de agosto de 2014; 384(9944):660-1). La mproUK activa preferentemente el plasminógeno en los coágulos oclusivos "malos" mientras se evitan los plasminógenos en los coágulos "buenos" que sellan las heridas. Por lo tanto, hay poco riesgo de abrir un sitio hemostático. Por el contrario, el tPA se dirige a dicho sitio que está compuesto de fibrina intacta, como se describe anteriormente en la etapa 1 de fibrinólisis. El plasminógeno libre en el plasma también está protegido por la acción del inhibidor de C1, de modo que hay menos riesgo de inducir un estado de tipo hemofilia.

La tasa de lisis máxima del coágulo de los presentes métodos puede determinarse *in vivo*, por ejemplo, por técnicas convencionales para evaluar la recanalización de los vasos sanguíneos. Por ejemplo, el grado de oclusión de los vasos sanguíneos puede evaluarse en analogía a la trombólisis en infarto de miocardio (TIMI), en el que una puntuación de TIMI de 0 es oclusión completa, TIMI de 1 es perfusión mínima, TIMI de 2 es flujo parcial (recanalización) y una puntuación de TIMI de 3 es flujo completo. El grupo de estudio de TIMI desarrolló esta escala de graduación para el flujo sanguíneo coronario basándose en la evaluación visual de la tasa de opacificación de contraste de la arteria infartada (véase, por ejemplo, The TIMI Study Group. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) trial: phase I findings. N Engl J Med. 1984;33:523-530; y The TIMI Study Group. Comparison of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction: results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) phase II trial. N Engl J Med. 1989; 320: 618-627, que se incorporan en este documento por referencia para su descripción de la escala de graduación de TIMI).

El grado de flujo de TIMI ha llegado a ser la norma para la evaluación semicuantitativa de la perfusión miocárdica antes y después de tratamientos de reperfusión coronaria, así como para determinar los tratamientos para apoplejía. Ambos grados 2 y 3 del flujo de TIMI se han considerado indicativos de reperfusión satisfactoria. Por tanto, como se usa en este documento, una tasa de lisis máxima del coágulo se espera que esté asociada en sujetos o pacientes humanos con la obtención de una puntuación de TIMI de 2 o mejor en aproximadamente 75 minutos o menos, por ejemplo, en 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35 o 30 minutos.

Conformaciones del plasminógeno y distribución entre coágulos sanguíneos "buenos" y "malos"

El plasminógeno puede adoptar al menos tres conformaciones diferentes antes de convertirse en plasmina activa. La primera conformación es la conformación "cerrada" natural, es decir, no unida a nada de fibrina, y el plasminógeno existe en la sangre en esta primera conformación. La urocinasa puede activar el plasminógeno en esta primera conformación y puede causar diátesis hemorrágica no específica, es decir, un estado de tipo hemofilia. Como la proUK a dosis terapéuticas es inestable y se convierte fácilmente en urocinasa a concentración terapéutica, la proUK también puede causar efectos secundarios de tipo hemofilia.

Cuando se une a fibrina, el plasminógeno puede adoptar dos o tres conformaciones "abiertas" diferentes, proporcionando una base para distinguir los coágulos de curación de heridas buenos de los coágulos oclusivos malos. La primera de estas es la conformación del plasminógeno que tiene lugar cuando el plasminógeno se une a una lisina interna en el dominio D de fibrina intacta. La segunda de estas es la conformación del plasminógeno que se produce cuando el plasminógeno se une a las tres lisinas C terminales en el fragmento E de fibrina, que se expone únicamente después de algo de degradación de fibrina como se describe anteriormente en la etapa 2 de la fibrinólisis.

Cuando se forma fibrina hemostática para sellar una lesión, actúa como una venda y no causa interferencia con el flujo sanguíneo. La fibrina intacta en dicho coágulo hemostático tiene únicamente un sitio interno de unión a plasminógeno ubicado en el dominio D, que induce la primera de estas conformaciones unidas a fibrina. En esta conformación, el plasminógeno es susceptible a activación por tPA, cuyo sitio de unión a fibrina está adyacente, pero no por proUK, que no se une a fibrina y tiene unión al sustrato debida a la segunda conformación inducida por el

dominio E de fibrina.

5 Cuando se forma un trombo en un vaso sanguíneo, impide o detiene el flujo sanguíneo y activa la liberación local de tPA de la pared del vaso sanguíneo ocluido y da lugar a degradación de fibrina. La degradación de fibrina expone un sitio de unión a plasminógeno en el fragmento E de fibrina. El plasminógeno se une a este nuevo sitio de unión en el fragmento E de fibrina. La proUK activa preferentemente el plasminógeno unido al fragmento E de fibrina.

10 La utilización de esta importante distinción entre los coágulos de fibrina "buenos" y "malos" puede conseguir de forma eficaz la trombólisis mientras protege los trombos hemostáticos que sellan las lesiones. El mutante de proUK tiene el mismo modo de acción que la proUK.

Existe una tercera conformación del plasminógeno unido a fibrina, cuando el plasminógeno se une a un solo sitio C terminal, que se cree que está en la cadena gamma de fibrina.

#### 15 Activador del plasminógeno tisular

El activador del plasminógeno tisular es una serina proteasa almacenada en las células endoteliales que revisten la pared de los vasos sanguíneos. Cuando un trombo ocluye un vaso sanguíneo, se libera tPA de la pared del vaso sanguíneo y lisa los coágulos de fibrina.

20 Actualmente, la mayor parte de la trombólisis terapéutica se realiza usando activador del plasminógeno tisular (tPA) y sus derivados, sin embargo, el tPA puede causar efectos secundarios hemorrágicos. Por ejemplo, el activador del plasminógeno tisular (tPA) a una dosis de 150 mg ha demostrado inducir trombólisis coronaria superior, pero ha estado acompañado por una incidencia inaceptable de hemorragia intracraneal, lo que obliga a adoptar una dosis menos eficaz de 100 mg (Braunwald, J Amer Coll Cardiol. 9: 467, 1987; Grossbard, J Amer Coll Cardiol. 9:467, 1987). En ensayos clínicos comparativos en pacientes con infarto de miocardio agudo (AMI), los resultados con intervención coronaria percutánea (PCI) fueron significativamente mejores que la administración intravenosa de tPA, aunque la PCI es más costosa, técnicamente compleja y es más lenta. Este resultado clínico fue sorprendente, pero puede explicarse por las siguientes propiedades de tPA: (1) la dosis terapéutica de tPA está limitada por las complicaciones de hemorragia intracraneal; y (2) la eficacia de tPA está desvirtuada por una tasa de retrombosis coronaria relativamente alta, que está asociada con evidencia hemática de generación de trombina (Verheugt, J Am Coll Cardiol 1996, 27: 766-773; Gurewich, Circulation 1993, 87: 1759-1761; Rapold, Blood 1991, 78: 1490-1495; Gulba, Lancet 1988, 2: 97; Gulba, Circulation 1991, 83: 937-944).

35 En apoplejía isquémica, se requería una reducción de la dosis adicional debido a una incidencia de un 20 % de complicaciones de hemorragia intracraneal cuando se administraba tPA a dosis equivalentes a las usadas en AMI (Hacke, JAMA 1995, 274: 1017-1025). El uso de heparina, que se usa con tPA en AMI, se descarta en apoplejía, ya que se ha informado de tasas de reoclusión de un 14-31 % (Alexandrov, Neurology 2002, 59: 862-867; Rubiera, Stroke 2005, 36: 1452-1456; Saqqur, Stroke 2007; 38: 69-74). El resultado neto ha sido que aproximadamente un 2-5 % únicamente de los pacientes con apoplejía isquémica se tratan con tPA en los Estados Unidos (Kleindorfer, Stroke 2008; 39: 924-928).

45 Se cree que la hemorragia inducida por tPA está principalmente relacionada con la lisis de fibrina hemostática necesaria para reparar sitios de lesión en la pared de los vasos, que habitualmente están ocultos y son impredecibles, pero dependen de la dosis de tPA. La proUK/M5 evita estos sitios debido a su diferente modo de acción, como se describe anteriormente.

#### Prourocinasa y mutantes de prourocinasa

50 La prourocinasa (proUK) es menos conocida como fármaco trombolítico, pero se han completado estudios clínicos en fase 3 en infarto de miocardio agudo (Michels R, J Thromb Thrombolysis 1995, 2: 117-124; PRIMI Trial Study Group. Lancet 1989, 1: 863-867; Tebbe U, J Am Coll Cardiol 1998, 31: 487-493). La proUK inducía poca (5 %) o ninguna retrombosis coronaria y ninguna evidencia hemática de generación de trombina en estos estudios (PRIMI Trial Study Group. Lancet 1989, 1: 863-867; Weaver, J Am Coll Cardiol 1994, 241: 242-248). Desafortunadamente, a dosis terapéuticas, la proUK llegaba a ser vulnerable a la activación espontánea en la forma enzimática, urocinasa de dos cadenas (tcUK), en plasma. Cuando esto sucedía, se incurría en un riesgo hemorrágico, y por esta razón, se denegó la aprobación de comercialización y se abandonó el desarrollo de proUK en Occidente.

60 La inestabilidad de proUK se relacionó con su actividad catalítica intrínseca relativamente alta. Los estudios de estructura-función revelaron que los residuos cargados en un bucle flexible que consistía en los residuos aminoácidos 297-313 en el dominio catalítico son responsables de esta actividad. La mutagénesis en la región del bucle flexible provocó la modulación de la actividad intrínseca de proUK. Se describen mutantes de "bucle flexible" de proUK ejemplares con actividad catalítica intrínseca reducida en la patente de Estados Unidos n.º 5 472 692, tal como el mutante Gly299→Ala, el mutante Lys300→His (conocido como "M5" o "mutante M5"), el mutante Lys300→Ala y el mutante Glu301→His.

Uno de estos mutantes del "bucle flexible" de proUK, M5 (Lys300→His), se ha ensayado tanto *in vitro* como *in vivo*, y demostró disolver los coágulos sanguíneos mucho más rápido que la proUK natural (Liu et al., Circulation Research, 90:757-763, 2002). La actividad intrínseca del mutante M5 monocatenario es cinco veces menor que la proUK, de modo que M5 es más estable en sangre que la proUK natural y tiene menor probabilidad de convertirse espontáneamente en la forma enzimática activa y causar efectos secundarios de tipo hemofilia (Liu, Biochemistry 1996, 35: 14070-14076). La actividad de la forma enzimática bicatenaria de las mproUK, por ejemplo, M5, y el modo de acción de las mproUK, por ejemplo, M5, permanece igual que la proUK natural (Sun Z, J Biol Chem 1997, 272: 23818-23823; Liu, Circu. Res. 2002, 90: 757-763). Las mproUK como M5 poseen otra propiedad superior; pueden inhibirse por el inhibidor de C1 plasmático endógeno, proporcionando protección contra efectos secundarios no específicos sin interferir con la fibrinólisis por parte de mproUK (Gurewich, J Thrombos Haemost, 2006, 4: 1559-1565; Pannell, J Thromb Haemost, 2007, 5: 1047-1054; Gurewich, Thromb Haemost, 2009, 102: 279-286). De forma importante, las mproUK tales como M5 no muestran ningún efecto secundario hemorrágico normalmente asociado con los agentes trombolíticos que se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7 074 401. Además, las mproUK tales como M5 pueden sintetizarse de acuerdo con los métodos descritos en la patente de Estados Unidos n.º 7 070 958.

Se espera que M5 y otras mproUK sean seguras para administración a seres humanos, porque (1) son esencialmente una proteína humana natural (un 99,8 % de similitud con la proUK natural), (2) están libres de reacciones antigénicas (inmunológicas) y (3) la proUK humana de origen natural y la proUK humana recombinante de *E. coli* ya se han administrado de forma segura a aproximadamente 5000 pacientes humanos en estudios clínicos en fase III.

#### Tratamiento de combinación para tPA de dosis baja y mproUK

Utilizando el mecanismo complementario de acción de tPA y proUK sobre la acción del plasminógeno, el autor de la presente invención ha demostrado que la fibrinólisis a una tasa de lisis máxima del coágulo puede conseguirse con una combinación de una minidosis de tPA (a un 2-5 % de la dosis de 100 mg convencional, por ejemplo, inyección intravenosa rápida de 1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 o 4,5 mg) más una infusión de mproUK, por ejemplo, M5 (a un 40-50 % de la dosis de monoterapia, por ejemplo, de 60 a 120 ug/ml infundido durante 60-90 minutos) dando una tasa de lisis máxima del coágulo, que es al menos tan rápida como la tasa de lisis máxima del coágulo que puede conseguirse por monoterapia con tPA o mproUK en solitario a su dosis eficaz máxima (fig. 1A a 5B). Por ejemplo, la combinación de tPA-mproUK puede lisar un 50 % de la masa de los coágulos sanguíneos en menos de una hora, por ejemplo, 48 minutos, de promedio (véase la fig. 7, tPA + MF). Aunque tPA y mproUK (M5) en solitario pueden conseguir un tiempo de lisis similar a dosis muy altas, por ejemplo, tPA a 3 µg/ml o mproUK (M5) a 15 µg/ml (fig. 7), puede producirse activación no específica del plasminógeno y degradación resultante del fibrinógeno en aproximadamente un 77 % para M5 (véase la fig. 2B) y aproximadamente un 80 % para tPA (véase la fig. 1B) a esas dosis y causar efectos secundarios de tipo hemofílico significativos y clínicamente inaceptables.

La mproUK tal como M5 se usa en lugar de proUK natural, porque mproUK es más estable en plasma y permanece en forma de proenzima mientras que la proUK natural tiende a convertirse espontáneamente en urocinasa y causar efectos secundarios de tipo hemofílico. Por tanto, la tasa de lisis máxima del coágulo puede conseguirse por la combinación de tPA-mproUK con solamente una fracción de las dosis de monoterapia de tPA y mproUK.

Cuando se incubaba en plasma en ausencia de un coágulo sanguíneo, la combinación de tPA-mproUK no induce nada de degradación de fibrinógeno (fig. 9) y, por tanto, se espera que no tenga efecto sobre la coagulación y la curación de las heridas *in vivo*. Además, puede usarse inhibidor de C1 para inactivar cualquier actividad no específica de mUK (la forma enzimática de mproUK) en plasma (fig. 2D y 6), añadiendo protección adicional contra las complicaciones hemorrágicas.

Clínicamente, el tratamiento de combinación de tPA-mproUK puede usarse para tratar a pacientes con apoplejía o síntomas de ataque cardíaco sin el retardo causado por los procedimientos de diagnósticos lentos. En este documento se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto con síntomas de apoplejía o infarto de miocardio agudo (a) identificando a un sujeto que posiblemente tuvo una apoplejía o infarto de miocardio agudo observando uno o más síntomas sin determinar la causa subyacente de la apoplejía o infarto de miocardio agudo; y (b) administrando al sujeto una inyección intravenosa rápida de una primera composición que comprende 5 mg o menos de tPA seguida de infusión de una segunda composición de mproUK a una tasa de 60 a 120 mg/hora infundida durante 60 a 90 minutos. La segunda composición puede administrarse aproximadamente 5, 10 o 15 minutos después de la administración de la primera composición. La primera composición y la segunda composición se administran en una cantidad para lisar cualquier coágulo sanguíneo que cause los síntomas de apoplejía o infarto de miocardio agudo a una tasa de lisis máxima. La primera composición puede incluir de 2 a 5 mg de tPA, por ejemplo, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 3,5 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 4,5 mg, aproximadamente 5 mg. La segunda composición que incluye una mproUK como M5 puede administrarse por infusión intravenosa. La infusión intravenosa de mproUK como M5 puede realizarse a una dosis de aproximadamente 60-120 mg/hora (por ejemplo, 60-100, 70-90 o 75-85 mg/hora) durante 60, 70, 80 o 90 minutos.

Las composiciones para su uso descritas en este documento pueden usarse en métodos para tratar la apoplejía. Una apoplejía puede ser isquémica o hemorrágica. La apoplejía isquémica está causada por un trombo que obstruye el

flujo sanguíneo, mientras que la apoplejía hemorrágica está causada por un vaso sanguíneo roto. Aproximadamente un 85 % de las veces, una apoplejía es isquémica, por ejemplo, causada por un coágulo sanguíneo y, por lo tanto, es susceptible a tratamiento por un agente trombolítico. El momento oportuno de reperfusión después de una apoplejía isquémica es crucial, porque cuanto más tiempo estén las células cerebrales sin sangre oxigenada, mayor cantidad de células cerebrales se perderá. Sin embargo, es difícil y lento diagnosticar completamente la causa de una apoplejía, aunque un diagnóstico preciso es crucial para el tratamiento con los agentes trombolíticos actualmente disponibles debido al alto riesgo de efectos secundarios hemorrágicos. La administración de un agente trombolítico a un paciente con apoplejía isquémica puede ser un tratamiento apropiado, pero administrar el mismo agente trombolítico a un paciente con apoplejía hemorrágica exacerbará el problema y puede matar al paciente. Aunque se tarda en confirmar un diagnóstico, los síntomas básicos de la apoplejía mostrados por una persona (tal como aparición repentina de parálisis unilateral) pueden determinarse fácilmente por un experto en el campo médico, tal como un EMT, una enfermera o un doctor, o incluso un lego con formación mínima.

Un sujeto con síntomas de apoplejía puede tratarse usando las composiciones para su uso descritas en este documento por administración de una inyección intravenosa rápida de una dosis baja de tPA seguida de una infusión de mproUK. La dosis muy baja de tPA en la combinación reduce el potencial riesgo hemorrágico. Como el tPA en la combinación es una minidosis y la mproUK puede lisar un trombo, pero evitar la fibrina hemostática, la combinación puede usarse para tratar a pacientes con una posible apoplejía isquémica de forma segura con poco riesgo de agravar la hemorragia en el cerebro. Por tanto, es posible iniciar el tratamiento en la ambulancia basándose en la sospecha clínica del diagnóstico.

Las composiciones para su uso descritas en este documento también pueden usarse en métodos para tratar el ataque cardíaco, por ejemplo, infarto de miocardio agudo. Un ataque cardíaco se produce cuando una de las arterias coronarias se bloquea, por ejemplo, por un coágulo sanguíneo. El momento oportuno de reperfusión después de un ataque cardíaco es crucial, porque cuanto más tiempo esté el músculo cardíaco sin sangre oxigenada, mayor cantidad de células musculares se dañarán o perderán. El presente tratamiento de elección es mediante cateterización o angioplastia, que requieren hospitalización, una sala de cateterización disponible y personal preparado. Esto retarda el tratamiento y conlleva un alto coste. Esta primera hora después de una oclusión coronaria se ha denominado "hora de oro", porque es el tiempo durante el que es posible salvar el máximo de músculo cardíaco y reducir al máximo la mortalidad. El pretratamiento con tPA para ganar tiempo antes de la cateterización se ha abandonado en general ya que múltiples estudios han demostrado que tPA aumenta significativamente la tasa de complicación con la cateterización.

Un sujeto con síntomas de un ataque cardíaco puede tratarse por administración de una inyección intravenosa rápida de una dosis baja de tPA seguida de una infusión de una mproUK tal como M5 como se describe en este documento. La experiencia ha demostrado que el pretratamiento con proUK no está asociado con complicaciones poscateterización, de modo que el pretratamiento con la combinación debe tolerarse bien y también puede reducir la necesidad de cateterización posterior.

#### Inhibidor de C1

El inhibidor de C1 es un inhibidor de serina proteasa de 104 kDa con una concentración plasmática normal de aproximadamente 250 µg/ml y una semivida de aproximadamente 28 horas. La deficiencia de esta proteína se ha asociado con una enfermedad llamada angioedema hereditario. El inhibidor de C1 se ha administrado desde hace tiempo clínicamente para el tratamiento de angioedema hereditario. Los inhibidores C1 disponibles en el mercado incluyen CINRYZE®, CETOR®, BERINERT® y RUCONEST®.

Las enzimas activas bicatenarias UK o mUK generadas durante la fibrinólisis finalmente se liberan en el plasma donde la activación del plasminógeno llega a ser un inconveniente. La inactivación de esta actividad requiere inhibidores plasmáticos. Como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.837.992, un complejo inhibidor de inhibidor de C1 aparecía en minutos de la incubación de la enzima mUK con plasma humano o de perro. El inhibidor de C1 está presente de forma endógena en el cuerpo humano y puede complementarse farmacológicamente. El inhibidor de C1 endógeno demostró ser muy eficaz en la inactivación de la actividad de mUK, por ejemplo, tcM5, pero no la actividad de UK (Gurewich V, J Thrombos Haemost, 2006; 4: 1559-1565; Pannell R, J Thromb Haemost, 2007; 5: 1047-1054; Gurewich, Thromb Haemost, 2009; 102: 279-286). Como se muestra en la patente de Estados Unidos n.º 7.837.992, el inhibidor de C1, inhibiendo mUK estabilizaba de forma eficaz la mproUK como M5 en plasma y permitía que se tolerara una mayor concentración de mproUK como M5 sin comprometer la especificidad por fibrina.

Las composiciones para su uso en métodos de tratamiento de un sujeto con síntomas de apoplejía o infarto de miocardio agudo divulgados en este documento pueden incluir además la administración de una tercera composición que comprende un inhibidor de C1 al sujeto. El inhibidor de C1 puede administrarse como una inyección intravenosa rápida en una cantidad suficiente para establecer una concentración de inhibidor de C1 en el plasma del sujeto que está dentro del intervalo de 2 a 3 veces por encima del nivel fisiológico normal de inhibidor de C1 (aproximadamente 250 µg/ml), es decir, aproximadamente 500-750 µg/ml. Por ejemplo, la tercera composición puede incluir 500-1000 µg/ml de inhibidor de C1. En algunas realizaciones, la tercera composición puede administrarse al sujeto antes de la administración de la segunda composición. En algunas realizaciones, la tercera composición puede administrarse

al sujeto simultáneamente con la segunda composición.

Composiciones farmacéuticas, pautas posológicas y métodos de administración

- 5 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento pueden incluir dosificaciones específicas de tPA y un mutante de proUK tal como M5 como ingredientes activos. El ingrediente activo de una composición farmacéutica, por ejemplo, tPA o mproUK, puede formularse para su suministro por inyecciones intravenosas.

10 Los métodos de formulación de composiciones farmacéuticas adecuadas son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.<sup>a</sup> ed., 2005; y los libros de la serie Drugs y the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks y Monographs (Dekker, NY). Por ejemplo, las soluciones o suspensiones usadas para administración parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético EDTA; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechas de vidrio o plástico.

20 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua), dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones inyectables estériles o dispersiones. Para administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL<sup>TM</sup> (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyectarla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezcla adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

35 La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, glúcidos, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio en la composición. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dosificador junto con instrucciones para su administración.

50 Las pautas posológicas pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Véase, por ejemplo, Physicians' Desk Reference, 63.<sup>a</sup> edición, Thomson Reuters, 30 de noviembre de 2008. Por ejemplo, la dosificación, toxicidad y eficacia terapéutica de los compuestos terapéuticos pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL50/DE50. Los compuestos que muestran altos índices terapéuticos son preferidos. Aunque pueden usarse compuestos que muestran efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

60 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de una serie de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma galénica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración plasmática en circulación que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consiga la mitad de la inhibición máxima de los síntomas) determinada en cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de manera más precisa las dosis útiles en seres

humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

La inyección intravenosa rápida de tPA puede incluir 2-5 mg de tPA, por ejemplo, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 2,5 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 3,5 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 4,5 mg o aproximadamente 5 mg. La dosis intravenosa de mproUK, por ejemplo, M5, puede ser de 60-120 mg/hora (por ejemplo, 60-100, 70-90 o 75-85 mg/hora) durante 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 minutos. El inhibidor de C1 puede administrarse como una inyección intravenosa rápida en una cantidad suficiente para establecer una concentración de inhibidor de C1 en el plasma del sujeto que sea de aproximadamente 500-750 µg/ml. Por ejemplo, la inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1 puede incluir 500-1500 mg de inhibidor de C1.

Para pacientes con apoplejía o infarto de miocardio agudo, el tiempo necesario para la reperfusión es crucial para la supervivencia y el resultado clínico. Estos hallazgos sugieren que una combinación de minidosis de tPA y M5 puede conseguir trombólisis terapéutica de una manera más segura y más eficaz. Por tanto, pacientes con apoplejía o infarto de miocardio agudo pueden tratarse con una combinación de tPA y M5 con poco o ningún retardo.

La eficacia de trombólisis se define por la tasa de lisis. Sin embargo, la utilidad clínica requiere que la eficacia se divida por la incidencia de complicaciones hemorrágicas de esa tasa. Con el tratamiento de combinación descrito en este documento, la evidencia es que no hay utilidad clínica máxima, ya que la combinación óptima induce una tasa máxima de lisis sin degradación significativa del fibrinógeno (véase Pannell et al., PLOS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0122018 26 de marzo de 2015). Esto supone un índice de utilidad clínica muy superior, de hecho, da el índice de utilidad máximo posible, es decir, la tasa de lisis máxima del coágulo posible para activadores del plasminógeno sin efectos secundarios.

#### Kits

En este documento también se proporcionan kits que incluyen al menos una composición que comprende activador del plasminógeno tisular (tPA) en un recipiente y otra composición que comprende una mproUK, por ejemplo, M5, en un recipiente diferente. Los kits se usan para realizar los métodos terapéuticos descritos en este documento. La primera composición puede formularse adecuada para su administración como una inyección intravenosa rápida y puede incluir 2-5 mg de tPA. La segunda composición puede formularse adecuada para infusión intravenosa. La segunda composición puede incluir 60-120 mg (por ejemplo, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 90 mg) del mutante de proUK, para su infusión durante un periodo de tiempo de 60-90 minutos. El kit también puede incluir una tercera composición que comprende inhibidor de C1. La tercera composición puede formularse adecuada para su administración como una inyección intravenosa rápida y puede incluir aproximadamente 500-1500 mg de inhibidor de C1.

Los kits en general incluyen los siguientes elementos principales: envasado, reactivos que comprenden composiciones de unión como se describe anteriormente, opcionalmente un control e instrucciones. El envasado puede ser una estructura de tipo caja para alojar un vial (o varios viales) que contiene las composiciones, e instrucciones para su uso en un método descrito en este documento. Los expertos en la materia pueden modificar fácilmente el envasado para adecuarse a las necesidades individuales.

Las composiciones y kits proporcionados en este documento pueden usarse de acuerdo con cualquiera de los métodos (por ejemplo, métodos de tratamiento) descritos anteriormente. Por ejemplo, las composiciones y kits que contienen una composición que comprende tPA y otra composición que comprende un mutante de proUK, por ejemplo, el mutante M5, pueden usarse para tratar la apoplejía, ataque cardíaco u otras enfermedades cardiovasculares causadas por un trombo tal como gangrena periférica. Los expertos en la materia serán conscientes de otros usos adecuados para las composiciones y kits proporcionados en este documento, y podrán emplear las composiciones y kits para dichos usos.

#### Ejemplos

La invención se describe además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

##### **Ejemplo 1. Trombólisis de tasa de lisis máxima del coágulo *in vitro* por tPA/M5**

Los efectos fibrinolíticos y fibrinogenolíticos de combinaciones específicas de tPA y M5 se estudiaron *in vitro* en un medio de plasma humano.

#### Materiales

La mproUK que comprende una sustitución de histidina en el lugar de la lisina en la posición del aminoácido 300 (Lys300→His) de prourocinasa (M5) se preparó a partir de *E. coli* por PxTherapeutics (Grenoble, Francia). El activador del plasminógeno tisular (tPA) se obtuvo de Genentech (South San Francisco, CA). El fibrinógeno humano, Kabi clase L, se obtuvo de Chromogenix, Milán, Italia. La aprotinina y el isotiocianato de fluoresceína fueron de Sigma Chemicals, St. Louis, MO. La trombina (ThromboMax, 100 U de NIH por ml) se obtuvo de Sigma (St Louis, MO). El inhibidor de

C1 de calidad clínica se obtuvo de CSL Behring, Marburg, Alemania. Se usó plasma del banco de sangre actualizado humano, combinado de cuatro donantes, en los experimentos.

Obsérvese que diversos modelos animales tienen diferentes sensibilidades a proUK humana (véase, por ejemplo, la tabla 1 en Gurewich et al., J. Clin. Invest., 73:1731-1739 (1984)). Por tanto, las dosificaciones en animales no pueden usarse para determinar las dosificaciones en seres humanos, y las dosificaciones descritas en esta ocasión se basan en la experiencia usando los componentes individuales en ensayos en seres humanos. Los estudios *in vitro* en plasma humano muestran que se necesita dos veces la cantidad de M5 respecto a proUK para la misma tasa de lisis. La dosis de monoterapia de proUK/M5 es conocida de estudios en fase 3 y la minidosis de tPA recién descubierta más la dosis baja de M5 en los métodos de tratamiento de combinación descritos en este documento se basan en este factor 2x.

#### Experimentos de lisis del coágulo sanguíneo

Se estudió la fibrinólisis por M5 en un medio de plasma que contiene inhibidor. Se prepararon coágulos sanguíneos por recalcificación de 0,2 ml de plasma de banco de sangre combinado con 35 mM de calcio en presencia de una cantidad mínima de tromboplastina y un fibrinógeno fluoresceinado (véase Dmitry V, J Biol Chem, 1996; 271: 2133-2138). Los coágulos sanguíneos entonces se incubaron durante una hora a 37 °C, seguido de incubación durante una noche a temperatura ambiente. El siguiente día, los coágulos sanguíneos se colocaron en 2 ml de plasma del banco de sangre, seguido de adición de tPA, M5 o la combinación de tPA y M5. La lisis del coágulo se controló tomando muestras de 50 µl del plasma en determinados puntos temporales y midiendo la emisión de fluorescencia. La emisión y fluorescencia en la muestra representa la cantidad de productos de degradación de fibrina liberados de los coágulos sanguíneos. En algunos experimentos, el volumen de plasma se aumentó hasta 5 ml, y se añadió fibrinógeno no marcado hasta compensar la dilución del fibrinógeno fluoresceinado. En esos experimentos, el final de la lisis del coágulo sanguíneo se determinó visualmente.

Cada experimento de lisis del coágulo sanguíneo se realizó por triplicado. Se usó Graph Pad Prim para preparar gráficos y realizar análisis estadísticos.

Las curvas de lisis se representaron como un porcentaje de lisis de los coágulos sanguíneos a lo largo del tiempo. El punto del 100 % se obtuvo de la media de las lecturas máximas. La lectura de la línea basal se obtuvo al inicio restando la cantidad de fluorescencia mostrada por el plasma (~15 % de la señal completa) para obtener el punto cero. El tiempo hasta el 50 % de lisis para cada condición experimental se determinó a partir del gráfico de lisis y se usó como el criterio de valoración principal.

#### Determinación de fibrinógeno restante después de lisis del coágulo sanguíneo

Después de completarse la lisis del coágulo sanguíneo, se obtuvo una muestra de plasma final (1,0 ml) para determinar el fibrinógeno restante. Se añadió aprotinina (200 KIU/ml) a la muestra para evitar proteólisis adicional. El fibrinógeno restante se registró como el porcentaje del fibrinógeno en la medida inicial (BL).

El fibrinógeno se midió como una proteína coagulable por trombina. Después de la dilución de la muestra de plasma con una cantidad igual de solución salina tamponada con fosfato, se añadieron 200 µl de trombina (1000 unidades de NIH/ml de solución). La solución se mezcló suavemente y se incubó durante una hora a 37 °C, seguido de incubación durante una noche a temperatura ambiente. La siguiente mañana, cada coágulo sanguíneo se enrolló en una punta de pipeta de transferencia de plástico de eje largo y delgado, a la que se adhirió el gel, y el contenido de suero se expresó por la presión contra la pared del tubo de ensayo y después contra un papel absorbente. La fibrina blanca sobre el tallo de la pipeta entonces se colocó en al menos 5 ml de solución salina durante al menos una hora para permitir la difusión de cualquier proteína sérica restante. La fibrina entonces se desprendió de la punta y se colocó en 1 ml NaOH al 5 %, se hirvió durante un minuto, y después se mantuvo a temperatura ambiente hasta que toda la fibrina hubo quedado en solución. La proteína en la solución se midió espectrofotométricamente a 280 nm.

#### Determinación del tiempo más corto hasta la lisis por tPA o M5 en solitario

Se realizaron experimentos de lisis del coágulo sanguíneo como se describe anteriormente en presencia de 1, 2 o 3 µg/ml de tPA. Las curvas de lisis se representaron como un porcentaje de lisis de los coágulos sanguíneos a lo largo del tiempo, y el tiempo usado hasta lisis el 50 % de los coágulos sanguíneos para cada condición experimental se determinó a partir de la curva de lisis. El tiempo más corto hasta la lisis (del que puede determinarse la tasa de lisis máxima del coágulo) se definió como el tiempo en que no hay más reducción dependiendo de la dosis del tiempo de lisis. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la fig. 1A y el tiempo más corto usado para lisis el 50 % de los coágulos sanguíneos por tPA, se descubrió que era de 60 minutos cuando se usaban 3 µg/ml de tPA. Por tanto, la tasa de lisis máxima del coágulo es el 50 % de lisis en una hora.

La fig. 1B muestra el porcentaje del fibrinógeno restante del nivel basal al final de la lisis para cada dosis de tPA ensayada, que varía de un 19 % a un 45 %. Por tanto, el tPA en solitario causaba un 55%-81 % de degradación del fibrinógeno.

Para M5, se realizaron los experimentos de lisis del coágulo sanguíneo como se describe anteriormente en presencia de 10, 12,5 y 15 µg/ml de M5. El tiempo más corto usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por M5 se determinó en 50 minutos, cuando se usaron 15 µg/ml de mproUK (fig. 2A). Por tanto, la tasa de lisis máxima del coágulo es del 50 % de lisis del coágulo en 50 minutos.

El porcentaje del fibrinógeno restante del nivel basal al final de la lisis para cada dosis de M5, que varía de un 25 % a un 55 %, se muestra en la fig. 2B. Por tanto, M5 en solitario causaba un 45 %-75 % de degradación del fibrinógeno.

Efecto del inhibidor de C1 sobre la fibrinogenólisis por M5

Para evitar la fibrinogenólisis, se añadió 750 µg/ml de inhibidor de C1 al plasma antes de la adición de 10, 12,5 y 15 µg/ml de M5 en los experimentos de lisis del coágulo. La presencia de 750 µg/ml de inhibidor de C1 no afecta al tiempo usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por M5, que aún era de 50 minutos (fig. 2C). Sin embargo, como se muestra en la fig. 2D, se producía poca degradación de fibrinógeno en presencia de inhibidor de C1.

El experimento del inhibidor de C1 no se repitió para tPA, ya que el inhibidor de C1 ya ha demostrado inhibir la lisis del coágulo sanguíneo por tPA (Tomasi S, PLoS One., 2011; 6: e21999).

Tasa de lisis máxima del coágulo por una combinación de minidosis de tPA y dosis baja de M5

Para determinar la dosis más baja de tPA y M5 que se necesita para conseguir el tiempo de lisis más corto (y la tasa de lisis máxima del coágulo) cuando se usan en combinación, los experimentos de lisis del coágulo sanguíneo se realizaron usando diversas combinaciones y relaciones de tPA y M5. Las dosis más bajas de tPA y mproUK cuando se usaban en combinación para conseguir de forma constante la tasa de lisis máxima del coágulo, se determinaron en 0,2 µg/ml de tPA y 6 µg/ml de M5. Estas dosis correspondían a un 6 % de la dosis de tPA necesaria para conseguir el tiempo de lisis más corto más un 40 % de la dosis de M5 necesaria para conseguir que cuando se usaban en solitario en monoterapia. La fig. 3 muestra los resultados de un experimento de lisis del coágulo representativo, donde el tiempo usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por una combinación de 0,2 µg/ml de tPA y 6 µg/ml de M5 fue de 53 minutos, mientras que el tiempo usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por 6 µg/ml de M5 en solitario fue de 135 minutos y el tiempo usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por 0,2 µg/ml de tPA en solitario fue de 225 minutos. Estos resultados demuestran que una dosis pequeña de tPA, por ejemplo, 0,2 µg/ml, acortaba enormemente el tiempo de lisis del coágulo por M5. Esta observación es coherente con la función de tPA en el inicio de la fibrinólisis.

Los resultados de diez experimentos de lisis del coágulo representativos se muestran en la fig. 4A, usando la combinación (0,2 µg/ml de tPA + 6 µg/ml de M5) (círculo), que inducía un tiempo promedio de lisis del 50 % de aproximadamente 75 minutos. A esta dosis de M5 en solitario (triángulo), el tiempo de lisis fue de 135 minutos, y tPA en solitario (cuadrado) indujo un tiempo de lisis de 225 minutos. Los hallazgos muestran que una minidosis de tPA causaba aproximadamente un 45 % de acortamiento del inicio de la lisis por M5. La fig. 4B muestra los fibrinógenos plasmáticos al final de la lisis, expresados como el porcentaje del fibrinógeno en la medida inicial (BL). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Para ensayar si la función de tPA en la combinación se limita al inicio de la fibrinólisis, se realizaron experimentos de lisis del coágulo sanguíneo usando cuatro combinaciones de tPA-M5. Cada combinación de tPA-M5 incluye una dosis fija de 6 µg/ml de M5 y una dosis de tPA diferente seleccionada de 0,2, 0,6, 1,0 y 3,0 µg/ml. El tiempo usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos es de aproximadamente 48-60 minutos para las cuatro combinaciones ensayadas y una dosis de tPA mayor de 0,2 µg/ml no acorta más el tiempo necesario para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos (fig. 6). Estos hallazgos son coherentes con la función de tPA en la combinación que es esencial para el inicio de la fibrinólisis, pero no contribuye a la fibrinólisis más allá del inicio.

El tiempo promedio usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos *in vitro*, de los múltiples experimentos de coágulos sanguíneos se tabularon y se compararon. La fig. 7 muestra que el tiempo medio usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por la combinación de 0,2 µg/ml de tPA más 6 µg/ml de M5 fue de 48 (± 2,5) minutos (n = 10); el tiempo usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por 0,2 µg/ml de tPA en solitario fue de 156 (± 5,3) minutos (n = 5); para 6 µg/ml de M5 en solitario, fue de 118 (± 7,2) minutos (n = 7); para 15 µg/ml de M5 en solitario fue de 48 (± 1,6) minutos (n = 9); y para 3 µg/ml de tPA en solitario fue de 55 (± 5) minutos (n = 6). El tiempo usado para lisar el 50 % de los coágulos sanguíneos por una combinación de 0,2 µg/ml de tPA más 6 µg/ml de M5 es significativamente menor que la monoterapia de 0,2 µg/ml de tPA en solitario o de 6 µg/ml de M5 en solitario (fig. 7). Aunque tPA y mproUK en solitario pueden conseguir un tiempo de lisis del coágulo similar a dosis muy altas, por ejemplo, tPA a 3 µg/ml o M5 a 15 µg/ml (fig. 7), puede producirse activación no específica del plasminógeno a esas dosis y causar efectos secundarios de tipo hemofílico.

Efecto del volumen y el inhibidor de C1 sobre la fibrinogenólisis por la combinación de tPA y M5

Durante la fibrinólisis, se activa mproUK por plasmina y se convierte en mUK, que entonces puede difundir al plasma. Confinar la proteólisis al coágulo llega a ser una función de los inhibidores plasmáticos, por ejemplo, inhibidor de C1.

En un tubo de ensayo, el volumen limitado del plasma *in vitro* con respecto al volumen *in vivo* puede influir. Por lo tanto, se realizaron experimentos de lisis del coágulo en tres condiciones: (1) un volumen de plasma de control de 2 ml, (2) un volumen de plasma aumentado de 5 ml y (3) 2 ml de plasma con 500 µg/ml de inhibidor de C1. Se usaron coágulos sanguíneos no marcados para estos experimentos y se determinó el tiempo usado para lisar el 100 % de los coágulos sanguíneos en 75-80 minutos en las tres condiciones ensayadas. En el volumen de plasma de 2 ml convencional, la combinación de tPA-M5 degradó el 70 % del fibrinógeno, lo que refleja la rápida tasa de generación de tcM5 por plasmina (fig. 8). Cuando se añadía inhibidor de C1, se reducía la fibrinogenólisis al 45 %, con un 55 % de fibrinógeno restante (fig. 8). Se observó un efecto similar en el volumen de plasma de 5 ml, que probablemente refleja la dilución de tcM5 en el entorno inmediato del coágulo (fig. 8). Este efecto del volumen sugiere que la fibrinogenólisis por la combinación de tPA-M5 puede atenuarse adicionalmente *in vivo* cuando la relación de volumen de plasma a coágulo es considerablemente mayor.

El efecto más moderado del inhibidor de C1 en comparación con la fig. 2D, está relacionado con la generación de plasmina dependiente de fibrina más rápida inducida por la combinación de tPA-M5 en comparación con monoterapia con M5. Se ha verificado por estudios adicionales que la capacidad del inhibidor de C1 de inhibir la fibrinogenólisis por la combinación de tPA-M5 se reduce en comparación con su capacidad de inhibir la fibrinogenólisis por M5 en solitario. El inhibidor de C1 es un inhibidor relativamente lento y, por tanto, tiene menos capacidad de inactivar la tcM5 generada más rápidamente de la fibrinólisis más rápida conseguida por la combinación de tPA-M5. Podría necesitarse una concentración mayor de inhibidor de C1 para inactivar suficientemente la tcM5 generada de la combinación de tPA-M5.

Los resultados de experimentos de lisis del coágulo representativos se muestran en la fig. 5A, usando la combinación (0,2 µg/ml de tPA + 6 µg/ml de M5) (círculo) además de inhibidor de C1. El inhibidor de C1 (750 µg/ml) se añadió 30 minutos después de la adición de los activadores. Como se muestra en la fig. 5A, esto no inhibió la lisis (círculos), que de promedio se acortó hasta aproximadamente 30 minutos, pero inhibió la lisis por tPA en solitario (cuadrados). La fig. 5B muestra los fibrinógenos plasmáticos al final de la lisis, expresados como el porcentaje del fibrinógeno en la medida inicial (BL). Como se muestra en la fig. 5B, el inhibidor de C1 atenuó la fibrinogenólisis. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Fibrinogenólisis por la combinación de tPA-M5 en ausencia de un coágulo

Para ensayar la eficacia de la combinación de tPA-M5 sobre la fibrinogenólisis en ausencia de un coágulo sanguíneo, la combinación de 0,2 µg/ml de tPA más 6 µg/ml de M5 se incubó con plasma a 37°C y se recogieron muestra para la determinación del fibrinógeno después de 2-5 horas. Como se muestra en la fig. 9, no hubo fibrinogenólisis durante al menos 3 horas, mucho más allá de la duración de la trombólisis terapéutica. Estos hallazgos indican que la generación de plasmina inducida por la combinación de tPA-M5 era dependiente de fibrina y que, en ausencia de un coágulo sanguíneo, esta combinación fibrinolítica no induce activación del plasminógeno.

### Ejemplo 2. Trombólisis *in vivo* por una combinación de tPA y M5

Se anestesian perros mestizos macho que pesaban 10-15 kg con pentobarbital de sodio y se mantienen respirando aire ambiental. Se forman coágulos sanguíneos a partir de 1 ml de sangre completa natural de perro como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.074.401, a la que se añade fibrinógeno radiomarcado (1,9 µCi, 0,75 mCi/mg de proteína) y trombina (10 unidades). Después de 20 minutos, los coágulos se lavan con solución salina tres veces y después se cortan en pequeños (aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>) trozos y se inyectan a través de una aguja de calibre 16 en la vena femoral. Después de 15 minutos, se obtiene una muestra de sangre desde una cánula en la vena femoral contralateral para la medición de la radioactividad basal.

Los perros se dividen en cuatro grupos y se les inyecta (1) solución salina, (2) una inyección intravenosa rápida de 2-5 mg de tPA, (3) infusión intravenosa de M5 (20 µg/ml) durante 60 minutos o (4) una inyección intravenosa rápida de 2-5 mg de tPA seguido de infusión intravenosa de M5 (20 µg/ml) durante 60 minutos. A intervalos durante las infusiones, se obtuvieron muestras de sangre y se midieron para la radioactividad y el fibrinógeno. El tiempo usado para lisar los coágulos sanguíneos se determina y se compara entre los cuatro grupos.

### Ejemplo 3. Caracterización del inhibidor de C1 y M5 en un modelo de rata de hemorragia intracerebral (ICH)

El propósito de este estudio fue investigar el efecto de M5 sobre el volumen de hemorragia intracerebral (ICH).

Se usaron veinte ratas Sprage-Dawley macho adultas para el estudio. Las ratas se seleccionaron aleatoriamente para su uso en los días quirúrgicos. A las ratas se le dio un número de identificación único marcándoles la cola. Inmediatamente antes del inicio de la cirugía, se les administró inyección intraperitoneal de cefazolina de sodio (40 mg/kg; Hospira 101C049) y buprenorfina subcutánea (1 mg/kg; Reckitt Benckiser, 219202) a los animales. Mientras las ratas estaban con anestesia con isoflurano (de un 1,5 % a un 2 %) con respiración espontánea en una mezcla de óxido nítrico/oxígeno (2:1), se perforó un pequeño orificio de trepanación y se hizo descender lentamente una aguja de microinyección de 10 microlitros de calibre 30 (Hamilton, serie 700) en el estriado derecho en las siguientes coordenadas desde la bregma: 0,0 mm anterior, 3 mm lateral y 6 mm de profundidad. Durante un período

de 3 minutos, se inyectaron 3 microlitros de solución salina que contenía 0,45 U de colagenasa VII-S (Sigma, St. Louis, MO). La aguja se dejó en su sitio durante 2 minutos y después se retiró lentamente durante 5 minutos. Después de ello, cuero cabelludo se cerró con grapas y se permitió que las ratas se recuperaran. El procedimiento quirúrgico completo duró aproximadamente 20 minutos para cada rata. Se usó una almohadilla de calentamiento ( $37 \pm 1$  °C) para mantener la temperatura corporal de los animales.

El inhibidor de C1 y el artículo de ensayo (M5) se formularon antes de la dosificación. Las soluciones de ensayo se mantuvieron en hielo durante el uso diario. Las soluciones no usadas restantes se mantuvieron a -20 °C. Inmediatamente después de una inyección intravenosa rápida a 4 ml/kg (IV), a los animales se les dosificó por infusión intravenosa (durante 30 minutos), empezando a los 15 minutos después de ICH a 4 ml/kg. A las 2 horas después de empezar la infusión, se sacrificó a los animales por inhalación de N<sub>2</sub>O al 100 % con isoflurano. Se extrajeron los cerebros y se realizaron cortes seriados de acuerdo con una matriz de cerebro de rata de 2 mm. En condiciones normalizadas, se tomaron imágenes de los cortes seriados de cerebro con una cámara digital. Se calculó el tamaño del hematoma por el programa informático ImageJ (disponible en línea en [rsb.info.nih.gov/ij](http://rsb.info.nih.gov/ij)).

Dos horas después de la inducción de la hemorragia, se sacrificó a las ratas con anestesia profunda con isoflurano (5 %) (N<sub>2</sub>O al 100 %). Se retiraron los cerebros y se colaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en hielo. Los cerebros se trocearon en 7 cortes seriados de 2 mm cada uno y se fotografiaron para una evaluación visual del hematoma. No se realizó evaluación histológica sobre las secciones individuales. Se determinó el contenido de hemoglobina como una medición cuantitativa del volumen hemorrágico. El lado con hemorragia (incluyendo las 7 secciones) se aisló del lado normal y se colocó en 1,5 ml de PBS frío. Después de 30 segundos de homogeneización (manualmente con un Polytron PT2100), se aplicaron ultrasonidos durante 1 minuto para lisar las membranas eritrocíticas. Después de centrifugación durante 30 minutos (13000 rpm, 4 °C), se añadieron 200 µl de sobrenadante a 800 µl de reactivo Drabkins (Sigma, St. Louis, MO) y se dejó en agitación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Con el uso de un fotómetro, se determinaron las tasas de absorción a 540 nm, y se calcularon los volúmenes de sangre hemorrágica para la mitad lesionada del cerebro basándose en una curva patrón. La curva patrón se generó usando ocho hemisferios cerebrales sin tratamiento previo de edad y peso coincidentes (para el sujeto promedio del estudio). A estos hemisferios cerebrales sin tratamiento previo se les añadió sangre combinada de los mismos individuos a volúmenes crecientes de 0 a 192 µl. Se evaluó la significación estadística por análisis de la varianza (ANOVA).

El momento en que se midió el tamaño de la hemorragia (2 horas después de la inducción de la hemorragia) se determinó del trabajo previo optimizado en Biotrofix.

Se dosificó a las ratas como se describe con una inyección intravenosa rápida de vehículo (solución salina) (4 ml/kg) seguida inmediatamente de una infusión de 30 minutos de vehículo, o una inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1 (200 U/4 ml/kg) seguida inmediatamente de una infusión de 30 minutos de M5 (10 mg/4 ml/kg) a los quince minutos después de ICH.

#### Observaciones clínicas y supervivencia

Todos los animales sobrevivieron al periodo de estudio para este estudio. El animal n.º 24 no se incluyó para el análisis ya que no se había inducido insuficiente hemorragia en este animal para incluirlo.

#### Determinación histológica del volumen de hemorragia

La M5 (inmediatamente) después de una inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1 se estudió en un modelo de rata de ICH. En este modelo, se indujo una hemorragia intracerebral por inyección de colagenasa en el estriado derecho del cerebro. Quince minutos después de la lesión, se administró M5 (a una dosis de 10 mg/4 ml/kg) o vehículo por una infusión intravenosa de 30 minutos inmediatamente después de inyecciones intravenosas rápidas como se describe anteriormente. No se determinó diferencia significativa ( $p = 0,6899$ ) entre los animales a los que se dosificó inhibidor de C1/M5 y a los que se dosificó solución salina/solución salina (figura 1).

#### Volumen de hematoma directo

Como con la determinación histológica para el volumen de hemorragia, no se determinó diferencia significativa ( $p = 0,5194$ ) entre los animales a los que se dosificó inhibidor de C1/M5 y a los que se dosificó solución salina/solución salina (fig. 10A y 10B). La fig. 10A es un gráfico de barras que muestra el volumen de hematoma después de hemorragia intracerebral en un modelo de rata. La hemorragia intracerebral se indujo por inyección estereotáctica de colagenasa. A las ratas se les dosificó a los 15 minutos después de la lesión una inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1 seguida inmediatamente de una infusión de 30 minutos de M5 (a una dosis de 10 mg/4 ml/kg). El volumen del hematoma se midió por el contenido de hemoglobina a las 2 horas después de la dosificación. No se determinó diferencia significativa ( $p = 0,5194$ ) entre los animales a los que se dosificó inhibidor de C1/M5 y a los que se dosificó solución salina/solución salina.

La fig. 10B es un gráfico de barras que muestra la determinación histológica del volumen de hemorragia después de

hemorragia intracerebral en un modelo de rata. La hemorragia intracerebral se indujo por inyección estereotáctica de colagenasa. A las ratas se les dosificó a los 15 minutos después de la lesión una inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1 seguida inmediatamente de una infusión de 30 minutos de M5 (a una dosis de 10 mg/4 ml/kg). No se determinó diferencia significativa ( $p = 0,6899$ ) en el volumen de hemorragia entre los animales a los que se dosificó inhibidor de C1/M5 y a los que se dosificó solución salina/solución salina.

En este modelo de rata de hemorragia intracerebral inducida por colagenasa, la administración de inhibidor de C1/M5 administrada 15 minutos después de la inducción de ICH, no difería en el volumen de hematoma o el tamaño de la hemorragia con respecto a los animales tratados con solución salina/solución salina. Por tanto, M5 no indujo o aumentó la hemorragia en este modelo de apoplejía y, por tanto, debe ser seguro para su uso en eventos hemorrágicos tales como apoplejía hemorrágica.

#### Ejemplo 4. Ensayo clínico de una combinación de tPA y M5

Sujetos hombre sanos, con edades entre 18 y 35 años inclusive, y con un peso corporal de al menos 60 kg y un índice de masa corporal (IMC) entre 18,5 y 25 kg/m<sup>2</sup> inclusive, se incluyeron en el ensayo clínico. Los sujetos tienen niveles endógenos normales de inhibidor de C1,  $\alpha$ 2-antiplasmina y fibrinógeno, una serología negativa para VIH, AgHBs y VHC, y un ensayo negativo para alcohol y drogas en la selección y en el día 1 del estudio. Los sujetos no pueden tener anomalías clínicamente significativas.

Un sujeto no se incluye si cumple uno o más de los siguientes criterios: (1) el sujeto tiene una enfermedad o afección hereditaria, congénita o adquirida conocida o sospechosa que afecte a las rutas hemostáticas o de coagulación o que esté asociada con una tendencia amentada a hemorragia; (2) el sujeto tiene una posibilidad razonable de desarrollar un evento hemorrágico clínicamente significativo o un evento hemorrágico que pueda seguir indetectado durante una cantidad considerable de tiempo durante el estudio, por ejemplo, el sujeto (a) ha experimentado cirugía mayor (interna) o traumatismo en los últimos tres meses del día de dosificación previsto, (b) tiene una malformación vascular intestinal o cerebral o (c) ha participado en deportes de contacto de elevado impacto, tal como kick boxing, en las dos previas al día de dosificación previsto; (3) el sujeto ha recibido algún fármaco o sustancia absorbido de forma sistémica (incluyendo remedios por prescripción, de venta libre o alternativos) que no están permitidos por este protocolo antes de la dosificación sin experimentar un periodo de eliminación de al menos siete veces la semivida de eliminación del producto; (4) el sujeto ha fumado tabaco de cualquier forma en los tres meses previos a la dosificación o ha fumado en algún momento más de cinco cigarrillos por día (o equivalente) de promedio; (5) el sujeto ha recibido derivados sanguíneos o plasmáticos en el año anterior al día de la administración; (6) el sujeto ha perdido sangre o plasma fuera de los límites del servicio de donación de sangre local (i.c. Sanquin) tres meses antes de la dosificación; (7) el sujeto tiene hipersensibilidad conocida a cualquiera de los materiales o compuestos relacionados de la investigación; (8) el sujeto tiene un historial de hipersensibilidad grave o de alergia con reacciones graves; (9) el sujeto tiene un historial de abuso de sustancias, incluyendo caféina, tabaco y alcohol; (10) el sujeto tiene una afección o demuestra una actitud que en opinión del investigador podría comprometer la salud o bienestar del sujeto, o la integridad científica de los resultados del estudio; (11) el sujeto está mental o legalmente incapacitado para proporcionar un consentimiento informado.

Los sujetos incluidos se asignan aleatoriamente a uno de los siguientes brazos de tratamiento:

- (1) Inyección intravenosa rápida de 2,5 mg de tPA seguida de infusión intravenosa de una mproUK, por ejemplo, M5, durante 60-90 minutos a aproximadamente 80 mg/hora (50 % de la dosis de monoterapia);
- (2) Inyección intravenosa rápida de 2,5 mg de tPA seguida de infusión intravenosa de un placebo durante 60-90 minutos;
- (3) Inyección intravenosa rápida de un placebo seguida de infusión intravenosa de una mproUK, por ejemplo, M5, durante 60-90 minutos a aproximadamente 160 mg/hora; o
- (4) Inyección intravenosa rápida de 2,5 mg de tPA seguida de una inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1 (Berinert®) (por ejemplo, 1000 EU (2 viales)) e infusión intravenosa de una mproUK, por ejemplo, M5, durante 60-90 minutos a aproximadamente 80 mg/hora (50 % de la dosis de monoterapia).

La dosis para una mproUK varía de 60-120 mg/hora. La inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1 consiste en 25-100 U/kg de Berinert® (basada en el peso corporal del sujeto). Este estudio finaliza cuando se produce plasminemia o cuando se han reunido suficientes datos.

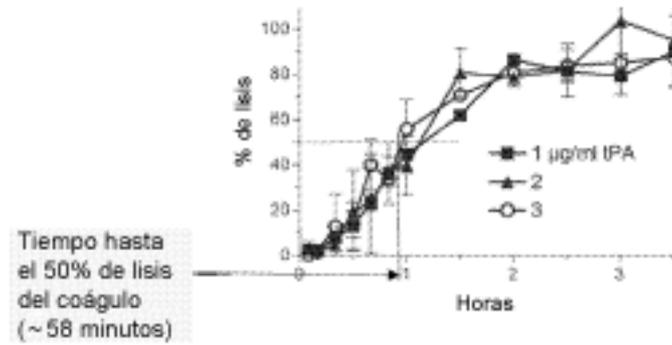
Basándose en los datos reunidos de este estudio, se evalúa la seguridad y tolerabilidad global de la combinación de tPA y mproUK tal como M5. Se evalúa el efecto de una minidosis de tPA sobre los cambios de coagulación inducidos por mproUK. Se evalúa el efecto de una sola dosis de inhibidor de C1 sobre la seguridad y tolerabilidad globales de la combinación de tPA-mproUK y su efecto sobre los cambios de coagulación inducidos por tPA-mproUK.

## REIVINDICACIONES

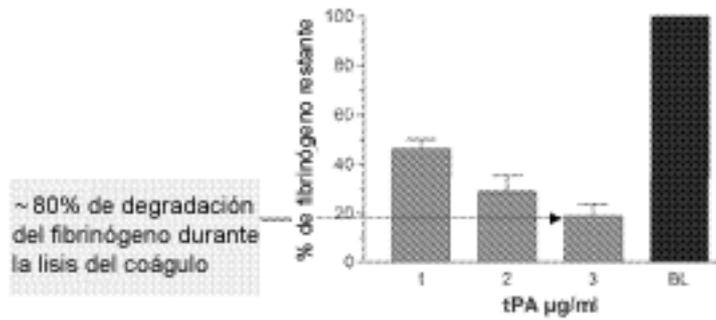
1. Una composición para su uso en el tratamiento de un sujeto con síntomas de apoplejía o infarto de miocardio agudo (AMI) a una tasa máxima de lisis del coágulo y con efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos, comprendiendo la composición:
- una primera composición que comprende menos de 5 mg de activador del plasminógeno tisular (tPA), en la que la primera composición es o se prepara para administrarse a un sujeto en una pauta posológica de una inyección intravenosa rápida que comprende de 2 a 4,5 mg de tPA; y
- una segunda composición que comprende un mutante de prourocinasa (mproUK) que comprende una sustitución de histidina en el lugar de la lisina en la posición del aminoácido 300 (Lys300→His) de prourocinasa, en la que la segunda composición es o se prepara para administrarse a un sujeto por infusión intravenosa en una pauta posológica de 60 a 120 mg/hora durante de 60 a 90 minutos después de la administración de la primera composición;
- en la que el sujeto se identifica como uno que posiblemente ha tenido una apoplejía o AMI observando uno o más síntomas de apoplejía o AMI sin determinar la causa de la apoplejía antes de administrar la primera composición; y
- en la que se consigue una tasa de lisis máxima del coágulo con efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos.
2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene síntomas de una apoplejía.
3. La composición para su uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que los efectos secundarios hemorrágicos asociados mínimos se determinan como un nivel de degradación de fibrinógeno en la sangre del sujeto de menos de aproximadamente un 30 por ciento.
4. La composición para su uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la tasa de lisis máxima del coágulo se indica por haber conseguido una puntuación de 2 o mayor en trombólisis en infarto de miocardio (TIMI).
5. La composición para su uso de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la tasa de lisis máxima del coágulo se indica por haber conseguido una lisis de aproximadamente un 50 % de la masa de al menos un coágulo en el sujeto en 75 minutos.
6. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la inyección intravenosa rápida comprende de 2 a 4,0 mg de tPA, por ejemplo, en la que la inyección intravenosa rápida comprende 2 mg de tPA.
7. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la segunda composición se prepara para su administración como una infusión intravenosa a una tasa de 60-90 mg/hora de la mproUK durante 60 minutos,
- por ejemplo, en la que la segunda composición se prepara para su administración como una infusión intravenosa a una tasa de 60-80 mg/hora de la mproUK durante 60 minutos.
8. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una tercera composición que comprende una inyección intravenosa rápida de inhibidor de C1, por ejemplo, en la que la tercera composición comprende una inyección intravenosa rápida de 500-1500 mg de inhibidor de C1.
9. La composición para su uso de la reivindicación 8, en la que la primera composición y la segunda composición conjuntamente lisan los coágulos sanguíneos en presencia del inhibidor de C1 con menos de un 30 % de degradación del fibrinógeno en comparación con monoterapia por tPA o prourocinasa en solitario.
10. Un kit que comprende:
- una primera composición en un primer recipiente que comprende 2-5 mg de activador del plasminógeno tisular (tPA), formulado adecuadamente para su administración como una inyección intravenosa rápida; y
- una segunda composición en un segundo recipiente que comprende 60-120 mg de un mutante de prourocinasa (mproUK) que comprende una sustitución de histidina en el lugar de la lisina en la posición del aminoácido 300 (Lys300→His) de prourocinasa.
11. El kit de la reivindicación 10, en el que la segunda composición se formula adecuadamente para infusión intravenosa.
12. El kit de la reivindicación 10, que comprende además una tercera composición que comprende 500-1500 mg de inhibidor de C1.

13. El kit de la reivindicación 10, en el que la tercera composición se formula adecuadamente para administración como una inyección intravenosa rápida.

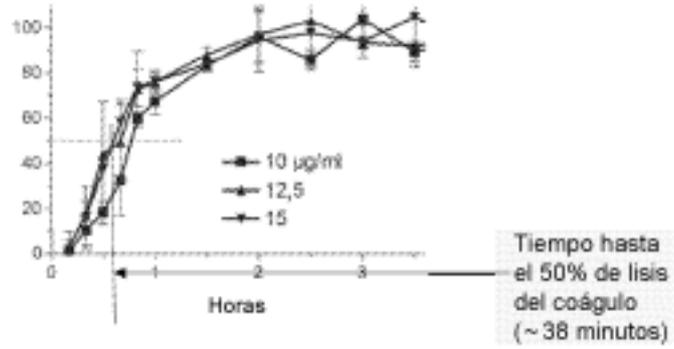
**FIG. 1A**



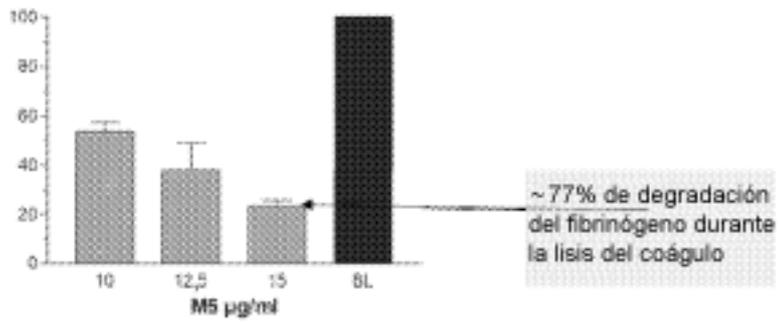
**FIG. 1B**



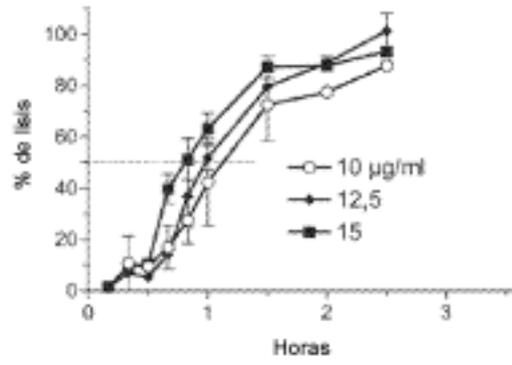
**FIG. 2A**



**FIG. 2B**



**FIG. 2C**



**FIG. 2D**

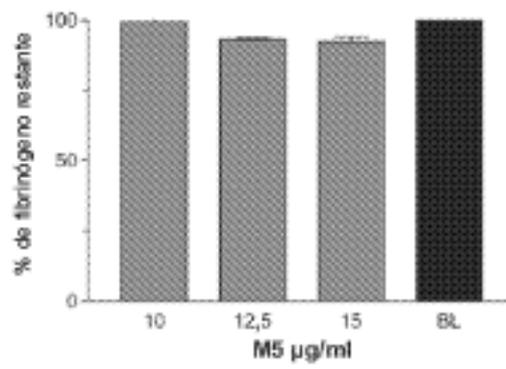
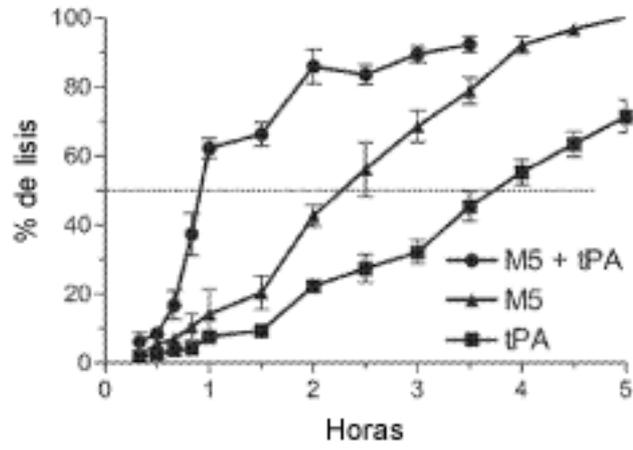
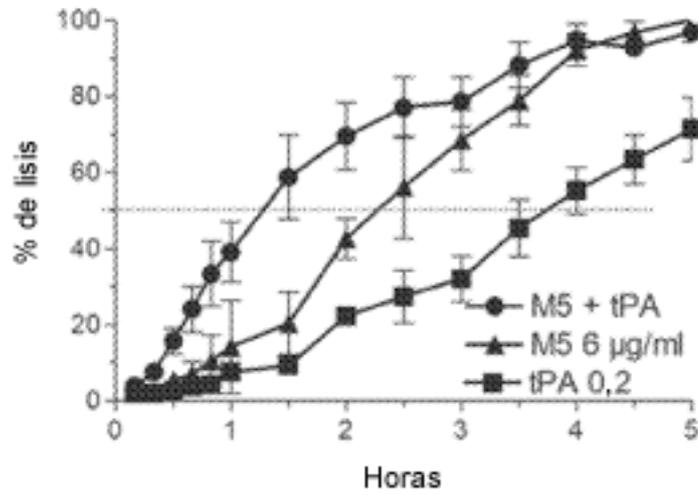


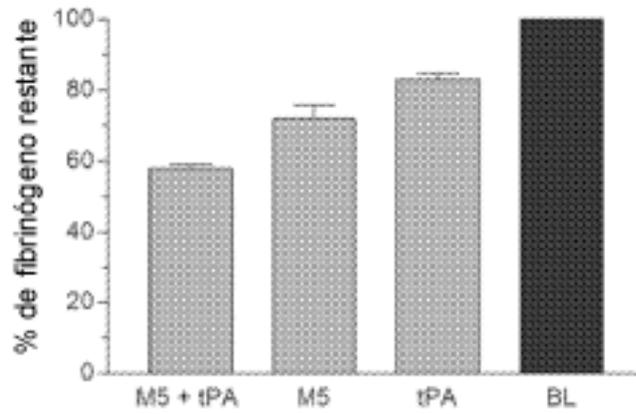
FIG. 3



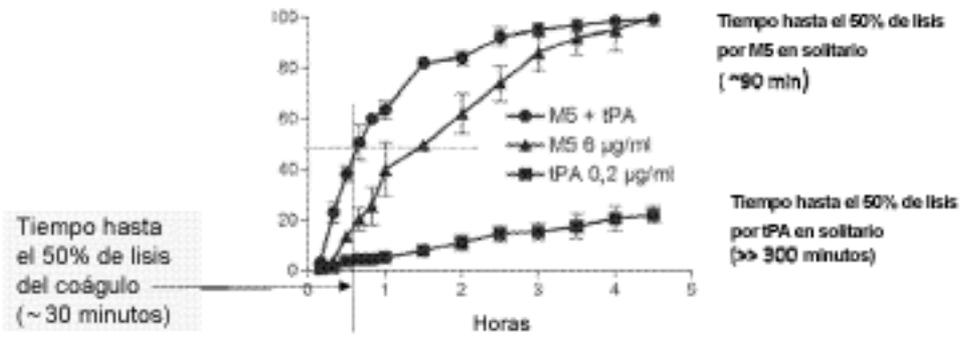
**FIG. 4A**



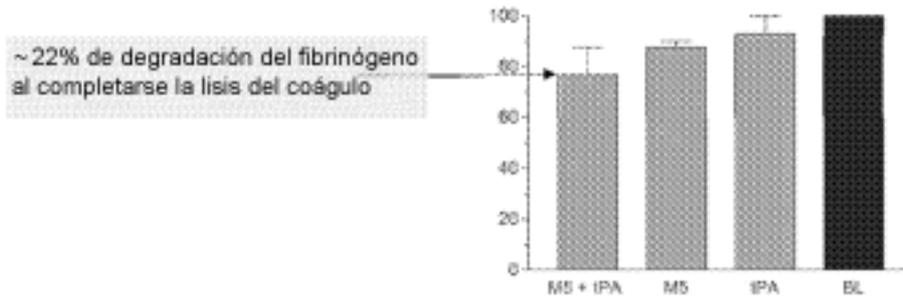
**FIG. 4B**



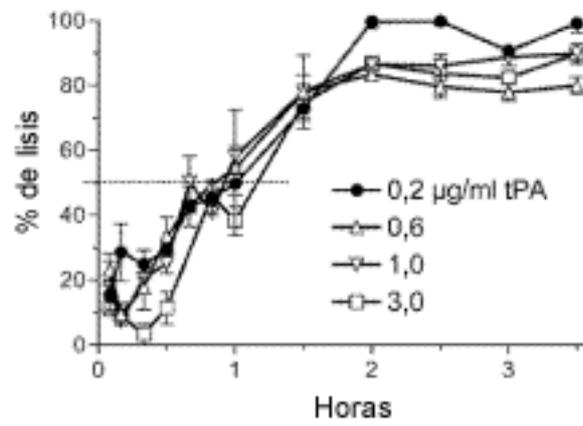
**FIG. 5A**



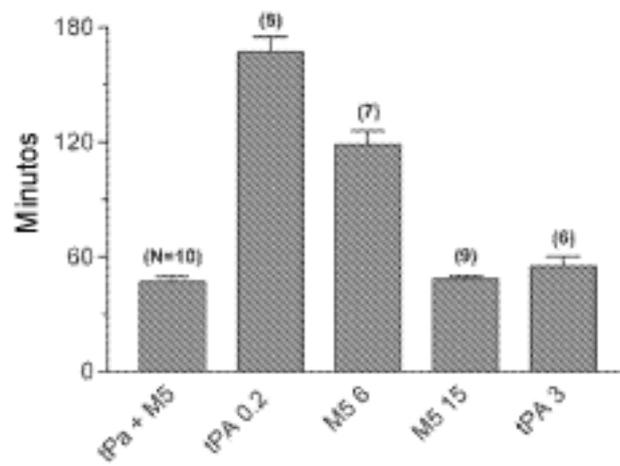
**FIG. 5B**



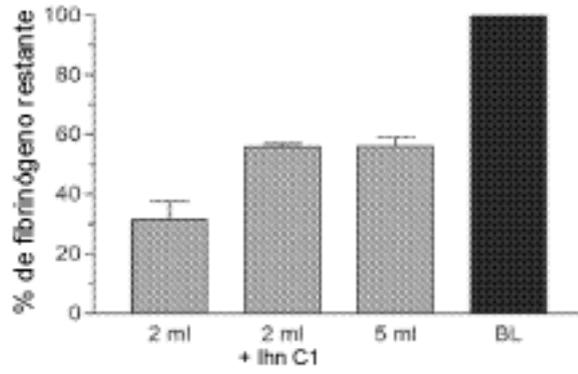
**FIG. 6**



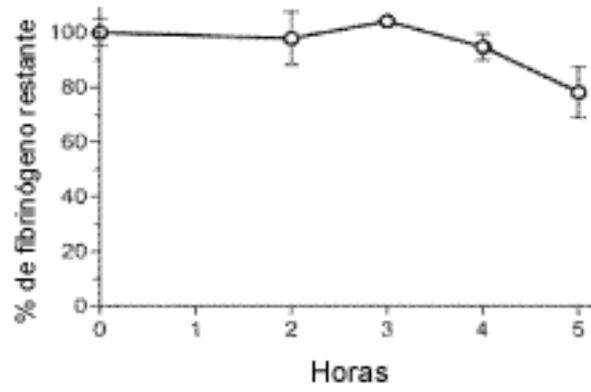
**FIG. 7**



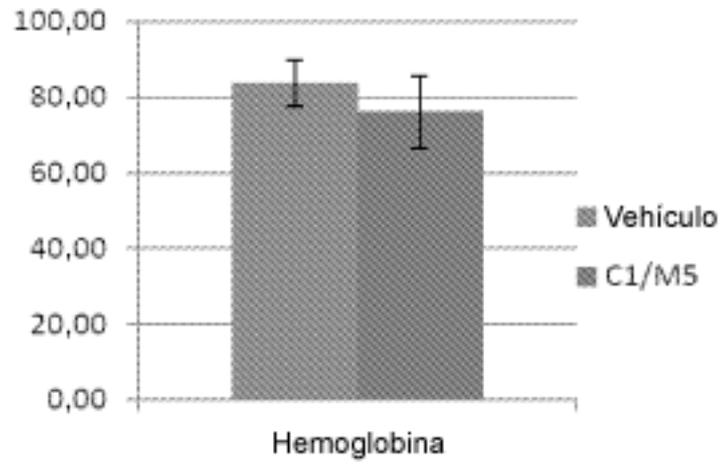
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10A**



**FIG. 10B**

