



Universidad
de Alcalá

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular.

cnic

Departamento de Aterotrombosis
e Imagen Cardiovascular.

Desarrollo de nuevos conjugados de activadores del plasminógeno con estreptavidina para la unión *in vivo* a eritrocitos: formación directa en circulación de agentes tromboproliféricos.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Óscar Armando Marcos Contreras
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Alcalá.

Director de la tesis:
Dr. J.C. Murciano Fernández

Madrid, 2011



Fundación para la Investigación Biomédica
del Hospital Universitario Ramón y Cajal

Unidad de Medicina Interna
Hospital Ramón y Cajal.
Cta. Colmenar Viejo, Km 9.1
28034. Madrid.
Teléfono: 91 336 84 86
juancarlos.murciano@salud.madrid.org

Juan Carlos Murciano Fernández, como Director de la presente Tesis Doctoral

INFORMA:

Que el trabajo titulado “*Desarrollo de nuevos conjugados de activadores del plasminógeno con estreptavidina para la unión in vivo a eritrocitos: formación directa en circulación de agentes trombotrópicos*” ha sido realizado, bajo su dirección, por **D. Óscar Armando Marcos Contreras**, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares y, a su juicio, cumple todos los requisitos científicos y legales para proceder a su defensa pública como Tesis Doctoral.

Madrid, a de abril de 2011



Universidad
de Alcalá

Facultad de Medicina.
Campus Universitario
28871 Alcalá de Henares
(Madrid)
Teléfono: 91 885 45 13
Fax: 91 885 45 85
depto.bioquimica@uah.es

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular

María José Carmena Sierra, Directora del Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que el trabajo titulado “*Desarrollo de nuevos conjugados de activadores del plasminógeno con estreptavidina para la unión in vivo a eritrocitos: formación directa en circulación de agentes tromboproliféricos*” ha sido realizado, en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Murciano Fernández, por **D. Óscar Armando Marcos Contreras** y, a su juicio, cumple todos los requisitos legales para proceder a su defensa pública como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a de abril de 2011.

**A mi familia.
A mis padres y hermano.
A Sonia.**

“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo progreso.”

Louis Pasteur (1822-1895).

“Toda verdad pasa por tres etapas: primero es ridiculizada, luego, violentamente rechazada, y, finalmente, aceptada como obvia”.

Arthur Shopenhauer (1788-1860).

“Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos. Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos.”

Niels Steensen (1638-1686).

Agradecimientos:

Por fin puedo escribir estas páginas de agradecimientos, que si bien podrían parecer las más sencillas, considero que son las más complejas. Su sencillez radica en el entusiasmo al escribirlas, si bien su complicación reside en no olvidar a ninguna de todas aquellas personas que han hecho este trabajo posible.

En primer lugar quería agradecer al Dr. JC. Murciano por haberme permitido realizar la Tesis en su laboratorio. También quiero agradecerlo a mi tutor el Dr. A. Herráez, con quien comencé en el laboratorio con una beca de colaboración del antiguo Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (2003-2004). A diferencia de otros tutores, Ángel nunca ha sido un tutor ajeno al trabajo que se realizaba en el laboratorio, mostrando siempre interés hacia el mismo, aportando nuevos e interesantes puntos de vista con una gran objetividad.

Para continuar, quiero hacer extensivos los agradecimientos al resto de profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, especialmente a Pilar, Cristina, Ana, José Carlos y al ya jubilado José Luque. También quiero agradecerlo a las dos Evas (Calviño y Galeano), quienes fueron unas excelentes compañeras mientras estuve rondando por los laboratorios del departamento. Por supuesto, tengo que darle las gracias a Angélica, quien domina con una eficiencia máxima todos los temas administrativos, con ella la burocracia parece sencilla.

Siguiendo un orden cronológico, debo agradecerlo a todo el personal docente que ha contribuido en mi formación, especialmente a todos aquellos profesores que despertaban inquietudes y me animaban a seguir aprendiendo, como Concha, Luis de Peña y Marín (I.E.S. Cervantes). Ya en la Facultad de Farmacia a aquellos que hacían atractiva su asignatura y explicaban procesos complejos simplificándolos para que los entendiésemos, como es el caso de los profesores: Javier (química inorgánica), M^a Carmen y Fidel (técnicas analíticas), Pilar y Ana (bioquímica), Montes (fisiología), Juan (genética y genética humana), Ángel y Luque (biología molecular e ingeniería genética), Carolina y Builla (heterociclos y química farmacéutica), Cecilio, Álamo, Zaragoza y Gago (farmacología), Maria (farmacognosia) y Manuel (galénica). Esta etapa habría sido imposible de superar sin la ayuda de mis compañeros Bego, Nuri, David, Sandra, Didi, Luor, Ana, Gema, ya que sin ellos todavía estaría en primero...gracias por todos esos momentos de prácticas, de tren, de cafetería, de viajes...

De la Facultad de Farmacia en Marsella (Francia) a los profesores Y. Barra y E. Seree, quienes me permitieron tener el primer contacto con un laboratorio de investigación, gracias por vuestra paciencia en explicarme cuando apenas hablaba francés. Así como al profesor Dignart-George, por permitirme hacer las prácticas de hematología para después examinarme en España.

Ese año fue muy especial gracias a la ayuda de Laura, Mamen, Charlotte, Magali, Luis, Isa, Fer, Xavi, Mikel, Alex, Raúl, Javi, Angelo, Zuzane, José y María.

Posteriormente tocaron las prácticas tuteladas, donde agradezco la formación que me dieron en el servicio de farmacia hospitalaria del Hospital Universitario Ramón y Cajal: Marta (unidosis), Pilar (nutrición parenteral), Miguel Ángel (PROSEREME) y Cova (R2 en aquel momento). Así como a Pablo Lapunzina, del Hospital Universitario La Paz, quién me enseñó aplicaciones básicas de biología molecular.

Si este trabajo tiene algo especial es la gente tan maravillosa que conoces y la rápida renovación que se produce de las personas que te rodean. Desde 2004 que entré en el laboratorio he recibido tanta ayuda de todos mis compañeros de laboratorio: protocolos, consejos e incluso me han cuidado las células durante las siempre cortas vacaciones, sin descuidar la amistad que me ha unido a ellos durante estos 7 años. Que difícil es empezar a enumerarlos... Lo haré por grupos empezando por el origen, aunque posteriormente se escindieran, y llevando la contraria a Tarín cuando íbamos a ir en coche a la Tesis de Inma: “Los pre delante y los post detrás”, empezaré por los “jefes”. Primero agradecérselo a las personas que fueron del grupo de Lisardo Bosca: Sonsoles y Alfonso, como ya se ha dicho en muchas ocasiones, “los jefes que todos hubiéramos deseado tener”, muchas gracias por vuestra ayuda y consejos como personas experimentadas (especialmente los de Alfonso y los niños). También he de agradecérselo a muchos miembros de sus grupos destacados por su excelente calidad humana: Paqui por tu alegría, la cual sembrabas por el laboratorio, sabiduría y espabilarnos cuando empezábamos, Rafa por pasarme protocolos de como hacer un gel de SDS-PAGE mientras tomábamos unas cervezas y como conseguir el visado para ir de estancia a EEUU (realmente es una odisea), a Raquel quién siempre ayudaba más de lo que uno mismo pudiera hacer, animándote siempre con una sonrisa, escuchándote y estudiando tu problema, a Gabi, por enseñarme tantos trucos de fotografía, compartir tus pensamientos con nosotros, hacernos reflexionar y por ayudarme con la portada. A la gente del grupo de Mercedes, Dani, quién siempre esta en el laboratorio con sus cientos de placas de ELISA, agradeciéndose su compañía cuando el laboratorio quedaba casi vacío, y a Tamas, quien con su humor particular siempre te arranca una sonrisa. A Vane (se rumorea que pipetea a dos manos) por su simpatía, Marta e Iván, por no dudar ni un momento en ayudarte y enseñarte como hacer un protocolo. A Gema por tus consejos nutricionales y apoyarme.

También quiero agradecérselo a lo que fue el grupo de Santiago Lamas: María, Carlos y Toño, por vuestros consejos y enseñanzas. A Inma y Sara, por la ilusión que transmitíais hacia la ciencia; Yoli, trabajadora incesante quien estableció una nueva medida del tiempo (Yoliminutos),

siempre pendiente del grupo, cuanto nos has enseñado y que poco hemos aprendido, sólo puedo darte las gracias... a Cris por ayudar en todo lo posible y más, incluso cediendo ratones teniendo que reorganizarse su trabajo. A Alberto por resolvernos tantas dudas veterinarias, sorprendernos siempre con su humor y conocimiento, prestándonos su apoyo en todo momento. A Nieves por su ayuda inmensurable desde enseñarte a diseñar un “primer” hasta buscar la información para resolverte una duda y a Brigitte por recordarme el francés. A Tania por dar una nota de alegría al laboratorio y a Conchi por ponerle música, a Tarín por ser una maravillosa persona siempre dispuesto a ayudar y aconsejar, siendo el organizador oficial de quedadas para tomar unas cañas, enseñándonos desde su perspectiva de becario experimentado. A Bego, por devolverme la mirada de quien empieza en el laboratorio, a Mónica por enseñarnos como hacer una buena cirugía y a Bea por tus recomendaciones. En esta primera etapa también debo agradecerse al grupo de Juan Miguel Redondo: Sara, “el Niño”, Antonio, Dolo, Katia y Amelia, gracias por vuestros consejos y apoyo, especialmente durante este último año y medio. A Vanesa por sus interesantes conversaciones. Y como no a los que fueron miembros del BON (Biología del Óxido Nítrico): Jesús por contarnos tus aventuras maratonianas, Félix por transmitir siempre calma. De este grupo he de agradecerse especialmente a Enara, por ser un referente de lucha y esfuerzo, y a Patricia por guiarme, gracias por haber estado siempre pendientes de mi situación, animarme, apoyarme y hacerme ver que el proceso tiene fin, muchas gracias por vuestra ayuda y consejos.

Por otro lado, los cambios institucionales me permitieron conocer a otro grupo de personas muy interesantes. Tengo que agradecerse a A. Bernard por haberme permitido seguir en el laboratorio durante este último año desde la finalización de mi contrato, y a la gente de su grupo con quienes compartíamos laboratorio, especialmente a Enrique, Toni, Juancho, David (tanto al empresario como al extremófilo), Raúl, Carmen, María, Isabel y Yolanda. Así como a quienes fueron compañeros de pena de cabina de cultivos: Laura, Vero, Mapi y Paco. Dentro del Grupo de M. Torres a Jesús (gracias por motivarme a bucear), a Alberto por tus consejos tanto científicos como fuera de ellos, por demostrarnos que con esfuerzo se puede llegar muy lejos, Clara por tus conversaciones políticas, Claudio y Verónica por aportar nuevos e interesante puntos de vista. Sobre todo gracias por hacer que en el rincón de la radiactividad no me sintiera aislado y por compartir vuestras conversaciones conmigo.

Tampoco puedo olvidarme de agradecerse a todas las personas de los distintos departamentos y unidades técnicas del CNIC. Especialmente a los proteómicos: Juan Antonio, Enrique y Emilio, quien me recordó que “en el ajedrez los peones sólo pueden moverse hacia delante”. A Raquel por su apoyo moral y científico especialmente en esta última etapa, a Elvira

por saber obtener la mejor imagen en el confocal. A los informáticos: Fernando, Juan Carlos y Alicia gracias por solucionar mis torpezas con el ordenador. Inés gracias por tu ayuda en el animalario, Eeva por tu resolutiveidad y facilitarnos la documentación necesaria. A Roisin por enseñarme a realizar un corte histológico desde la preparación de la muestra hasta su procesado. A José Luis y Esther de compras, gracias por encontrarlo todo y decirnos como conseguirlo. Agradecérselo también al personal del almacén, José y Ángel, como al de esterilización, Beatriz, Ana y Manuel, por facilitarnos infinitamente las cosas. También he de agradecérselo al servicio de bioseguridad y radioprotección, dado que durante mucho tiempo fuimos los únicos del centro en utilizar radioactividad gamma, gracias Rocío y Javier por ayudarnos e instruirnos. También he de agradecérselo al personal de la biblioteca por conseguir toda la bibliografía que buscásemos en un tiempo “record”, Alicia, Irene y Elisa. A Ricardo y Ana del grupo venido de Zaragoza, muchas gracias por escucharme. A los vigilantes de seguridad quienes hacían que las noches de experimentos no fueran tan solitarias.

También he de agradecérselo al Dr. Vladimir Muzykantov, por aceptar que fuera de estancia a su laboratorio, así como a los miembros de su laboratorio: Sergei, Valodia, Erik y por supuesto BiSen, quien me explico con extraordinaria paciencia toda la parte del diseño de las proteínas de fusión, gracias por transmitirme ese amor a la ciencia. No puedo olvidar tampoco la ayuda de Silvia y Carmen quienes hicieron que mi estancia en Filadelfia fuera mucho más agradable, gracias por enseñarme tanto de ciencia como de la vida científica en el extranjero...

A Fátima, por la claridad de tus explicaciones, y otros compañeros de grupo que hicieron las prácticas en el laboratorio a Marta por darme ese pequeño empujón y apoyo que necesitaba, Lorena por convencerme y permitirme creer en lo que hacía, Saray por tu ayuda para la producción de la proteína de fusión. A los “Cicerones” Mara, por la ilusión que despertabas, Luis por tus ganas de hacer de todo en el laboratorio sin importarte el tiempo que tuviéramos que estar en él... a Alicia por hacernos entender los aspectos médicos.

Las vicisitudes de este proceso, tan largo en el tiempo, me han brindado la oportunidad de poder conocer más a ciertas personas. En este sentido, he de agradecérselo especialmente a Antonio Ureña, muchísimas gracias por tu apoyo y estar siempre pendiente de mi situación, a Vicente Andrés, Juan Miguel Redondo y Miguel Torres, gracias por apoyarme. También he de agradecérselo a Juan Diez, Enriqueta Arias, María José Carmena y Susana Negrete. Tampoco puedo olvidarme de Antonio Enriquez, por enseñarnos los entresijos de la universidad. Gracias Juan y Marta por vuestro apoyo y consejos venidos de Cambridge.

Tengo que agradecerse a todas aquellas personas anónimas que han luchado por conseguir que el dedicarse a la ciencia no sólo sea un “modo de vida” sino que se convirtiera en un trabajo digno, con los derechos propios de cualquier trabajador. También he de agradecerse a todas aquellas personas que siguen defendiendo la dignificación de esta profesión y persiguen el poder realizar una carrera científica. A quienes apoyan y legislan a favor de esto.

También he de agradecerse a la entidades que han financiado este trabajo: Fondo de Investigaciones Sanitarias (2005-08), Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (2008-2010) e Instituto Nacional de Empleo (2010).

A Beatriz por haber estado pendiente de la situación y aconsejarme.

A mis amigos de siempre, gracias por estar ahí cuando os he necesitado, gracias por vuestro apoyo, vuestra paciencia y comprensión, gracias por acompañarme los jueves con la cervecita para contarnos la semana, por los viajes, por las comidas y cenas. Gracias por haberme acompañado durante tantos años. Quizás el conoceros demasiado no me permita resumir en una pequeña frase para cada uno de vosotros... Manu y Mamen, Fermín y Raquel, Raúl y Belén, Víctor y Susana, Víctor, Marta, Patricia y Roberto...

Y como no, también tengo que agradecerse a mi familia, que aunque no se escoja, me siento orgulloso de ella, entendiendo por familia no sólo al núcleo familiar, sino que en este apartado hemos de incluir a mis abuelas Duchi y Lolita, todos mis tíos y primos, quienes con su apoyo, ayuda, consejos, han contribuido enormemente a convertirme en la persona que soy. Mis tíos: Nano, Merce, Cándida, José, Mimo, Javier, Lola, Luis Miguel, Totin, María José, Luis (autor de la radiografía de la portada), Tata, Mano, Antonio, Miqui, Fátima y Clara. A mis primos: María e Iñaqui, Lindi y José, Candi y Nacho, Javi, Dani y Ana, Bárbara y Chipi, Marta y José, Jorge y Estela, Maqui y Boris, Fer y Almu, Jaime y Ana, Elena, Luis y Yadmira, Luismi, Jesús, Almu, Miguel, Antonio, Pablo, Fer, Paloma, Paula, Nacho y David.

A mis padres, por fomentar mi libertad de expresión, por haber estado siempre ayudándome en todo lo que he necesitado, por haberme educado y formado... por haberme aguantado y sufrido durante todo este proceso, por haberme inculcado los mejores valores éticos... Gracias por todo a los dos.

A mi hermano, Sergio, con quién he pasado tan buenos momentos, de quién aprendía cuando le explicaba y quién me ha hecho ver las cosas desde un prisma diferente. Seguro que serás un excelente médico, seguirás la “tradicción” familiar desde el abuelo, papá y ahora tú y

Marta... Escoged bien la especialidad para que pueda pedir os muestras clínicas para mis futuros experimentos...

A Sonia, quién ha sido capaz de “soportar” a una persona que se ha dedicado en “cuerpo y alma” durante 7 años exclusivamente a la tesis. Por haberme esperado, por haberme aguantado y aconsejado, gracias Sonia por haber depositado tu confianza en mí, por motivarme, por devolverme la esperanza hacía un tipo de vida mejor, por ayudarme a buscarla contigo...

Estoy seguro de que me dejo a muchas personas en el tintero, espero que me sepan perdonar. Pero ahora solo puedo deciros GRACIAS... GRACIAS a todos, especialmente por el apoyo que he recibido de todos vosotros. Sin vuestra ayuda este trabajo no habría llegado jamás a su fin.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
ABSTRACT.....	5
INTRODUCCIÓN.....	9
1. PATOLOGÍAS OCLUSIVAS DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.....	11
2. EL PROCESO HEMOSTÁTICO.....	12
3. EL PROCESO FIBRINOLÍTICO.....	14
3.1 Los PA endógenos.....	14
3.1.1 Activador del plasminógeno tisular: tPA.....	14
3.1.1.1 Estructura.....	14
3.1.1.2 Propiedades enzimáticas.....	16
3.1.1.3 Eliminación.....	17
3.1.2 Activador del plasminógeno urinario: uroquinasa (UK).....	17
3.1.2.1 Estructura.....	18
3.1.2.2 Propiedades enzimáticas de UK.....	19
3.1.2.3 Eliminación de UK.....	19
4. REGULACIÓN ENDÓGENA DE LA FIBRINOLISIS.....	20
4.1 Control fisiológico de la trombolisis.....	20
4.1.1 Activación.....	21
4.1.2 Inhibidores de la fibrinólisis.....	21
4.2 Características del trombo.....	22
4.3 El endotelio.....	23
5. EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....	24
5.1 PA de primera generación.....	25
5.2 PA de segunda generación.....	26
5.3 PA de tercera generación.....	27
6. DIRECCIONAMIENTO DE FÁRMACOS.....	31
6.1 Direccionamiento mediante RBC.....	33
6.1.1 Sistema de encapsulación.....	34
6.1.2 Direccionamiento de fármacos mediante RBC modificados en su superficie.....	35
6.1.3 Eritrocitos portadores de fibrinolíticos: la tromboprolifaxis a la carta.....	37
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. REACTIVOS.....	47
2. MARCAJE RADIOACTIVO.....	48
2.1 Marcaje radiactivo de proteínas.....	48
2.2 Marcaje radiactivo de células.....	49
3. FORMACIÓN DE COÁGULOS.....	49
4. MODELO ANIMAL DE TROMBOEMBOLISMO PULMONAR (PE).....	50
5. ACTIVADORES DEL PLASMINÓGENO LIBRES.....	51
5.1. Ensayos de actividad fibrinolítica en exposición constante.....	51
5.2 Ensayos en exposición transitoria al PA.....	52
5.2.1 Actividad fibrinolítica.....	52
5.2.2 Retención y penetración de los PA.....	52
5.3 Ensayos in vivo.....	53
5.3.1 Actividad fibrinolítica.....	53
5.3.2 Retención de la droga en el pulmón embolizado.....	53
6. MODIFICACIÓN DE LOS ERITROCITOS CON LOS REACTIVOS DE BIOTINA.....	53

7.	FORMACIÓN DE ESPECIES PROTEICAS CAPACES DE UNIRSE A LOS ERITROCITOS.....	54
7.1	Conjugados químicos entre la estreptavidina y los activadores del plasminógeno.....	54
7.1.1	Modificaciones de las proteínas.....	55
7.1.2	Formación de conjugados.....	56
7.2	Proteínas de fusión.....	57
7.2.1	Proteínas de fusión entre la fracción variable de anticuerpos y los activadores del plasminógeno.....	57
7.2.2	Proteínas de fusión que combinan el núcleo de la estreptavidina con la urokinasa activable por trombina.....	57
7.2.2.1	Clonaje de SA y SA-UK-T.....	57
7.2.2.2	Mutagénesis dirigida de SA-UK-T.....	58
7.2.2.3	Cultivo, transfección de células embrionarias de insecto (línea celular S2) y producción proteica.....	59
7.2.2.4	Purificación de las proteínas de fusión.....	60
7.3	Ensayos de caracterización.....	60
7.3.1	Ensayos cromatográficos: electroforesis en gel de poliacrilamida.....	60
7.3.1.1	Western blot.....	61
7.3.2	Espectrometría de masas.....	61
7.3.3	Ensayos de funcionalidad.....	62
7.3.3.1	Fijación de proteínas a pocillos de poliestireno.....	62
7.3.3.1.1	Ensayo de unión del sobrenadante celular.....	62
7.3.3.1.2	Ensayo de unión de la proteína de fusión purificada.....	63
7.3.3.1.3	Ensayos de la actividad amidolítica de la FP presente en el sobrenadante celular.....	63
7.3.3.2	Zimografía en gel.....	64
7.3.3.3	Actividad fibrinolítica.....	64
8.	COMPLEJOS ERITROCITARIOS.....	64
8.1	Formación de los complejos: RBC-PA.....	64
8.2	Ensayos de estabilidad de los complejos.....	65
8.2.1	Mantenimiento de la unión.....	65
8.2.2	Ensayos de agregación.....	65
8.2.3	Ensayo de hemólisis reactiva.....	66
8.3	Ensayo in vitro de actividad de RBC-PA en coágulos.....	67
8.4	Ensayos en animales.....	67
8.4.1	Farmacocinética y biodistribución tisular.....	67
8.4.2	Actividad fibrinolítica ex vivo.....	68
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	68
	RESULTADOS.....	69
1.	ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PA LIBRES.....	71
1.1	Capacidad fibrinolítica.....	71
1.2	Susceptibilidad del tPA y sus derivados a los inhibidores plasmáticos: PAI-1 y TAFIa.....	73
1.3	Actividad, unión y penetración de los PA en exposición interrumpida.....	74
1.4	Caracterización de los PA in vivo: retención de los PA y actividad fibrinolítica.....	76
2.	FORMACIÓN DE CONJUGADOS SA-PA Y COMPLEJOS RBC-PA.....	78
2.1	Biotinilación directa in vivo.....	78
2.2	Modificaciones de la SA y del PA con los agentes bifuncionales SATA y sulfo-SMCC.....	81
2.2.1	Formación de conjugados SA-TNK.....	83
2.2.1.1	Unión de los conjugados SA-TNK a RBCb.....	84
2.2.1.2	Purificación de los complejos SA-TNK mediante FPLC.....	85

2.2.2 Formación de conjugados SA-Ret.	86
3. GENERACIÓN DE FP Y CARACTERIZACIÓN DE SU POTENCIAL TROMBOPROFILÁCTICO... ..	89
3.1 Un PA de diseño activable en el entorno protrombótico: UK-T.....	89
3.2 Producción y purificación de la proteína de fusión SA-UK-T.....	90
3.2.1 Caracterización bioquímica de los núcleos activos de la proteína de fusión.	93
3.2.2 Caracterización de los complejos RBCb/SA-UK-T.	95
3.2.3 Circulación y actividad de los complejos RBCb/SA-UK-T.	98
3.3 Generación de quimeras SA:SA-UK-T y detección en el medio celular.	102
3.3.1 Purificación y unión de la de la FP quimérica.	103
3.4 Generación de la SA-UK-T monomérica.....	105
3.4.1 Producción y purificación de mFP.	105
3.4.2 Unión al portador de mFP.	106
3.4.3 Actividad fibrinolítica de mFP y de los complejos RBCb/mFP in vitro.	107
3.4.4 Circulación, biodistribución y actividad de los complejos RBCb/mFP.....	109
DISCUSIÓN	113
1. PA LIBRE.	115
2. FORMACIÓN DE CONJUGADOS SA-PA Y COMPLEJOS RBC-PA.	125
3. PROTEINAS DE FUSIÓN.....	131
CONCLUSIONES.....	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147

ABREVIATURAS

%ID:	Porcentaje de la dosis inyectada.	RBC-PA:	Complejos formados entre los eritrocitos y los activadores del plasminógeno independientemente del modo de unión.
%ID/T:	Porcentaje de la dosis inyectada/tejido.	RBC:	Eritrocito
A:	Alanina.	RBCb:	Eritrocito biotinilado.
Ac:	Anticuerpo.	RBCb/FP:	Complejos formados entre los eritrocitos biotinilados y las proteínas de fusión con el núcleo de SA.
ACV:	Accidente cerebrovascular.	RBCb/mFP:	Complejos formados entre los eritrocitos biotinilados y la proteína de fusión monomérica
AP:	Antiplasmina.	RBCb/SA-PA:	Complejos formados entre los eritrocitos biotinilados y los conjugados químicos estreptavidina activador del plasminógeno
AT III:	Antitrombina III.	RBCb/SA-UK-T:	Complejos formado esntre los eritrocitos biotinilados y la proteína de fusión estreptavidina urokinasa activable por trombina.
BSA:	Albúmina de suero bovina.	RBCb/SA:	Complejos formados entre los eritrocitos biotinilados y la estreptavidina
Ci:	Curio.	Ret:	Reteplasa
cpm:	Cuentas por minuto.	RT:	Temperatura ambiente
D:	Aspartato.	S2:	Línea celular embrionaria de <i>Drosophila melanogaster</i>
DVT:	Trombosis venosa profunda.	SA-PA:	Conjugado químico entre la estreptavidina y cualquiera de los PA
EGF:	Dominio tipo factor de crecimiento epidérmico.	SA-UK-T:	Proteína de fusión estreptavidina urokinasa activable por trombina
F:	Dominio "dedo".	SA:	Estreptavidina
FBS:	Suero fetal bovino.	SATA:	<i>N</i> -Succinimidil S-acetiltioacetato
Fg:	Fibrinógeno.	sc-UK:	Urokinasa de cadena sencilla
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína.	scFv:	Fracción variable de un anticuerpo de cadena sencilla
Fn:	Fibrina.	SDS:	Dodecil sulfato sódico
FP:	Proteína de fusión.	SEM:	Error estándar de la media.
FPLC:	Cromatografía líquida rápida de proteína.	SK:	Estreptokinasa
GPA:	Glicoforina A.	SMCC:	sulfosuccinimidil-4-(<i>N</i> -maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato.
K1 y K2:	Dominios kringle 1 y 2.	Ter119-mRK:	Proteína de fusión que combina Ter119 con mRNK
kDa:	kiloDalton.	Ter119-UK-T:	Proteína de fusión que combina Ter119 con UK-T
KRB:	Tampón de Krebs Ringer.	Ter119:	Fracción variable de un anticuerpo de cadena sencilla que reconoce la glicoforina A de ratón
LC:	Cadena larga	TNK:	Tenecteplasa
LRP:	Proteína relacionada con las lipoproteínas de baja densidad	tPA:	activador del plasminógeno tisular
Lys:	Lisina.	UK:	Urokinasa
M:	Media.	UK-T:	Urokinasa activable por trombina
mFP:	Proteína de fusión monomérica de estreptavidina urokinasa activable por trombina.	UK:	Urokinasa
MI:	Infarto de miocardio	uPAR:	Receptor de urokinasa
mRK:	proteína de derivada del tPA de ratón que combina los dominios kringle 2 y proteásico con resistencia frente a su principal inhibidor		
NHS:	succinimidil ester		
P:	Dominio proteásico		
PA:	Activador del plasminógeno		
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida		
PAI-1:	Inhibidor del activador del plasminogeno 1		
PBS:	Tampón salino/fosfato		
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa		
PE:	Embolia pulmonar		
PFC:	Coágulo puro de fibrina		
Plg:	Plasminógeno		
Pln:	Plasmina		
PM:	Peso molecular		
PPP:	Plasma pobre en plaquetas		

ABSTRACT

Abstract.

Cardiovascular diseases represent the first cause of death in developed countries and have become a serious clinical problem in terms of treatment and hospital costs. Available pharmacological approaches are rather restricted and have shown severe limitations due to harmful side effects.

Plasminogen activators (PA) evolve as the first choice agent to treat acute and symptomatic vasoocclusive diseases; however, the weakness of their clinical development lies both in the lack of systematic comparative studies among the existing drugs and their experimental models, and in the inadequate application to surgical patients.

This work tries to fill this gap and focuses on the improving of a new and promising pharmacological approach, in which a plasminogen activator is associated to the red blood cell (RBC) surface. From this privileged location, the fibrinolytic agent I) extends dramatically its half life, reducing the required doses and its side effects, II) remains in circulation, where its activity is required, and III) dissolves specifically the nascent, pathological clots, while preventing the dissolution of the haemostatic, good ones.

In order to succeed, work started by deeply analyzing the available and most extended clinical plasminogen activators, both *in vitro* and *in vivo*, and found interesting concepts about their sensitivity to plasma inhibitors and their capacities to act on the clots at different levels. The obtained data also suggested that reteplase could be an interesting approach to treat easily accessible thrombi/emboli, based on its capacity to diffuse within the clot matrix, improving clot dissolution both from the outside and from the inside. The methodological procedure gathered these results from the dissolution of clots of a) extremely controlled composition, b) selectively adjusted drug concentrations, and c) elaborated platforms to picture all possible pathological approaches. These results were reproduced, as well, in an extensively validated murine model of pulmonary embolism, which mimics the *in vivo* pathological environment.

However, none of the studied clinical drugs offered enough possibilities for direct conjugation to RBC. Thus, subsequent efforts focused on an innovative fusion protein approach, where the cores of two major proteins, in this case a universal bridging streptavidin core (SA) along with the latent thrombin-activatable urokinase (UK-T), resulted in a promising RBC delivery. The generated conjugate is capable of being universally tested across different animal and human platforms and, more importantly, it is selectively activated within the nascent clot environment, not showing activity or

sensitivity to PA inhibitors in other blood locations. This approach went even further with the generation of a fusion protein, which retains the major characteristics of the SA-UK-T complex, but markedly reduces its affinity for biotin by impeding tetramerization of the SA core (mFP). This new fusion protein included the ability to control its permanence in circulation by using pure SA, which will displace the mFP from the RBC carrier. These data were generated using a) precisely adjusted cell culture system for the production of the fusion protein, as well as phage display and genetically engineered plasmids, b) biochemical characterization and activity analysis of the protein purification and its RBC conjugates, c) studies of their maintenance in the bloodstream by using doubly isotopically labeled conjugates, and d) demonstration of their fibrinolytic capacity on nascent autologous blood clots.

Altogether, this work demonstrated the ability to generate therapeutical approaches both at the level of conventional drugs and at the level of new drug delivery agents. At the same time, it offers some hope for the improvement of the clinical management of cardiovascular patients, especially for those who require a surgical procedure and will be exposed to a higher risk of coagulation. Such hope resides in the development of a conjugated RBC with a promising and displaceable latent plasminogen activator, which only dissolves pathological clots and could be eliminated when its activity is no longer required.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de muerte en el mundo. Los informes de la Organización Mundial de la Salud [1] las muestran no solo entre las enfermedades con mayor índice de muerte en los países desarrollados, sino también a nivel mundial (tabla 11). De hecho, se estima que aproximadamente un 33% de la población mundial sufre este tipo de patologías, destacando los procesos tromboembólicos, no solo como causa de morbi-mortalidad [2, 3] sino también como causa de discapacidad [4]. Por todo ello, estas patologías representan un problema de primer orden y la búsqueda de nuevos tratamientos una necesidad.

Nivel mundial		Países desarrollados		
	Principales causas de muerte	% Muertes	Principales causas de muerte	% Muertes
1	Enfermedad isquémica de corazón	12,2	Enfermedad isquémica de corazón	16,3
2	Enfermedad cerebrovascular	9,7	Enfermedad cerebrovascular	9,3
3	Infecciones respiratorias bajas	7,1	Cáncer vías respiratorias	5,9
4	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.	5,1	Infecciones respiratorias bajas	3,8
5	Diarrea	3,7	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.	3,5
6	HIV/AIDS	3,5	Alzheimer y otras demencias	3,4
7	Tuberculosis	2,5	Cáncer de colon y recto	3,3
8	Cáncer vías respiratorias	2,3	Diabetes mellitus	2,8
9	Accidentes de tráfico	2,2	Cáncer de mama	2
10	Nacimiento prematuro o de bajo peso	2	Cáncer de estómago	1,8

Tabla 11. Modificada de: "The global burden of disease: 2004 update" [1].

1. PATOLOGÍAS OCLUSIVAS DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.

Las patologías oclusivas, causadas por la obstrucción de los vasos sanguíneos, producen accidentes tan importantes como el infarto agudo de miocardio (AMI), las tromboembolias cerebrales o pulmonares, la trombosis venosa profunda o las obstrucciones arteriales periféricas, entre otros. Estas patologías se deben a la desregulación de dos procesos íntimamente relacionados y esenciales para el mantenimiento del organismo: la coagulación y la fibrinólisis. Ambos procesos se producen por mecanismos en cascada proteolítica, y su descompensación, por exceso o déficit de alguno de sus factores, dará lugar a problemas trombóticos y/o hemorrágicos.

Los estados protrombóticos los podemos clasificar en dos grandes grupos: 1) hereditarios, como el factor V de Leiden, las deficiencias en diversos factores de la

coagulación y de la fibrinólisis (proteína C, proteína S, deficiencias de los activadores del plasminógeno, PA; plasminógeno, Plg; exceso del inhibidor principal de los PA, el PAI-1 [5-10]); y 2) adquiridos, como el lupus, el cáncer o los síndromes mieloproliferativos. Además, existen factores de riesgo que predisponen a los pacientes a las trombosis, como la enfermedad aterosclerótica [11], la insuficiencia cardíaca congestiva [12], las neoplasias malignas [13], la inmovilidad [14], infecciones [15], tratamientos farmacológicos (anticonceptivos orales, tamoxifeno) [16, 17], hábitos de vida (tabaquismo, sedentarismo) [18, 19] y situaciones especiales como el embarazo, el puerperio o los procesos quirúrgicos y su rehabilitación [20-22]. De hecho, es bastante común que diversos procesos quirúrgicos como las cirugías vasculares (bypass coronario, implantación de stents, endarterectomía de la carótida, etcétera) o las cirugías ortoprotésicas (sustituciones de cadera o de rodilla entre otras) se asocien con trastornos tromboticos. Dichos trastornos, engloban procesos de retrombosis y/o trombosis distales, producidos por inmovilizaciones prolongadas o por la generación de émbolos que migran hacia las áreas cerebral o pulmonar donde ejercen su efecto lesivo. Es, en especial, durante las primeras 48-72 horas cuando se debe aplicar un proceso tromboprolifáctico capaz de eliminar estos coágulos en formación [23, 24], pero sin atacar a los coágulos hemostáticos que taponan la herida quirúrgica. Lamentablemente, el abanico de drogas tromboprolifácticas es extremadamente limitado y tan solo engloba agentes anticoagulantes como por ejemplo las heparinas de bajo peso molecular.

También cabe destacar que en el caso de infartos de miocardio, isquemias y embolias cerebrales, la ruptura de los trombos inducida *per se* o por la terapia trombolítica inicial puede producir nuevos episodios tromboticos por los fragmentos liberados [23].

2. EL PROCESO HEMOSTÁTICO.

La hemostasia consiste en la detención de una hemorragia de un modo espontáneo o por medios físicos o químicos, evitando la pérdida de sangre. El proceso hemostático se inicia cuando la sangre y el revestimiento endotelial quedan expuestos al tejido conjuntivo tras la ruptura de la pared vascular.

Al romperse un vaso se suceden los siguientes eventos tendentes a evitar dicha pérdida de sangre: I) espasmo vascular, que disminuye el flujo limitando la pérdida de sangre y evita la dilución de los factores de la coagulación, II) formación del tapón plaquetario

3. EL PROCESO FIBRINOLÍTICO.

3.1 Los PA endógenos.

En los homínidos existen dos activadores del plasminógeno endógenos que son el activador tisular del plasminógeno (tPA) y la uroquinasa (UK), nombrados a partir de su primera fuente de purificación: tejidos [29] y orina [30, 31], respectivamente. Los PA endógenos son enzimas catalíticas que convierten al Plg zimogénico en Pln activa, la cual digiere el entramado de Fn del coágulo. No obstante, los PA también están implicados en múltiples procesos neurobiológicos, tumorales, reparación de heridas, etcétera [32, 33]. En la naturaleza encontramos PA de distintos orígenes: derivados de bacterias, como pueden ser la estreptoquinasa (SK) [34, 35] o la estafiloquinasa (SFK) [36]; derivados de la saliva de murciélagos hematófagos, la desmoteplasa (DSPA) [37] y derivados del veneno de serpientes, como la alfineprasa (ALF) [38, 39].

3.1.1 Activador del plasminógeno tisular: tPA.

3.1.1.1 Estructura.

El tPA es una serín proteasa de 68 kDa (EC 3.4.21.68). Se trata de una glicoproteína de 530 aminoácidos, la cual ejerce sus efectos primeramente en el sistema vascular. El tPA se produce principalmente por las células endoteliales y es secretado a la circulación. La concentración normal en plasma es de 70 pM (tabla 21), sin embargo la mayor parte se encuentra acomplejado con el PAI-1 en la circulación. En su estructura (fig. 21 a) tPA presenta 17 puentes disulfuro y una Cys libre en posición 83 [40]. Muestra varios dominios: I) dedo (F; residuos 4-50), se une a la Fn de un modo Lys independiente, II) dominio parecido al factor de crecimiento epidérmico (EGF; residuos 50-87), media la eliminación del tPA a través de la unión a receptores de manosa, III) "kringle" 1 (anillo, K1; residuos: 87-176), se piensa que ejerce un papel potenciador de la unión independiente de Lys y en la eliminación de la droga, si bien sus funciones no se han podido determinar fehacientemente, IV) "kringle" 2 (anillo, K2; residuos: 176-256), produce la unión dependiente de Lys y V) el dominio proteásico (P; residuos: 276-530). Al ser una serín proteasa su dominio catalítico comparte muchas similitudes con los de otras enzimas de la misma familia. Su estructura cristalográfica muestra una estructura en bucle en el entorno de la Arg299 exhibiendo 5 residuos (Arg298-Arg-Ser-Pro-Gly302) fundamentales para su interacción con el PAI-1 [41].

Molécula	Concentración (M)
Fg	1,5-4 mg/ml[26]
Activadores	
tPA	70 pM
UK	40 pM
Plg	2 μM
Inhibidores	
PAI-1 y 2	200-400 pM y <70 pM
TAFI	75 nM
α ₂ -Macroglobulina	3 μM
Protrombina	1-2 μM
α ₂ -Antiplasmina	1 μM
C1-inhibidor	1,7 μM

Tabla 2I. Principales moléculas implicadas en la regulación de la fibrinólisis: activadores e inhibidores. Modificado de “New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system”[44]. Nótese la abundancia relativa de los inhibidores frente a los activadores. tPA: activador del plasminógeno tisular; UK: uroquinasa; Plg: plasminógeno; Fg: fibrinógeno; PAI-1 y 2: inhibidor del activador del plasminógeno 1 y 2; TAFI: inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina.

Otro aspecto importante de ésta molécula es su glicosilación. El tPA tiene cuatro puntos potenciales de glicosilación (Thr61, Asn117, Asn184, Asn448). El primero de ellos se encuentra fucosilado mientras que los otros tres puntos poseen estructuras tipo oligomanosa. La glicosilación influye en las propiedades biológicas del tPA, de tal manera que puede alterar su afinidad por la Fn, su actividad fibrinolítica y juega un papel importante en su eliminación [45].

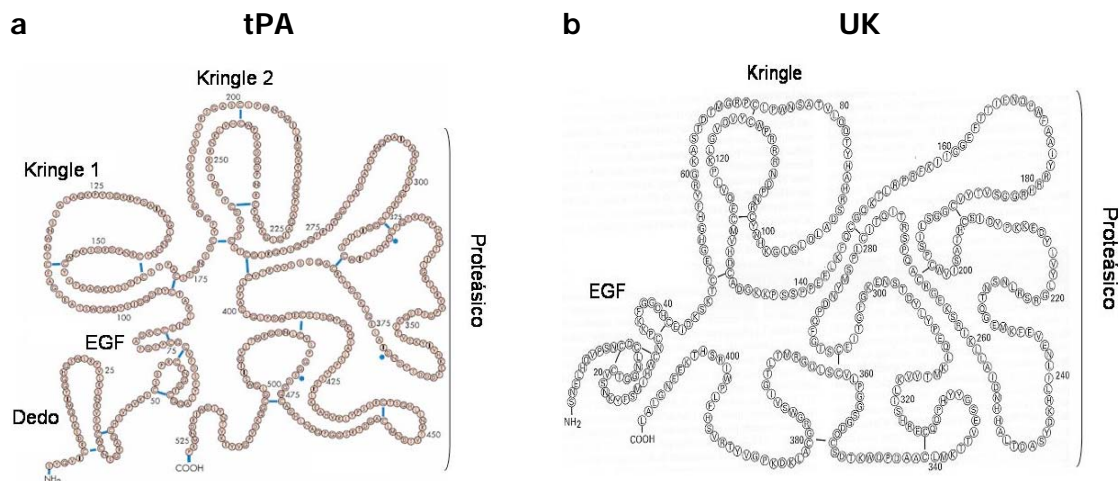


Figura 2I. PA endógenos. Representación esquemática en la que se muestran tPA y UK con sus dominios estructurales: Dedo, EGF, Kringles y el dominio proteásico; (a) Modificado de: “Thrombolysis: newer thrombolytic agents and their role in clinical medicine” [42] y (b) modificado de: “Hurst’s the heart” [43].

3.1.1.2 Propiedades enzimáticas.

El tPA se secreta como molécula de una sola cadena pero es fácilmente convertida en una molécula de cadena doble mediante la hidrólisis proteolítica producida por la Pln entre las Arg275-Ile276. Esta transformación a molécula de doble cadena potencia su capacidad fibrinolítica. Sin embargo, la molécula de cadena sencilla en presencia de Fn es casi tan activa como la forma de doble cadena [46]. El que ambas formas fueran activas ha motivado la búsqueda de nuevas variantes zimogénicas mediante mutagénesis dirigida [47, 48].

El tPA produce la hidrólisis proteolítica del Plg entre los residuos Arg561-Val562, convirtiéndolo en Pln. Aunque el tPA no solo actúa sobre el Plg, éste es su principal sustrato, y a las concentraciones fisiológicas de tPA y Plg, solo se generará Pln en presencia de Fn [27]. De este modo, tPA posee una limitada capacidad plasminogenolítica en ausencia de Fn, pero en su presencia la activación del Plg se potencia sustancialmente. De hecho, los cambios conformacionales que se suceden en la conversión del Fg a la Fn exponen los puntos de unión para tPA y Plg actuando como acelerantes de la conversión del Plg en Pln. Por otro lado, tanto la molécula de cadena sencilla como la de cadena doble de tPA se unen de un modo comparable a la Fn, si bien la primera se encuentra ligeramente favorecida [49]. Además, en la molécula de Fn se han identificado múltiples puntos de unión para tPA y Plg, como muestra la figura 31 [27], donde la presencia del Plg aumenta la afinidad del tPA por la Fn, aproximadamente en 20 veces [46, 49-51], lo que se explica por la formación de complejos ternarios entre tPA, Plg y Fn. La formación de estos complejos ternarios ofrece cierta protección frente a la inhibición de la Pln y favorece la interacción local [52-55]. Por lo tanto, la Fn no es sólo el sustrato final de la Pln, sino que es un elemento activo en el proceso fibrinolítico que actúa como cofactor del tPA y Plg, convirtiéndose en un elemento regulador.

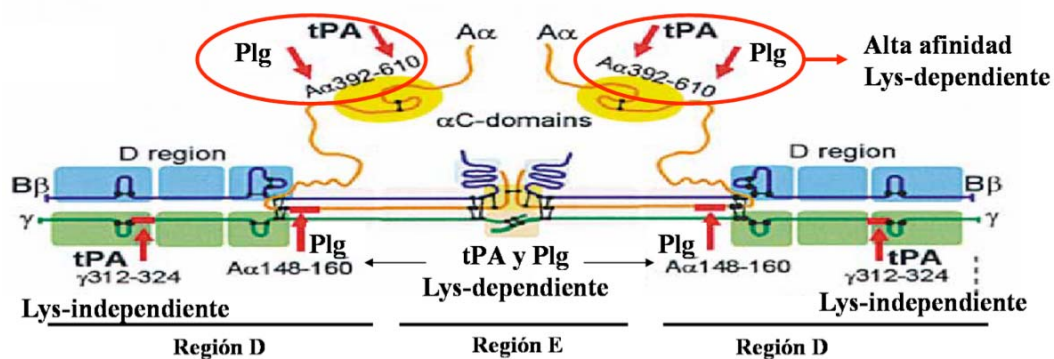


Figura 31. Representación esquemática de los epítomos de unión para tPA y Plg dependientes e independientes de Lys. Tomado de "Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin" [27]

3.1.1.3 Eliminación.

El tPA, tanto libre como acompañado con sus inhibidores (por ejemplo, tPA-PAI-1), se elimina rápidamente de la circulación a través de los receptores de las células endoteliales, de los hepatocitos y de las células de Kupffer. Se ha observado como en sujetos sanos, el tiempo de vida media del tPA en circulación ($t_{1/2}$) es aproximadamente 3-5 minutos [56, 57].

Existen diferentes vías de eliminación del tPA mediadas por receptores: a través de los de manosa, de fucosa [58] y los de proteína relacionados con las lipoproteínas de baja densidad (LRP) [59]. La identificación de estos mecanismos de eliminación vía receptores que reconocen residuos glucídicos llevaron a desarrollar la reteplasa (Ret) y la tenecteplasa (TNK) en las cuales se eliminan o sustituyen los puntos de glicosilación, respectivamente, incrementando su biodisponibilidad [60, 61] (tabla 3I, figs. 2I y 4I).

La otra vía principal de eliminación del tPA involucra los receptores LRP [59], los cuales median la eliminación de la apolipoproteína E, toxinas, citoquinas, complejos de la α_2 -macroglobulina con proteasas, tPA libre, y los complejos tPA/PAI-1 y UK/PAI-1. Además, la formación de complejos de tPA con PAI-1 incrementa la relación de eliminación por LRP al menos diez veces en comparación con el tPA libre [62].

Otro tipo de receptores de LRP multiligando, tales como la glicoproteína 330 y la 130-kDa VLDL receptor, también pueden mediar la eliminación del tPA libre o acompañado con PAI-1 [63].

3.1.2 Activador del plasminógeno urinario: uroquinasa (UK).

Este PA (EC 3.4.2.73) fue aislado primeramente de orina, lo que dio lugar a su nombre, donde se encuentra a concentraciones de 40 pM (tabla 2I) y se sintetiza por distintos tipos celulares: fibroblastos, células epiteliales, monocitos y macrófagos [64-66]. Aunque también la secretan las células endoteliales bajo estímulos específicos [67, 68] (la endotoxina o el factor de necrosis tumoral). La UK activa el plasminógeno en ausencia de Fn a diferencia del tPA. Esta importante característica generó la visión errónea de que el tPA actúa en la vasculatura realizando la fibrinólisis, mientras que el papel principal de la UK se encuentra en procesos de degradación de la matriz extracelular y migración celular; propios de la reparación de heridas, procesos inflamatorios, embriogénesis, invasión de células tumorales y metástasis [69, 70]. Estas funciones del sistema de la UK no

argumentan en contra de su importancia en la degradación de los coágulos en la vasculatura [71].

3.1.2.1 Estructura.

La UK se produce como una molécula zimogénica de 54 kDa (pro-UK o UK de cadena sencilla, sc-UK). Se trata de una glicoproteína de 411 residuos que contiene tres dominios (fig. 2I b): un dominio EGF (residuos 5-49), un dominio "kringle" (residuos 50-131) y el dominio proteásico (residuos 148-411) [44]. El dominio EGF interactúa con el receptor de UK (uPAR) que se encuentra en múltiples tipos celulares. El dominio "kringle" no tiene afinidad por la Fn y su función no es clara, aunque parece que estabiliza la interacción UK/uPAR [72]. Por último, el dominio proteásico contiene la triada catalítica en: His204, Asp255 y Ser356 [73], encargada de su actividad enzimática. UK posee una fucosa en Thr18, la cual parece intervenir en su eliminación y en su capacidad mitogénica [74]. Existen dos sitios de fosforilación en la Ser138 y en la Ser303, una vez fosforilada, la UK disminuye su interacción con células y PAI-1 [75].

La UK se ha caracterizado por tener dos formas activas: la UK de alto peso molecular y la de bajo peso molecular [76]. Estas son, respectivamente, la UK de cadena completa y la UK en su forma hidrolizada en Lys135-Lys136, que cede el fragmento amino terminal (dominios EGF y K), dejando 21 residuos amino terminales junto con el dominio proteásico. De este modo, la UK hidrolizada (aminoácidos 136-411) no interaccionará con uPAR.

El zimógeno sc-UK se convierte en el enzima UK activo mediante la conversión proteolítica entre Lys158-Ile159, siendo por lo tanto esta secuencia de aminoácidos un punto de gran interés para producir moléculas zimogénicas [77-79]. Si bien existen distintos enzimas capaces de activar la sc-UK (factor XIIa y la calicreína [80]), la más importante en el proceso hemostático es la Pln [81], que al activar a la UK, produce un efecto potenciador en el proceso fibrinolítico. Por otro lado, la UK se inactiva por la trombina mediante su acción proteolítica sobre la Arg156-Phe157 [80, 82, 83]. Sin embargo, el producto inactivo se puede re-activar por la acción de la catépsina C o por la propia Pln, que liberan el extremo N-terminal del dominio proteásico [84, 85]. La elastasa granulocítica y la catépsina G hidrolizan Ile159-Ile160 generando una UK de doble cadena inactiva [86], por lo que también estas enzimas son importantes en la modulación del efecto fibrinolítico.

Estudios de resonancia magnética nuclear, han mostrado otras zonas importantes para el control de su actividad, como el caso de los residuos 179-184 donde reside una carga positiva que media en la interacción con PAI-1, el principal inhibidor del centro catalítico.

Debido a todas estas regiones que influyen en unos u otros efectos tan dispares, esta molécula ha sido utilizada en sus distintas variantes y modificaciones mediante mutagénesis dirigida en el diseño de fármacos [78, 87].

3.1.2.2 Propiedades enzimáticas de UK.

La polémica suscitada por la zimogenicidad de la sc-UK se resolvió mediante la utilización de mutantes de UK en presencia de Plg, alcanzando el consenso actual en el que se asume que la sc-UK muestra sólo un 0,5% de la actividad catalítica [88-91]. La actividad enzimática de la UK depende en parte de la flexibilidad del dominio catalítico, donde juegan un papel muy importante la Lys300 y Asp355, que proporcionan rigidez al dominio catalítico. De este modo estructuras rígidas que abren el núcleo catalítico aumentan la actividad enzimática, mientras que mutaciones puntuales que aumentan la laxitud del dominio catalítico disminuyen notablemente la actividad [92-94].

3.1.2.3 Eliminación de UK.

El receptor de UK, uPAR (también conocido como CD87), se encontró por primera vez en monocitos [95] pero se encuentra en múltiples tipos celulares. Este receptor se puede expresar de forma constitutiva o mediante inducción (promotores tumorales, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas). Tanto sc-UK como UK se unen a uPAR con una elevada afinidad ($K_d = 0,1-1$ nM dependiendo del tipo celular [96]) y pueden colocalizarse aumentando la activación del Plg en las superficies celulares [97, 98]. La unión de UK a uPAR puede actuar en las vías de señalización (por ejemplo, las vías ERK/MAPK) [99]. Sin embargo, dado que uPAR no es una proteína transmembrana, necesita de la cooperación de otros componentes para transmitir la señalización intracelular. Dada la libertad de movimiento en la superficie celular de uPAR, los complejos UK/uPAR se asocian con otras proteínas como la proteína Endo 180 [100] y LRP, promoviendo procesos de internalización. De este modo, los complejos uPAR/UK/PAI-1 se internalizan con la cooperación de los LRP [101]. Aunque, la unión de

la UK activa a uPAR no la protege de la inactivación por PAI-1, esta inactivación se vuelve más ineficiente y reversible [102].

4. REGULACIÓN ENDÓGENA DE LA FIBRINOLISIS.

El sistema fibrinolítico es el principal efector de la eliminación de coágulos y controla la degradación enzimática de los mismos. Su acción se encuentra coordinada a través de la interacción de activadores, zimógenos, enzimas, inhibidores, y receptores que proporcionan una activación local en los lugares de deposición del coágulo. Por lo tanto, la respuesta orquestada de todos ellos proporciona el control de la hemorragia, la reparación del tejido y la resolución del coágulo.

4.1 Control fisiológico de la trombolisis.

El sistema fibrinolítico está orientado para eliminar los coágulos de la circulación, de un modo controlado, cuando no sean necesarios, y prevenir su excesivo crecimiento durante su formación de aquellos imprescindibles. Normalmente, se mantiene quiescente como resultado de dos factores: la abundancia relativa de los inhibidores sobre las proteasas (tabla 2I) y el requerimiento de Fn o de superficies celulares para iniciar su actividad. No obstante, se activa también como respuesta fisiológica para la eliminación de un coágulo hemostático, el cual requiere la activación localizada de la fibrinólisis para eliminarlo sin producir una plasminemia sistémica, que podría provocar una proteólisis generalizada.

En sujetos sanos los niveles plasmáticos de Plg son bastante estables, mientras que los de PA y PAI-1 fluctúan durante periodos de 24 horas siguiendo ciclos circadianos [103-105], sugiriendo que la regulación ocurre principalmente vía sobreexpresión o disminución de la expresión de PA y PAI-1. Además, múltiples factores interfieren con estos ciclos, así por ejemplo el tPA incrementa varias veces su concentración plasmática tras: I) ejercicio intenso, II) estrés, III) estasis venoso [106-108], IV) inyección intravenosa de desmopresina [109], V) la presencia de Fn [110], o VI) la presencia de trombina unida al coágulo [111]. De este modo, el tPA aumenta su concentración local con los fenómenos de oclusión vascular.

4.1.1 Activación.

La trombolisis se regula por: I) la concentración del Plg, sus activadores y sus inhibidores en el lugar de formación del trombo, y II) por la unión de los reactivos fibrinolíticos al trombo y a las células del entorno. De este modo, la Fn actúa como foco de la generación de actividad y, aunque su deposición juega un papel importante en la hemostasis, reparación de heridas y procesos inflamatorios, su formación debe estar siempre limitada en el tiempo y eliminada una vez finalizada su función hemostática. La activación del Plg se encuentra facilitada por la unión del tPA a la Fn y por el incremento de actividad de tPA y UK en su presencia (fig. 3I). Este sistema ha servido como eje para el desarrollo de la terapia trombolítica, principalmente por la utilización de PA, aunque recientemente están resurgiendo los fibrinolíticos directos como la Pln, derivados de la Pln y ALF [112, 113], entre otras. La Fn actúa como nexo de unión entre la coagulación y los componentes fibrinolíticos jugando un papel central en el control del sistema. De este modo, en las primeras etapas de formación del coágulo, tPA y Plg se unen a las hebras de la Fn en formación. Así, se produce una interacción entre las tres moléculas, formando los complejos ternarios y aumentando, en varios cientos de veces, la eficiencia catalítica del tPA hacia el Plg. La degradación de la Fn origina nuevos residuos de lisina, que se traducen en nuevos puntos de anclaje para tPA y Plg. La UK interacciona con el Glu-Plg unido a las lisinas C-terminales en la Fn parcialmente degradada, activándolo de un modo selectivo. Dicho Glu-Plg activará posteriormente y de manera recíproca la sc-UK a UK produciendo una mayor conversión del Plg a Pln.

La acción inicial de la Pln en el trombo acelera la fibrinólisis a través de sistemas de retroalimentación positiva. De este modo, la Pln convierte el Glu-Plg en Lys-Plg, el cual tiene una mayor afinidad por la Fn [114] y convierte el tPA de cadena sencilla en el de cadena doble el cual incrementa su capacidad catalítica, produciendo la hidrólisis del coágulo y exponiendo nuevos sitios de unión para el Plg y el tPA [115].

4.1.2 Inhibidores de la fibrinólisis.

Para que el coágulo sea efectivo debe tener una acción local y ser activo solo durante un periodo de tiempo suficiente como para reparar la herida. La disolución del trombo no debe comenzar hasta que se haya producido la reparación del vaso dañado. Así, el sistema fibrinolítico debe estar controlado en todo momento y, para ello, existen una serie de inhibidores a varios niveles (tabla 2I), donde no solo se controlan de forma

específica los PA (PAI-1 o TAFIa), sino también el sustrato activo primordial de los PA, la Pln (α_2 -AP y también TAFIa). Además, existen otros inhibidores de menor especificidad, pero no por ello de menor importancia, como puede ser la κ -macroglobulina. Durante la formación del coágulo, PAI-1 se une al entramado de Fn controlando *in situ* la actividad de los PA durante la maduración del coágulo, y de existir en las cercanías PA libre, el PAI-1 plasmático (en mayor concentración, tabla 2I) se une al centro catalítico del PA inhibiéndolo y favoreciendo la unión de estos complejos (PA-PAI-1) a la Fn y compitiendo con otras moléculas de PA activas, disminuyendo de forma eficiente el efecto fibrinolítico [116]. A su vez, la trombina, además de iniciar la formación del coágulo, activa mediante hidrólisis proteolítica al TAFI (inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina), convirtiéndolo en TAFIa el cual elimina los residuos de Lys en posición C-terminal, que sirven de anclaje para tPA y Plg, y que de producirse aumentaría considerablemente la fibrinólisis.

Estos hechos, confirman que la actividad fibrinolítica del plasma no solo se define por la presencia en mayor o menor medida del PA, sino también por el nivel de los inhibidores presentes en él. Por ejemplo, el PAI-1, el cual se expresa en individuos sanos en megacariocitos, células musculares lisas y adipocitos, puede incrementar su síntesis y liberación por parte del endotelio y los hepatocitos, bien por efectos fisiológicos o por estímulos patológicos, por ejemplo estrés, lesiones, esteroides, endotoxina, trombina, etcétera [117-121].

4.2 Características del trombo.

La respuesta fibrinolítica también se regula por la composición del trombo; así, por ejemplo, las plaquetas pueden servir de anclaje al Plg y al PA aumentando la generación de Pln [122, 123], pero también limitan la fibrinólisis a través de la secreción de los inhibidores (PAI-1 y AP) almacenados en sus gránulos [124, 125].

Los trombos los podemos clasificar, de un modo macroscópico, en función de su localización interna en el vaso (oclusivos o murales) o en función del tipo de estructura afectada (arteriales, cardíacos, venosos y capilares).

Por otro lado, también los podemos clasificar atendiendo a su composición y análisis anatomopatológico, determinados en parte por las condiciones anteriores como el lugar de origen. Por lo tanto, encontramos:

- Trombos blancos: formados bajo las condiciones de flujo arterial, no son oclusivos, son rugosos y se encuentran adheridos a la pared. Se originan por la lesión de la pared arterial, y están compuestos principalmente de Fv, plaquetas y leucocitos.
- Trombos rojos: se forman en las venas, son oclusivos y se encuentran poco adheridos a la pared, por lo que pueden embolizar. Aparecen por estasis prolongada, y están compuestos principalmente por: eritrocitos y Fv.
- Trombo mixto: se forman tanto en venas como arterias en condiciones de circulación lenta. En estos coágulos se distinguen la región de origen (cabeza), correspondiente con una composición similar a la del trombo blanco, una zona intermedia (cuerpo) en la que se intercalan composiciones de trombo rojo y trombo blanco y una zona final (cola), de composición similar al trombo rojo, muy blanda y que emboliza con facilidad.
- Hialinos: se forman en capilares suelen ser oclusivos, y están formados principalmente por Fv y plaquetas. Sus causas más frecuentes son el "shock" y la coagulación intravascular diseminada.

4.3 El endotelio.

El endotelio normal mantiene la fluidez por la producción de inhibidores de la coagulación y de la agregación plaquetaria, modulando el tono vascular así como su permeabilidad, proporcionando una cubierta protectora que separa los componentes hemostáticos de los componentes subendoteliales reactivos. El endotelio inhibe la coagulación mediante la síntesis y liberación de trombomodulina y heparán sulfato en su superficie; por otro lado modula la fibrinólisis mediante la síntesis y liberación de tPA, UK y PAI-1. Sin embargo, tras la lesión, el endotelio se activa y pierde sus propiedades no trombogénicas (por ejemplo: por el efecto de la trombina, la hipoxia, el flujo turbulento, así como agentes oxidantes, endotoxina, entre otros). Dicha activación endotelial produce la estimulación de la síntesis de PAI-1, liberación de los cuerpos de Weibel-Palade, promoviendo así la adhesión plaquetaria, aumenta la síntesis de quimioquinas, libera microvesículas procoagulantes y expone fosfatidil serina [126]. Todos estos procesos inducen un estado procoagulante. A su vez, el PAI-1 se localiza en la matriz subendotelial previniendo la activación del Plg en los lugares de la lesión vascular, manteniendo la integridad del coágulo hemostático y protegiendo la matriz de su degradación proteolítica. Una vez el coágulo ha cumplido su función hemostática, las células endoteliales pueden

interaccionar directamente con los componentes del sistema fibrinolítico, modulando su actividad. De este modo, el Plg y los PA se unen a las células endoteliales, las cuales, ejercen un efecto de localización y aumento del efecto fibrinolítico en la pared vascular.

5. EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.

Los agentes fibrinolíticos o PA son los fármacos indicados en el tratamiento de episodios agudos de las patologías oclusivas de los vasos sanguíneos [127-131]. En este sentido, la terapia trombolítica representa un conjunto de aproximaciones para lograr la reperfusión del vaso, que se basa en la utilización sistémica, o directamente sobre el trombo lesivo, de estas drogas y se puede complementar con un tratamiento anticoagulante, antiplaquetario, e incluso con estrategias mecánicas. Existen distintos PA utilizados en la práctica clínica, entre ellos encontramos: la estreptoquinasa (SK), la uroquinasa (UK), el activador tisular del plasminógeno (tPA) y algunos derivados del tPA, como son la reteplasa (Ret) y la tenecteplasa (TNK). Sin embargo, la utilización clínica de los PA está limitada a tratamientos agudos a consecuencia de a) sus cortas vidas medias en circulación (minutos) [42, 60, 61], b) sus efectos adversos ocasionados por extravasación a tejidos adyacentes (especialmente en el parénquima cerebral) [132], c) por generar procesos hemorrágicos [133, 134] y d) por actuar indiscriminadamente sobre los coágulos tanto patológicos, como hemostáticos (taponantes de heridas).

Para su administración es necesario evaluar el potencial beneficio clínico (recanalización) y el riesgo de complicaciones graves (como por ejemplo hemorragias intracraneales). En la actualidad, la terapia fibrinolítica representa una fase aguda de un plan antitrombótico dirigido, donde la decisión sobre la relación beneficio/riesgo se relaciona con la agresividad y localización de la oclusión vascular. Además, los PA están contraindicados en pacientes postquirúrgicos pese a que este tipo de pacientes poseen un riesgo 20 veces mayor de padecer procesos tromboembólicos [21, 22]. Por lo tanto, la utilización tromboprolifáctica de los PA *per se* no es viable en la actualidad.

Los PA presentan distintas características en cuanto al tiempo de vida media en circulación, afinidad por la Fn y susceptibilidad frente a inhibidores (tabla 3I y apartado 5.2). Además, pueden generar otras alteraciones locales como la modificación de la tensión vascular [135, 136], la cual puede comprometer el efecto terapéutico final. Por

todo ello y de acuerdo con sus propiedades teóricas, se podría seleccionar un PA para una patología determinada en función de la composición y localización del trombo [137].

En este sentido, todos los PA aprobados han demostrado en pacientes una mejora incuestionable en múltiples ensayos clínicos, por ejemplo tras su administración en pacientes que sufren AMI por oclusión vascular, comparando los distintos agentes fibrinolíticos y sus regímenes de administración (por ejemplo: GUSTO: Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries; COBALT: Continuous Infusion Versus Double-Bolus Administration of Alteplase; ASSENT: Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic Regimen).

5.1 PA de primera generación.

Los primeros PA de uso clínico fueron la UK y la SK, debido a su facilidad de obtención a partir de orina (UK) o de cultivos bacterianos (SK y posteriormente también la UK).

- **UK.**

Como hemos descrito anteriormente, la UK es un PA endógeno que se secreta como zimógeno. Inicialmente se obtenía como la mezcla de la pro-UK de 54 kDa y la UK de bajo peso molecular (32 kDa). Posteriormente, se comenzó a producir a partir de células de riñón de neonatos en cultivo, en forma principalmente de la UK de bajo peso molecular, o la molécula recombinante de alto peso molecular, pro-UK (saruplasa), a partir de cultivos de *E. coli*. UK no muestra especificidad por la F_n lo que permitiría su utilización en cierto tipo de patologías en las que existiesen coágulos accesibles permitiendo la liberación localizada de la droga (por ejemplo, la trombosis venosa profunda) y favoreciendo la lisis del coágulo desde su interior. No obstante, la zimogenicidad de la molécula nativa resulta muy interesante para la obtención de variantes de nuevo diseño (ver tabla 3I).

Múltiples ensayos clínicos han demostrado la eficacia de la UK en el tratamiento del AMI (PRIMI; "Pro-urokinase in Myocardial Infarction Study") [138]. En distintos ensayos clínicos UK ha demostrado la recanalización del tejido en los 60 minutos posteriores a su inyección, y se ha comparado tanto con SK como con tPA. En su comparación con tPA en el infarto de miocardio, ambos fármacos obtuvieron una recanalización similar (SESAM: "Study in Europe Saruplase and Alteplase Myocardial Infarction") [139]. La UK también ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la embolia cerebral, hasta 6 horas desde la aparición de los

síntomas (PROACT I y II: "Prolyse in Acute Cerebral Thrombolysis") [131, 140], y en el de la embolia pulmonar comparada con la SK (USPET: "Urokinase-Streptokinase Pulmonary Embolism Trial")[141].

Es importante señalar que la UK se retiró temporalmente del mercado, en diciembre de 1998, lo que incentivo la experimentación tanto de tPA como de sus derivados de tercera generación.

- **Estreptoquinasa (SK).**

En 1933, se mostró que los *Streptococcus hemolyticus* producían proteínas extracelulares que podían inducir la lisis de coágulos de plasma humanos [35], especialmente los del grupo C. Esta molécula se ha utilizado durante décadas en la terapia trombolítica [142]. La SK no es un enzima *per se*, pero forma complejos 1:1 con el Plg, produciendo un cambio conformacional, que expone el sitio catalítico del Plg y provoca la hidrólisis autocatalítica generando PIn [143]. Los complejos mantienen la capacidad de unión del Plg y están relativamente protegidos de su inhibición por la AP. Uno de los principales problemas de la SK, además del riesgo hemorrágico asociado a los agentes fibrinolíticos, es su elevada antigenicidad. De echo, la mayor parte de la población muestra Ac anti SK [144]. La SK posee un $t_{1/2}$ de 15-30 minutos en su forma asociada al Plg, frente a los 3 minutos que muestra en forma libre y se elimina principalmente por el hígado a través de los receptores de α_2 -macroglobulina [145].

5.2 PA de segunda generación.

Puesto que los PA de primera generación producían una plasminogenemia sistémica con el consecuente riesgo de sangrado, se buscaron nuevas variantes en las que aumentase la especificidad por los lugares patológicos en los que existen depósitos de Fn. De este modo surge la alteplasa (tPA recombinante), la cual muestra una ineficiente actividad fibrinolítica en ausencia de Fn mientras que en su presencia ésta aumenta cientos de veces.

- **Alteplasa (tPA).**

Se trata de la molécula de tPA recombinante (véase apartado 3.1.1), obtenida a partir de las células de ovario de hámster chino. Esta molécula es el único fibrinolítico aprobado por la "Food and Drug Administration" (tabla 3I) para el

tratamiento de la tromboembolia cerebral. El tPA se ha convertido rápidamente en la molécula de referencia de los PA en múltiples ensayos clínicos para el tratamiento del AMI, de la embolia cerebral, o en el tratamiento de la tromboembolia pulmonar, implicando a cientos de miles de pacientes en los distintos ensayos clínicos (GUSTO [127]; ASSENT [146]; COBALT [147]; ATLANTIS [148]: "Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischaemic Stroke"; ECASS [149]: "European Cooperative Acute Stroke Study"; PAIMS [150]: "Plasminogen Activator Italian Multicenter Study"; NINDS [151]: "National Institute of Neurological Disorders and Stroke", entre otros). Sin embargo, el $t_{1/2}$ en circulación es muy corto (<5 minutos) y se inhibe rápidamente por PAI-1. Su administración se realiza mediante un bolo simple seguido de la infusión de la droga, con dosis ajustadas al peso del paciente, haciendo necesaria su administración en el entorno hospitalario y, por tanto, limitando su aplicación perihospitalaria (por ejemplo en los traslados en ambulancia), lo cual puede aumentar el tiempo de actuación terapéutica desde la aparición de los síntomas.

Dado que la vida media es muy corta y requiere una infusión continuada, las concentraciones de droga obtenidas en sangre son a menudo superiores a las necesarias, por lo que se favorece no solo la acción vascular deseada de tPA, sino que también se produce su extravasación, especialmente lesiva en el parénquima cerebral, donde su transmigración se ve favorecida por los receptores LRP. El tPA una vez alcanza el tejido cerebral puede producir la muerte neuronal excitotóxica, a través de los receptores NMDA [4], o por anoikis al degradar la matriz extracelular por la activación del Plg [152].

5.3 PA de tercera generación.

Los PA de tercera generación surgen con la intención de aumentar la biodisponibilidad de las drogas y facilitar su aplicación. De este modo, se diseñaron agentes derivados de la molécula de tPA, bien por delección de determinados residuos de la molécula original, Ret, o bien por mutaciones puntuales en puntos de control de la eliminación o en zonas responsables de la interacción con la Fn o con su inhibidor principal, TNK. Esto genera moléculas con una mayor biodisponibilidad que aumentan la vida media de la droga en circulación ($t_{1/2}$ de tPA= 2-5 minutos, $t_{1/2}$ Ret y TNK= 15-20 minutos) y facilitan su aplicabilidad incluso en el ambiente extrahospitalario (en el

traslado en ambulancia, por ejemplo), reduciendo así el tiempo transcurrido entre la aparición de los síntomas y su administración [153].

	PA	Características	Aplicaciones/ Régimen	t _{1/2} (min.)
tPA y derivados	tPA	F-EGF-K1-K2-P.	PE, MI, VC/S, ACV/Infusión	<5
	Tenecteplasa	F-EGF-K1-K2-P con glicosilación modificada; resistencia al PAI-1 [154].	MI, ACV*/Bolo simple	15
	Retepplasa	K2-P; no glicosilada [155].	MI, PAO*/doble bolo	15
	Lanoteplasa	K1-K2-P; no Asn117 [156].	MI*/Bolo simple	47
	Monteplasa	Cys84Ser [156].	MI*	--
	Pamiteplasa	F-EGF-K2-P; Arg275Gly[156].	MI*	--
UK y derivados	UK	EGF-K-P.	PE, MI, VC/S, HO, DVT*, PAO*/ Infusión	<5
	Amediplasa	Amediplasa: K2(tPA)-P(UK) [157, 158].		
Derivados bacterianos.	Estreptoquinasa	Reacciona con el Plg en una reacción 1:1 permitiendo la autocatálisis del Plg convirtiéndose en Pln.	PE, MI, VC/S,DVT, PAO/Infusión	20
	Anistreplasa	Derivado anisolado de la SK. Los complejos formados posee una mayor especificidad por la Fn que SK produciendo una menor fibrinogenolisis sistémica y menor consumo de Plg y AP [159].	MI/Bolo	70
	Estafiloquinasa	PA de 15 kDa producida por <i>Staphylococcus aureus</i> . SFK forma complejos estables con el Plg, pero en ausencia de Fn no lo activa. Esto se produce porque las trazas de Pln que se encuentran en el trombo convierten los complejos en SFK-Pln (activo). Posee una elevada selectividad por la Fn [36]. Muestra antigenicidad.	MI/Infusión.	6
Variantes de la desmoteplasa (DSPA)	Elevada homología con el tPA [160], menor eliminación, elevada afinidad por la Fn [161], menores efectos neurotóxicos [162-165], por lo que se está estudiando para su utilización en la embolia cerebral [166, 167]		ACV*/ Infusión	17
	DSPA α -1	43 kDa; F-EGF-K-P, no hidrolizable por Pln.		
	DSPA α -2	39 kDa; F-EGF-K-P, no hidrolizable por Pln.		
	DSPA β	EGF-K1-K2-P		
	DSPA γ	K1-K2-P		

Tabla 3I. Activadores del plasminógeno. En la tabla se indican las características de distintos PA en función de su origen y sus aplicaciones aprobadas por la FDA o la Agencia Europea del Medicamento (las aplicaciones que se encuentran en ensayo clínico se encuentran señaladas con *). Los distintos dominios estructurales del tPA (o dominios que muestran homología estructural): F-EGF-K(1-2)-P. Activadores del plasminógeno derivados de la saliva de *Desmodus rotundus*: DSPA; embolia pulmonar: PE; infarto miocárdico: MI; accidente cerebrovascular (obstructivo): ACV; vía central trombosada/shunt: VC/S; obstrucción arterial periférica: PAO; hemorragia intraocular: HO; trombosis venosa profunda: DVT.

- **Retepласa (Ret).**

Consiste en la variante de delección del tPA de cadena sencilla y no glicosilada, de síntesis bacteriana. Esta molécula comprende los aminoácidos 1-3 y 176-527, o lo que es lo mismo los dominios K2 y el dominio proteásico (fig. 4I a). Mantiene el sitio de hidrólisis por Pln (Arg275-Ile) [168]. Dado que en este mutante se han eliminado los dominios F-EGF-K1 y la glicosilación, Ret goza de un menor reconocimiento hepático, aumentando, de este modo, su vida media en circulación (15-20 minutos). Como carece del dominio F muestra una menor afinidad por la Fn, en comparación con la presentada por el tPA. La administración de esta droga se realiza mediante doble bolo sin ajustar al peso del paciente.

Es importante destacar que las unidades de Ret no se corresponden con las unidades de los otros PA, como se indica en su ficha técnica. Ret se ha comparado con tPA y SK, en pacientes con infarto de miocardio en múltiples ensayos clínicos, en los cuales ha demostrado superioridad o al menos no inferioridad, sola con distintos regímenes de administración o en combinación con abciximab (RAPID I y II [169], GUSTO III [170], TIMI 14 [171], GUSTO V [172], SPEED [173], ER-TIMI [153] e INJECT [174], entre otros). Si bien Ret produce una reperfusión más rápida, en comparación con el tPA, no muestra beneficios en la supervivencia a largo plazo ni disminuye de un modo significativo las hemorragias intracraneales. Sin embargo, al compararlo con SK no hubo diferencias con la mortalidad a 35 días, aunque sí se redujeron los problemas hemorrágicos. Reteplasa posee también un elevado potencial fibrinolítico en distintas enfermedades tromboembólicas, como pueden ser la recanalización de arterias o venas periféricas (RELAX) [175] o la tromboemolia cerebral [176], si bien estas aplicaciones no están aprobadas.

- **Tenecteplasa (TNK).**

Esta molécula tomó su nombre por las mutaciones puntuales realizadas en el tPA. Se sustituyen mediante mutagénesis dirigida los siguientes aminoácidos: en el K1 Thr103 por Asn (T103N) y Asn117 por Gln (N117Q), cambiando el patrón de glicosilación de la molécula, lo que incrementa su tiempo de vida media ($t_{1/2}$ = 15 minutos) al disminuir su eliminación hepática y en el dominio proteásico se sustituyen los aminoácidos Lys296-His297-Arg298-Arg299 (K296-H-R-R299) por una tetra-alanina, lo que le confiere la resistencia frente a su principal inhibidor el PAI-1 (fig. 4I b) [177]. Esta molécula además de mostrar una mayor selectividad

por la Fn facilita el régimen de administración, puesto que se realiza una única inyección en bolo ajustado al peso del paciente.

La TNK se ha utilizado también en diferentes ensayos clínicos en pacientes con AMI, demostrando una reperfusión más rápida del tejido que la obtenida mediante tPA en los primeros 90 minutos [178]. Sin embargo, la mortalidad a los 30 días y complicaciones de hemorragias cerebrales son similares a las del tPA (ASSENT-2: "Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic Regimen"), mientras que las complicaciones hemorrágicas no cerebrales aumentan [146].

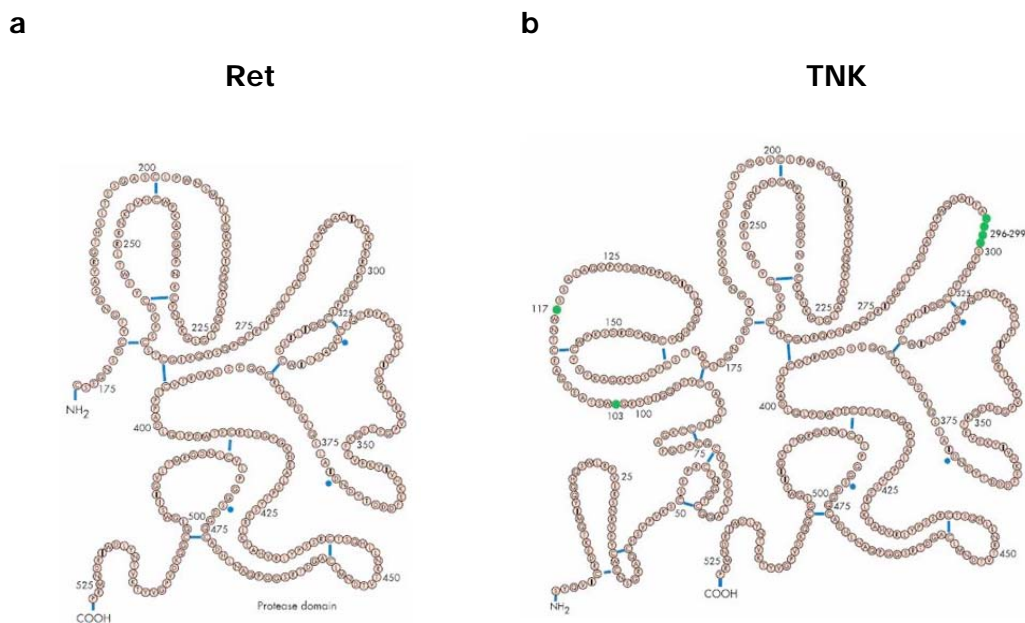


Figura 41. Derivados del tPA aprobados por la FDA. Modificado de: "Thrombolysis: newer thrombolytic agents and their role in clinical medicine" [42].

6. DIRECCIONAMIENTO DE FÁRMACOS.

Los sistemas de liberación de drogas se definen como formulaciones o dispositivos capaces de introducir una sustancia terapéutica en el organismo mejorando así su eficacia y su seguridad, tanto mediante el aumento de su vida media en circulación, lo cual disminuye la necesidad de dosis elevadas y con ello los efectos secundarios asociados, como aumentando la especificidad de su liberación en el organismo, consiguiendo un efecto más localizado en el sitio donde la droga debe ejercer su acción terapéutica o diagnóstica.

Existen múltiples sistemas de direccionamiento de fármacos, los cuales se pueden clasificar en función de: la sustancia transportada, su formulación, su vía de administración (gastrointestinal, parenteral, transmucosa, pulmonar, transdérmica o intraósea), así como en función del tejido diana (cardiovascular, sistema nervioso central u órganos concretos). No obstante, nosotros nos centraremos en la clasificación en función del agente portador utilizado:

a) Sistemas particulados: microsferas, cristales, liposomas, nanopartículas y micelas.

- **Microsferas y microcápsulas:** las microsferas consisten en el sobrecruzamiento de proteínas, las cuales forman transportadores biodegradables. Están diseñadas para la liberación de sustancias pequeñas y se diferencian de las microcápsulas en que éstas últimas poseen una membrana que rodea el núcleo. Ambos agentes portadores se han utilizado para encapsular proteínas, mimetizar sistemas de secreción, direccionar sustancias a través de la barrera hematoencefálica, embolizar tumores portando agentes quimioterapéuticos, formular compuestos para la liberación pulmonar y absorción nasal, liberar de un modo controlado antígenos u oligonucleótidos antisentido y encapsular DNA [179, 180].
- **Cristales:** son micropartículas cristalizadas que se han utilizado en la preservación de drogas y vacunas durante su transporte o almacenamiento, previniendo su desnaturalización [180].
- **Liposomas:** son vesículas microscópicas formadas por fosfolípidos y otros lípidos anfipáticos, los cuales varían en su tamaño, carga y composición. Los liposomas pueden transportar sustancias lipófilas (como quimioterapéuticos), proteínas y DNA.

Además, se les pueden unir Ac y polietilén glicol (PEG), para mejorar su localización final o su biodisponibilidad, respectivamente [181].

- **Nanopartículas:** están compuestas de polímeros biodegradables (ej PEG, quitosán -ácido láctico/ácido glicolítico-). Estas partículas pueden portar proteínas y toxoides y pueden atravesar mucosas. Aquí encontramos también las micelas poliméricas, las cuales encapsulan drogas poco solubles y pueden reducir la toxicidad de ciertas sustancias [182].

b) Direccionamiento por afinidad.

Podemos distinguir distintas interacciones biológicas en el organismo:

- **Sistemas mediados por anticuerpos:** los sistemas de direccionamiento pueden utilizar las macroglobulinas, o partes de ellas (las fracciones variables de Ac, scFv; “nanobodies”) como plataforma de direccionamiento. La ventaja de estos sistemas es que pueden ser dirigidas específicamente al lugar que exprese el epítipo reconocido. Por lo tanto este sistema requerirá menores cantidades de droga, disminuyendo o eliminando los efectos adversos. La utilización de Ac se encuentra muy extendida, gracias a su afinidad específica y estabilidad de unión (cuya K_d suele oscilar entre 10^{-6} y 10^{-12} M). De este modo, se han utilizado ampliamente en múltiples terapias bien establecidas, como los Ac anti-VEGF, o como marcadores diagnósticos [183]. Estos Ac pueden llevar diferentes moléculas asociadas, bien sea por conjugación química [184] o ingeniería genética [185, 186]. Otra posibilidad puede ser su conjugación a otros sistemas portadores más complejos (ver apartado a, por ejemplo los inmunoliposomas).
- **Sistemas mediados por receptores:** en este caso se aprovecha la unión de los agentes terapéuticos a un ligando determinado, aprovechando la especificidad de éste por su receptor. Así, se pueden direccionar macromoléculas hacia el interior de células determinadas o cambiar su localización celular habitual por otra bien distinta. Se han utilizado múltiples receptores diana para el direccionamiento como son los de transferrina, los de LDL, los uPAR y asialoglicoproteínas, entre otros [180, 187-189].

c) Direccionamiento con sistemas “vivos”.

Este tipo de direccionamiento se basa en la capacidad de ciertos organismos, normalmente de origen vírico (retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, poxvirus y alfavirus), para localizar una determinada sustancia (generalmente de naturaleza génica) en un tipo celular determinado [190, 191]. Pero también, engloba la

capacidad de ciertas células exógenas (bacterias gram negativas o células transducidas) o endógenas (macrófagos, plaquetas, RBC, etcétera) capaces de portar y mantener al agente terapéutico en un determinado compartimento orgánico [192].

6.1 Direccionamiento mediante RBC.

En la presente tesis doctoral nos vamos a centrar particularmente en este sistema de direccionamiento. El uso de los RBC como portadores terapéuticos se inició a principios de los 70, basado en una serie de ventajas que los hacía muy interesantes (fig. 5I) y que radican en que I) son células propias, disminuyendo el rechazo por parte del paciente, II) poseen un tamaño considerable, frente al de otros sistemas portadores, que permite administrar fácilmente dosis terapéuticas, III) disfrutan de una vida media prolongada (aprox. 2 meses en el humano) lo que favorece el aumento considerable de los $t_{1/2}$ de determinadas drogas en circulación, favoreciendo su biodisponibilidad y reduciendo sus dosis administradas, IV) localizan y/o liberan la droga en el torrente circulatorio, limitando sus efectos secundarios sobre otros compartimentos y V) permiten la incorporación y circulación de la droga tanto en su superficie, como en su interior celular, desde donde puede estar expuesta constantemente a las proteínas sanguíneas, o bien protegida, si fuese necesario, de sus inhibidores plasmáticos. La utilización de los RBC como transportadores de fármacos ha sido ampliamente revisada [192-197] y dadas estas interesantes características, la comunidad científica ha mostrado un gran interés, llegando incluso a elucidar su proteoma e interactoma [198, 199] o a pensar en el desarrollo de RBC sintéticos [200, 201].

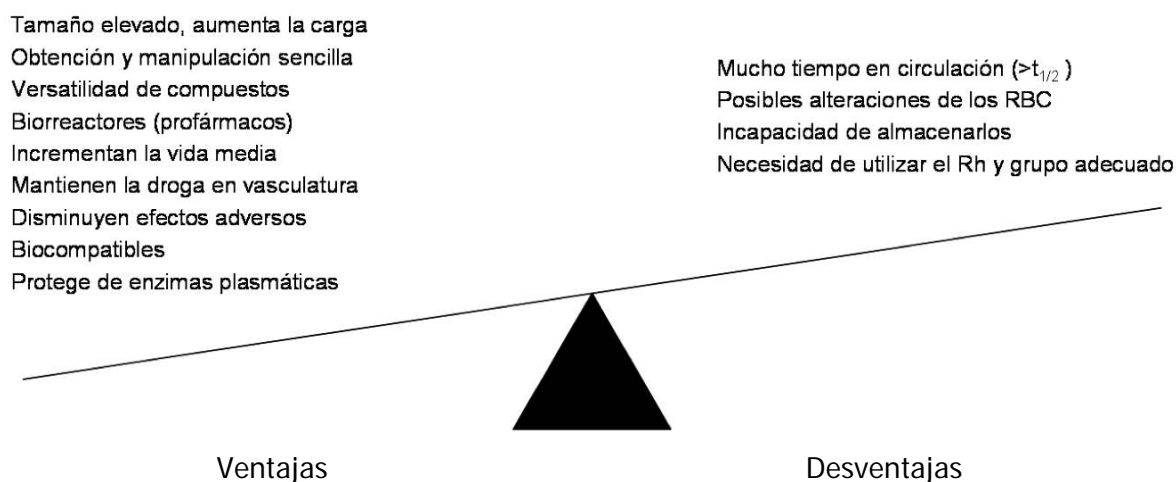


Figura 5I. Ventajas y desventajas de los RBC portadores: nuestro punto de vista.

Los primeros ensayos terapéuticos comenzaron con el uso de los RBC como portadores de sustancias encapsuladas, sobre todo enzimas, en terapias de remplazo enzimático (por ejemplo, enfermedad de Gaucher) [202, 203]. Posteriormente, se han utilizado para el direccionamiento de fármacos hacia el sistema retículo endotelial [204, 205], el uso en terapias antineoplásicas [206], antiparasitarias [207], antimicrobianas (bactericidas [208] y antivíricos [209]), profármacos [209], contrastes [210], liberación de vitaminas o de corticoesteroides [211]. No podemos olvidar que los RBC ocupan el torrente circulatorio y esto les abre las puertas al uso frente a terapias de índole vascular, utilizando los RBC como transportadores de fármacos que actúan sobre el sistema renina-angiotensina [212, 213] o como el direccionamiento de PA [214]. Aunque también podría ser interesante en el tratamiento de lesiones ateroscleróticas y su entorno, donde los RBC se encuentran elevados, no solo por la generación de nuevos vasos, sino por el efecto de extravasación asociado a la ruptura de la pared vascular [215].

De estos ejemplos se infieren dos métodos de generación de eritrocitos portadores, atendiendo a la forma en la que la droga se incorpora al RBC: la encapsulación de la droga en el interior del RBC y el recubrimiento de ésta en la superficie eritrocitaria.

6.1.1 Sistema de encapsulación.

Como ya se ha citado anteriormente, este sistema radica en la incorporación de la droga al interior eritrocitario, de donde posteriormente difundirá, fundamentalmente de forma pasiva, al torrente circulatorio. Existen distintos métodos por los cuales se pueden encapsular distintas drogas en los RBC, pero cualquiera de ellos tiene que preservar la estabilidad del RBC portador en circulación. Así encontramos, I) métodos osmóticos: hemólisis hipotónica, dilución hipotónica, diálisis hipotónica, "preswelling" hipotónico, pulso osmótico, lisis isotónica osmótica [195, 197]; II) electroporación o apertura de poros en la superficie eritrocitaria mediante choque eléctrico; III) endocitosis inducida por fármacos (ej. anfotericina B) [216] y IV) endocitosis y fusión lipídica.

El transporte de la droga en circulación se hace por tanto en el interior eritrocitario, donde el agente terapéutico se encontrará a salvo de las proteasas y otras enzimas de la sangre, pero por otro lado y pese a que la carga enzimática del citoplasma eritrocitario es limitada, siempre puede haber un cierto efecto de la misma sobre el fármaco. No obstante, este último hecho, lejos de parecer un problema a tener en cuenta, también

puede ser beneficioso, por ejemplo para encapsular drogas que deban ser activadas por las enzimas citoplasmáticas del RBC [209].

6.1.2 Direccionamiento de fármacos mediante RBC modificados en su superficie.

El otro gran sistema, y aquel utilizado en el presente trabajo doctoral, se centra en el sistema de conjugación de la droga a la superficie eritrocitaria. Dicha conjugación podría ser englobada en tres aproximaciones generales:

a) Sistemas mediados por estreptavidina (SA)-biotina.

La unión SA-biotina es la unión biológica no covalente más fuerte conocida ($K_d=10^{-14}$ M). La elevada afinidad y especificidad de la SA por la biotina, y la posibilidad de modificar cualquier molécula con reactivos que incluyan residuos de biotina, convierten a este sistema de conjugación en un sistema universal. Dicho sistema puede ser incluso modulado no solo por los reactivos de biotina empleados y el tipo de molécula biotinilada, sino también por modificaciones tanto químicas como genéticas de la propia molécula de SA [217]. Modificaciones que pueden alterar la estructura tetramérica natural de la SA y, por extensión, su afinidad y reversibilidad de unión sobre biotina [217-220], aumentando aún más, si cabe, la polivalencia del modelo. De esta manera, esta aproximación genera una droga conjugada a la superficie eritrocitaria mediante reactivos de biotina intercalados en la droga y en las proteínas de superficie eritrocitarias, unidos posteriormente, mediante la ayuda de la SA o molécula afín a ella. La extensión de la modificación con biotina, es controlada, exhaustivamente en todo momento, con el fin de no afectar ni a la viabilidad eritrocitaria ni a la actividad del agente terapéutico. Además, este proceso proporciona un alto número de residuos de biotina incorporados sobre la superficie eritrocitaria (hasta 4×10^5 /célula), lo cual permite alcanzar fácilmente dosis terapéuticas. Es interesante citar que la modificación eritrocitaria con el reactivo de biotina es un procedimiento usado en la clínica para realizar eritrocinéticas [221] y, por tanto, en aplicaciones clínicas, la biotinilación de RBC proporciona células perfectamente biocompatibles. Además, trabajos preliminares demuestran la posibilidad de realizar la biotinilación eritrocitaria directamente in vivo [222], lo cual facilitaría en gran medida la aplicación del modelo en protocolos clínicos.

Como ejemplos de este sistema de conjugación a los eritrocitos podríamos citar, entre otros, la unión de Ac específicos con el fin de generar inmunoeritrocitos [223], activadores del plasminógeno [196, 224, 225] o determinados receptores [189].

b) Sistema mediado por conjugación química entre el anticuerpo y la droga.

Otra vía de unión de fármacos al eritrocito se basa en el anclaje de estos mediante el uso de anticuerpos que reconozcan epítomos determinados de su superficie. La unión de las proteínas al anticuerpo se puede realizar a partir de varios sistemas que incorporen residuos reactivos tanto en el anticuerpo como en la droga que posteriormente reaccionan entre sí. De esta manera, se han usado métodos como el sistema de biotina/estreptavidina mencionado en el apartado anterior, o también mediante conjugación química directa a través de reactivos bifuncionales (SATA-SMCC) mediante el cual se intercalan en cada molécula residuos cohesivos, para generar mediante enlace covalente, un conjugado final Ac-droga que posteriormente se una al RBC portador. Al igual que en el caso de la modificación de las drogas con biotina, la inserción de estos residuos bifuncionales en las moléculas seleccionadas es altamente controlado para no alterar la funcionalidad o estabilidad de las moléculas modificadas. Ejemplos de este método quedan recogidos en trabajos donde se generan anticuerpos que reconocen al eritrocito, como el anticuerpo contra el receptor del complemento 1 (CR-1), expresado en la superficie de los RBC de primates y humanos [184]. Estos pueden ser conjugados con otros anticuerpos que reconocen un patógeno en circulación [226] y servir, bien para su eliminación o la inducción de procesos inmunológicos de defensa (ejemplo generación de vacunas), o bien para conjugar enzimas de acción sanguínea, por ejemplo los PA [184]. Sin embargo, las aproximaciones realizadas mediante este anticuerpo frente a CR-1, pese a permitir la conjugación de la molécula terapéutica al RBC directamente *in vivo*, posee una unión muy limitada ($1,2 \times 10^3$ moléculas/RBC) y una restricción muy importante en el ámbito de laboratorio, debido a su única expresión en la superficie eritrocitaria de humanos y primates [184].

c) Formación de proteínas de fusión.

Durante las últimas décadas la producción de proteínas recombinantes se ha convertido en una herramienta rutinaria. Las proteínas de fusión consisten en la combinación de las propiedades de distintas proteínas en una sola mediante ingeniería genética. Actualmente, existen múltiples métodos de producción proteica, por lo tanto, es muy importante escoger cuidadosamente la estrategia de obtención de proteínas

recombinantes en base a múltiples criterios. El sistema de elección dependerá por lo tanto del tamaño de la proteína, de las cantidades requeridas, de las modificaciones postraduccionales necesarias o del sistema de extracción de la proteína generada (tabla 41).

Modificación postraducciona	Sistema de expresión			
	<u>E. coli</u>	<u>Levaduras</u>	<u>Células de insecto</u>	<u>Células de mamífero</u>
N-Acetilación	Si	Si	Si	Si
Amidación	No	Si	Si	Si
Gamma-Carboxilación de glutamato	No	No	No	Si
N-Glicosilación	No	Si	Si	Si
O-glicosilación	No	Si	Si	Si
Heterodimerización	Si	Si	Si	Si
Hidroxilación	No	Si	Si	Si
Miristoilación	Si	Si	Si	Si
Palmitoilación	No	Si	Si	Si
Fosforilación	Si	Si	Si	Si
Procesado proteolítico	No	Si	Si	Si
Sulfatación	No	No	Si	Si
Eliminación de Met N-terminal	Parcial	Parcial	Si	Si

Tabla 41. Tomado de "Choice of cellular protein expression system".[227]

De este modo, se han generado proteínas de fusión entre Ac o sus derivados (ej. cadena sencilla de la fracción variable, scFv) y otras drogas [77-79, 185, 228, 229] para su conjugación directa a los eritrocitos. No obstante, existen otras aproximaciones interesantes en el desarrollo de proteínas de fusión que conjugan un agente entrecruzante como la SA con una proteína terapéutica [230] y que nos da pie al desarrollo de nuevos sistemas de conjugación de drogas a los RBC.

6.1.3 Eritrocitos portadores de fibrinolíticos: la tromboprofilaxis a la carta.

En el tratamiento agudo de las enfermedades oclusivas de los vasos sanguíneos, la terapéutica farmacológica actual solo cuenta con los agentes fibrinolíticos. Como ha quedado ampliamente revisado (apartado 5), estas drogas tienen una vida media muy corta y unos efectos secundarios de consideración, los cuales no han mejorado sustancialmente con el diseño farmacéutico (por ejemplo, TNK [231]). En el entorno del laboratorio, han sido interesantes los trabajos desarrollados para mejorar el perfil farmacocinético y de seguridad de los PA, a) mediante su direccionamiento con anticuerpos, que los localicen sobre la Fn [232, 233] o que los localicen sobre ciertas áreas vasculares específicas (endotelio patológico [234-236] o vasculatura pulmonar [77,

185, 229]), o b) mediante liposomas portadores de PA activables por ultrasonidos [237]. Sin embargo, la incorporación de los eritrocitos como portadores de los PA se descubre como un sistema muy interesante y que incluso ofrece una aplicación clínica actualmente inexistente: la trombopprofilaxis con PA. Esto adquiere gran importancia en un grupo de pacientes determinado, por ejemplo, los procesos trombóticos, como el AMI, la embolia cerebral y la embolia pulmonar, son muchas veces recurrentes a las horas o en los días siguientes al primer episodio [238]. Además, este riesgo está aumentado en pacientes inmobilizados, especialmente por cirugías ortoprotésicas, traumatológicas, vasculares y cirugías mayores [239]. El riesgo hemorrágico de los pacientes de postoperatorio es también muy elevado, lo que complica aún más el ataque de los coágulos patológicos. No obstante, y a pesar de conocerse el elevado riesgo trombótico o la recurrencia de estos procesos en los pacientes citados, la terapéutica convencional solo prevé el uso de agentes antiplaquetarios y de agentes anticoagulantes. De hecho, la utilización de los PA de uso cotidiano está especialmente contraindicado por su escasa vida media (que hace que sean necesarias dosis elevadas), sus importantes efectos secundarios, que potencian la letalidad de la enfermedad de estos pacientes, pero sobre todo, por su ataque indiscriminado no solo al coágulo patológico, sino también al hemostático (el taponante de la herida en los pacientes postoperatorios). Por otro lado, en el caso de los agentes anticoagulantes o antiplaquetarios, su protección también es limitada y aumentan considerablemente el riesgo de sangrado, especialmente tras la cirugía. Asimismo, algunos agentes anticoagulantes, como por ejemplo las cumarinas (warfarina y acenocumarol), requieren varias horas para poder ejercer dicho efecto, lo que los convierte en agentes inadecuados para una trombopprofilaxis aguda y un control escaso para el ajuste de su posología crónica lo que compromete la trombopprofilaxis mantenida. Por todo ello, la utilización de los RBC-PA ofrece numerosas características plausibles para su uso trombopprofiláctico pero las más importantes se centran en: I) el aumento considerable de la vida media de la droga conjugada, lo cual disminuye la dosis inicial administrada y con ello el número de efectos secundarios, II) su presencia en todo momento en circulación asociado a la superficie eritrocitaria, lo que limita los problemas de difusión a tejidos no deseados (por ejemplo en el parénquima cerebral [224]) o al entorno del coágulo hemostático y III) la incorporación selectiva a los coágulos patológicos nacientes, potenciando su disolución desde su interior (fig. 6I). Además, existen otras características muy interesantes que potencian su aplicabilidad, como son la limitación del efecto indiscriminado del PA mantenido en circulación sobre las proteínas

plasmáticas [214], protegiendo los niveles de Fg ó Plg circulantes, o la preservación de la actividad del PA al limitar el efecto de los inhibidores plasmáticos sobre el PA conjugado [240].

La generación de estos complejos trombotrópicos, RBC-PA, se ha investigado anteriormente mediante el uso de aproximaciones complejas para su uso clínico. Por ejemplo, la producción escalonada de los RBC biotinilados asociados a los PA biotinilados a través de la intermediación de la SA [214, 224]. Pero también se han tratado de abordar sistemas de formación directa en circulación como es el caso de la conjugación del PA a un anticuerpo contra CR-1 [184] o el desarrollo de proteínas de fusión que conjugaban los núcleos activos del scFv contra glicoforina A y el PA [79, 228].

El presente trabajo surge con la intención de mejorar la aplicabilidad clínica a medio plazo mediante el diseño de un sistema directo y controlable de conjugación del PA al eritrocito portador, que preserve aún más su efectividad en circulación y limite su acción más allá del período de riesgo protrombótico del paciente, generándose una especie trombotrófica con antídoto limitante.

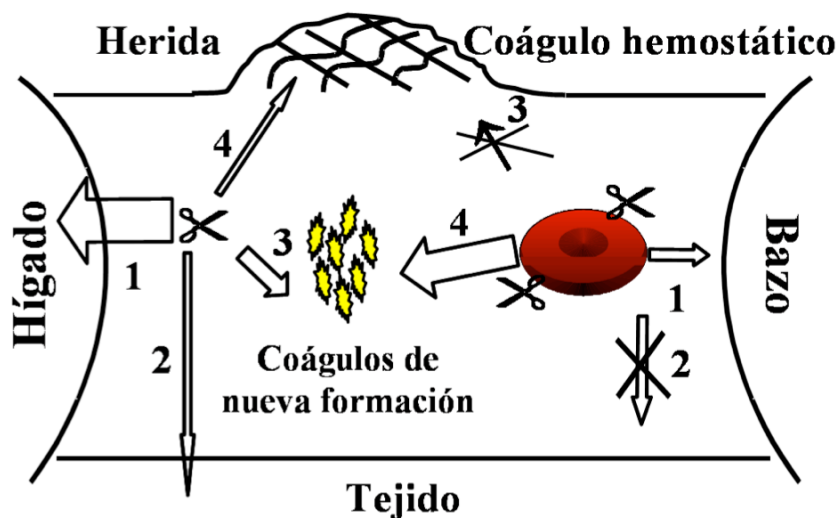


Figura 6I. Ventajas trombotróficas de los RBC-PA frente al PA libre. Tomado de: "Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes" [214]. Representación esquemática de los efectos del PA libre (tijeras) comparados con los RBC-PA. PA libre: 1 rápida eliminación principalmente vía hepática; 2 extravasación a los tejidos adyacentes; 3 actúa sobre los coágulos en formación; 4 actúa sobre los coágulos hemostáticos. RBC-PA: 1 su eliminación es menor y principalmente a través del RES del bazo; 2 no se extravasa a los tejidos adyacentes; 3 no actúa sobre los coágulos hemostáticos; 4 restringen su actividad sobre los coágulos nacientes.

OBJETIVOS

En el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Comparar la capacidad fibrinolítica real de los distintos PA utilizados en la práctica clínica (tPA, Ret, TNK y UK), con el fin de mejorar la selección de estas drogas en determinadas aplicaciones clínicas. Para ello realizaremos un estudio comparativo *in vitro* e *in vivo* de los diferentes PA en función de:

- Su capacidad plasminogenolítica.
- Su susceptibilidad frente a los inhibidores plasmáticos.
- Su afinidad por la Fn y su capacidad de difusión hacia el interior del coágulo.
- Sus concentraciones molares y no en función de datos aproximados dependientes de los controles de cada compañía o que incluyen la acción de otros agentes asociados en la fórmula farmacéutica (L-arginina, L-lisina o ácido aminocaproico).

2. Formar conjugados covalentes SA-PA para la generación directa de complejos RBCb/SA-PA, mejorando su posible aplicabilidad clínica. Para ello estudiaremos:

- La selección del PA más adecuado para la formación de los conjugados covalentes SA-PA.
- La formación de conjugados, principalmente bimoleculares, que eviten interacciones múltiples entre distintos RBCb.
- La unión y estabilidad de los complejos RBCb/SA-PA.
- La aparición, o no, de agregados eritrocitarios, que limitarían su viabilidad.
- La actividad fibrinolítica de los complejos finales.

3. Diseñar, producir, purificar y testar *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* diferentes FP que puedan utilizarse como profármacos para una fibrinólisis inteligente mediante su direccionamiento con RBC. Para ello realizaremos los siguientes pasos:

- Seleccionar el PA a fusionar comparando moléculas zimogénicas frente a moléculas que muestran una resistencia específica ante determinados inhibidores.
- Diseñar una FP entre el núcleo activo de la SA y el de un PA de diseño, que mantenga tanto la capacidad de unión a la biotina del núcleo de SA como las propiedades enzimáticas del agente fibrinolítico.
- Producir y purificar la FP de interés en el sistema celular seleccionado (células S2 de insecto).

- Determinar el rendimiento de la purificación, la estabilidad y la actividad de la proteína obtenida.
- Comparar la actividad enzimática de las FP libres con las de la FP unida a RBC, así como evaluar la estabilidad de los RBC/SA-PA y su posible viabilidad posterior *in vivo*.
- Realizar las farmacocinéticas y analizar la biodistribución vías de eliminación de los RBC-PA durante periodos prolongados (24 horas).
- Analizar el potencial tromboprolifático de los complejos RBC-FP.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS.

Utilizamos los siguientes reactivos: NHS-LC-biotina [succinimidil-6-(biotinamido)-hexanoato], NHS-LC-LC-biotina [succinimidil-6-(biotinamido)-6-hexanamido-hexanoato], Sulfo-NHS-LC-biotina [sulfosuccinimidil-6-(biotinamido) hexanoato] como agentes biotinilantes; SATA (*N*-Succinimidil S-acetiltioacetato) como donador de grupos sulfhidrilo tras su activación por la hidroxilamina (NH₂OH) y sulfo-SMCC [SMCC; sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato] como donador de grupos maleimido o aceptores de grupos sulfhidrilo, reactivo de Ellman [ácido 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoico)] para la determinación de los grupos sulfhidrilo; isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Dylight 633 NHS-éster como fluoróforos para el marcaje de proteínas, todos ellos de Pierce.

Para el marcaje radiactivo de proteínas y eritrocitos se utilizaron Na¹²⁵I y Na₂⁵¹CrO₄ respectivamente de Perkin-Elmer. Sigmacote[®], trombina, fibrinógeno bovino, PAI-1, inhibidor de carboxipeptidasa derivado de patata (PCI), acrilamida/bisacrilamida (40%), ácido tricloroacético (TCA), lecho de columna de afinidad M2 y azul de Coomassie (R-250) de Sigma. Activadores del plasminógeno: alteplasa, tPA (Activase[®]) y tenecteplasa, TNK (TNKase[®]) de Genentech; reteplasa, Ret (Retavase[®]) de Centocor; uroquinasa, UK (Urokinase[®]) de Vedim. Estreptavidina, Fg humano libre de plasminógeno y glu-plasminógeno de Calbiochem. El plásmido de expresión en células de insecto (pMT/Bip) que contiene la secuencia de la UK-T [77, 78, 241] y las scFv fusionadas con la variante de ratón de la tenecteplasa, mRK, o con UK-T [228, 241] fueron donados amablemente por el Dr. V.R. Muzykantov ("Institute for Environmental Medicine" y "Department of Pharmacology", Universidad de Pensilvania, Filadelfia, EEUU). El plásmido de expresión en *E.coli* (pET21a) que contiene la secuencia del núcleo de SA (GenBank DQ376186) [218] fue donado gentilmente por la Dra A.Ting ("Department of Chemistry", Massachussets, Instituto de Tecnología, Cambridge, Massachussets, EEUU). Las proteínas de fusión, FP, de la SA fusionada con UK de bajo peso molecular activable por trombina (UK-T) y la fusión con la mutación D117A de la SA fueron generadas en el laboratorio. Para el clonaje de la SA y la mutagénesis dirigida del plásmido que codifica para SA-UK-T se utilizó la Taq polimerasa (Phusion[®]) de Finnzymes, los dNTP de Biotools, los oligonucleótidos de Invitrogen, las endonucleasas de restricción, la DNA ligasa T4, las soluciones tampón específicas y la albúmina de New England Biolabs.

Para la amplificación del DNA transformamos bacterias competentes *E.coli* DH5 α de Invitrogen. Las bacterias transformadas las crecemos en placas de agar con medio LB-ampicilina (50 μ g/ml), medio LB y medio LB-ampicilina (100 μ g/ml). Para el cultivo y producción de proteínas en la línea celular S2 de *Drosophila melanogaster* utilizamos el medio de Schneider, suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor, penicilina/estreptomicina y blasticidina de Invitrogen, medio libre de suero Insect Xpress[®] de BioWhittaker y Eugene 6[®], como agente lipídico de transfección, de Roche. El plasma humano pobre en plaquetas (PPP) proviene de donantes sanos de la unidad de transfusiones del hospital universitario "Príncipe de Asturias" (Alcalá de Henares). Todos los procedimientos llevados a cabo en los animales de experimentación fueron aprobados por un comité ético y realizados de acuerdo con la legislación Europea de protección y bienestar animal. Los ratones utilizados fueron los C57/Bl6J (Charles River Laboratories o Harlan). La anestesia de los animales se realizó con una mezcla de ketamina (Imalgene[®]; Merial) y xilacina (Rompun[®]; Bayer).

2. MARCAJE RADIOACTIVO.

2.1 Marcaje radiactivo de proteínas.

Para marcar las proteínas con isótopos radioactivos utilizamos una solución salina de Na¹²⁵I (20 μ Ci/ μ l). Para ello, cubrimos la superficie inferior interna de un tubo de borosilicato (12 x75 mm) con 300 μ l de una solución oxidante de Iodo-Gen[®] de Pierce (1,3,4,6-tetracloro-3 α -6 α -difenilglicouril) [242], de 0,5 mg/ml en cloroformo. Tras la evaporación del disolvente bajo una atmósfera inerte de N₂ para recubrir las paredes del tubo con el reactivo, mezclamos de 50 a 100 μ l de la solución proteica a marcar (0,5-3 mg/ml, calculada mediante el método de Bradford) con la solución de Na¹²⁵I (0,25 μ Ci/ μ g de proteína, finales). Incubamos la mezcla durante 5 minutos en hielo, lo que permite la incorporación de los átomos de ¹²⁵I mediante la oxidación de los grupos fenólicos de la proteína. Tras la incubación, extraemos la proteína y la filtramos por las columnas de desalación Bio-Spin 6[®] (Bio-Rad) para eliminar el exceso de isótopo no incorporado [243, 244]. Finalmente, caracterizamos la proteína marcada, a través de su cuantificación en la solución final utilizando el método de Bradford y mediante la precipitación producida por el ácido tricloroacético, estableciendo tanto su marca específica (cpm/ μ g) como el porcentaje de ¹²⁵I libre en la solución. Estas condiciones de marcaje nos permiten

mantener un control exhaustivo del grado de modificación manteniendo la viabilidad de la proteína marcada en todo momento.

2.2 Marcaje radiactivo de células.

Para el marcaje radiactivo de los RBC, incubamos una suspensión al 10% de hematocrito en PBS-BSA (4%) con $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ a razón de 0,2 nCi/RBC. La incubación se realiza durante 60 minutos a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4°C, lo que permite la incorporación permanente del ^{51}Cr en la hemoglobina. Tras dicha incubación, lavamos la suspensión de eritrocitos eliminando así el ^{51}Cr libre no incorporado [245, 246].

3. FORMACIÓN DE COÁGULOS.

Como herramienta principal en los ensayos de actividad y retención de las distintas drogas fibrinolíticas utilizamos distintos modelos. Para ello formamos coágulos a partir de distintas fuentes de Fg. Así, para coágulos en ausencia de inhibidores o componentes plasmáticos (PFC) usamos soluciones de Fg en el tampón Krebs-Ringer [71] (KRB; 1,2 mM de KH_2PO_4 , 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot [\text{H}_2\text{O}]$, 4,7 mM KCl, 25 mM NaH_2CO_3 , 119 mM NaCl y 1,3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \cdot [\text{H}_2\text{O}]$). Para coágulos donde exista la contribución de los componentes plasmáticos utilizaremos PPP, aislado de donantes sanos, los cuales podrán enriquecerse con Fg (3 mg/ml), para homogenizar su concentración en los distintos lotes de plasma, o con Fg 10 mg/ml para que adquieran una consistencia adecuada que nos permita su manipulación en los procesos de homogenización. Independientemente del tipo de coágulo, las soluciones de Fg o PPP polimerizan tras la adición de calcio y trombina (20 mM y 0,2 UI/ml de concentraciones finales, respectivamente). La formación de coágulos *ex vivo*, para determinar la potencia fibrinolítica de la sangre de animales que poseen una mayor o menor presencia de PA, administrados exógenamente, en circulación, se realiza mediante la extracción de sangre. Para ello, utilizamos jeringuillas o capilares pretratados con sigmacote en ausencia de agentes anticoagulantes. Tras depositar la sangre en tubos de borosilicato, la coagulación se inicia por el contacto con una superficie extraña. Los coágulos se estabilizan durante 20 minutos a temperatura ambiente. En el caso de

necesitar almacenarlos por un tiempo más prolongado se guardan a 4°C o en hielo. Para aquellos experimentos en los que tengamos que establecer las cinéticas de degradación de los coágulos, éstos podrán ser enriquecidos con ¹²⁵I-Fg (durante su formación) [214]. Los coágulos maduros serán recubiertos con un volumen similar de solución tampón o solución salina. A los tiempos establecidos de incubación del coágulo a 37°C se determinará la presencia de Fn radiactiva liberada al sobrenadante, que será proporcional al grado de fibrinólisis. La cuantificación de la radiactividad la realizamos en un contador gamma.

4. MODELO ANIMAL DE TROMBOEMBOLISMO PULMONAR (PE).

Formamos coágulos de 2 ml con una solución 10 mg/ml de Fg bovino en PPP. Tras la adición de la solución de calcio y trombina, los coágulos polimerizan durante 20-60 minutos a temperatura ambiente y se dejan madurar toda la noche a 4° C, con el fin de favorecer el proceso de estabilización del coágulo en ausencia de fibrinólisis. En todo momento dichos coágulos se mantienen en hielo para reducir y/o evitar la acción de las enzimas presentes en el plasma sanguíneo. Los coágulos se extraen de los tubos de borosilicato y se cortan mediante una cuchilla en trozos milimétricos. Dichos trozos se resuspenden en 2 ml de KRB y se someten a tres procesos de homogenización mediante un Polytron® (Brikmann), obteniendo una suspensión de microémbolos (ME), de tamaño variado. Con el fin de homogenizarla, ésta se somete a un período de sedimentación de 5 minutos tras los cuales recogemos entre 50-75% del sobrenadante que contiene partículas comprendidas entre 1.5-5 µm de tamaño (>95%). El homogenizado de partículas se ajusta a la concentración deseada (6000-7000 ME/µl de suspensión) para generar el PE en el animal. Para ello, administramos 200 µl de la suspensión de ME a través de la vena yugular. En este modelo los ME quedan retenidos mecánicamente en el pulmón a partir de los capilares y por agregación llegan a obturar arteriolas de tamaño medio como muestra la figura 1MM. El PE generado no es letal, ni sintomático, pero es capaz de reflejar la oclusión de la vasculatura pulmonar y el efecto endógeno y terapéutico de los fibrinolíticos [71].

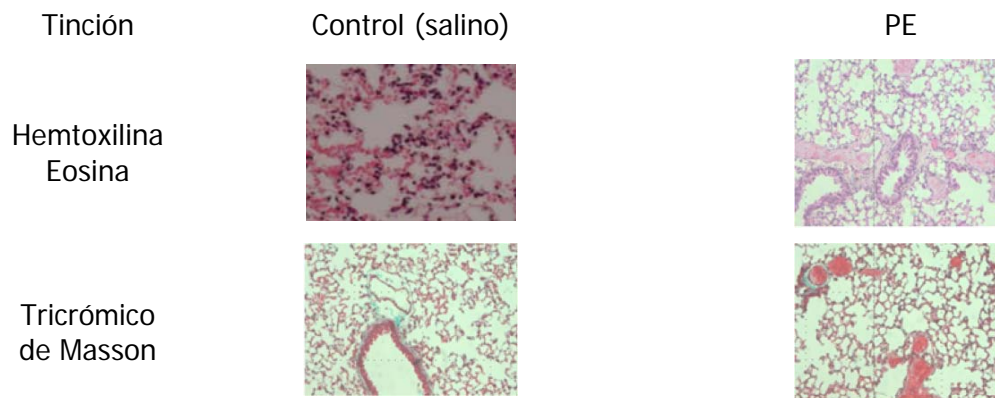


Figura 1MM. Histología del modelo de PE. Las imágenes histológicas se corresponden con muestras de pulmón provenientes de animales 60 minutos después de ser inyectados con salino o con una suspensión de ME. Con las tinciones de hematoxilina/eosina se observa: colágeno (rosa pálido), Fn (rosa intenso), citoplasma acidófilo (rojo), basófilo (púrpura), núcleos (azul), eritrocitos (rojo). Con la tinción del tricrómico de Masson se observa: citoplasma, eritrocitos, músculo, fibrina (rojo); colágeno (verde) y los núcleos (marrón). Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 10x.

5. ACTIVADORES DEL PLASMINÓGENO LIBRES.

5.1. Ensayos de actividad fibrinolítica en exposición constante.

Para la realización de cinéticas fibrinolíticas partimos de coágulos de 200 μ l puros de Fn (PFC) o de PPP (enriquecidos o no en Fg). Estos coágulos incorporan trazas de 125 I-Fg durante su polimerización. Los coágulos maduros, se cubren con el mismo volumen de solución tampón, como control, o conteniendo los distintos PA a concentraciones indicadas.

Para estudiar la sensibilidad de los PA al PAI-1, las soluciones de PA se preincubaban durante 15 minutos a concentraciones crecientes e indicadas del inhibidor. Para estudiar la acción del inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFIa [247]), durante la fibrinólisis de coágulos de PPP, añadimos 30 μ g/ml de PCI previa polimerización [157] (exceso molar que se corresponde con 70 veces la concentración plasmática de TAFI). Como controles internos utilizamos el recubrimiento con KRB en ausencia de la droga.

Para estudiar la actividad fibrinolítica zimogénica de las FP, cubrimos los coágulos con una solución preactivada con trombina (0,2 UI/ml, durante 1 hora 37°C) o sin preactivar con trombina. Con la intención de saber si la FP se activa en un ambiente protrombótico, añadimos ésta previamente a la polimerización de los coágulos.

5.2 Ensayos en exposición transitoria al PA.

5.2.1 Actividad fibrinolítica.

Partimos de coágulos formados a partir de una disolución de ^{125}I -Fg de 500 μl (10 mg/ml). Tras la polimerización, obtenemos coágulos más resistentes que los anteriores, que son susceptibles de ser manipulados y transferidos a otros tubos, donde se lavan con KRB y enfrían a 4°C. Estos coágulos los incubamos, durante 5 minutos, con las soluciones de drogas elegidas a 4°C, evitando de este modo que se inicie la fibrinólisis. Tras dicha incubación, los coágulos se lavan y transfieren a nuevos tubos de ensayo, donde quedan recubiertos con un volumen igual de tampón. Como control positivo de la fibrinólisis realizamos una cinética de degradación de coágulos en exposición constante con la misma solución de PA (2 nM, excepto UK con 3,3 nM).

5.2.2 Retención y penetración de los PA.

Formamos coágulos (10 mg/ml) y tras su maduración añadimos concentraciones equimolares de los distintos ^{125}I -PA, incubándolos durante 5 minutos en hielo. Posteriormente, los coágulos se lavan con tampón, se transfieren a nuevos tubos de ensayo y, finalmente, cuantificamos la retención de los ^{125}I -PA.

La penetración de los PA hacia el interior la estudiamos mediante microscopia confocal (TC SP5 Leica Microsystem), utilizando el objetivo de inmersión 40x, HCX PL 1,25 oil. Para ello, formamos los coágulos, con Fg marcado fluorescentemente (FITC), en una cámara de fabricación propia de 1.5 mm (espesor) x 2 cm (anchura) x 2 cm (altura). Dichos coágulos se incuban durante 5 minutos con los PA marcados fluorescentemente (DyLight 633), incorporando entre 0,7-1 residuos de fluoróforo por molécula de PA (véase fórmula, donde la $A_{\text{máxima}}$ es la absorbancia medida a la longitud de onda de máxima absorción para el fluoróforo y $\epsilon_{\text{fluoróforo}}$ es su coeficiente de extinción). De este modo, podremos observar tanto la penetración de las drogas como su colocación con la Fn [248, 249].

$$\text{Residuos incorporados} = \frac{A_{\text{máxima}} \times \text{factor de dilución}}{\epsilon_{\text{fluoróforo}} \times \text{concentración (M)}}$$

5.3 Ensayos *in vivo*.

5.3.1 Actividad fibrinolítica.

Utilizamos ratones anestesiados mediante la inyección intraperitoneal de ketamina/xilacina (100/10 mg/kg). Formamos una suspensión de ME incorporando ^{125}I -Fg (2×10^7 cpm) durante la formación del coágulo inicial, obteniendo por lo tanto ^{125}I -ME (~ 30.000 cpm/dosis). Inyectamos 200 μl de la suspensión de ^{125}I -ME en la vena yugular de los ratones anestesiados. Pasados 10 minutos, tiempo en el cual existe una distribución homogénea de los ^{125}I -ME en la microvasculatura pulmonar y aún no se ha iniciado la fibrinólisis endógena [71], inyectamos los distintos PA a diferentes dosis (8,3 – 33 nmol/kg, correspondientes con las dosis terapéuticas de tPA de 0,5-2 mg/kg). Tras 50 minutos, sacrificamos los animales mediante dislocación cervical, aislamos los pulmones y analizamos la radiactividad retenida en los mismos.

5.3.2 Retención de la droga en el pulmón embolizado.

Para estudiar la retención de la droga en el pulmón embolizado inyectamos una dosis de ME (200 μl iv.) en ratones anestesiados. Al igual que en el ensayo de actividad, pasados 10 minutos inyectamos cantidades trazadoras y equimolares de los ^{125}I -PA. Cinco minutos más tarde, cuando aún no se ha producido la fibrinólisis, sacrificamos los animales y analizamos la presencia de PA radiactivo retenido en los pulmones, el cual nos permitirá calcular el número de moléculas retenidas, en función de su marca específica.

6. MODIFICACIÓN DE LOS ERITROCITOS CON LOS REACTIVOS DE BIOTINA.

Extraemos la sangre de la región retroorbital mediante capilares heparinizados. Los eritrocitos (RBC) se aíslan de sangre anticoagulada (heparina sódica) mediante sucesivos lavados con un exceso de 10-15 volúmenes de PBS levemente hipertónico (20 mM fosfato, 9,5 g/l NaCl, pH 7,4), que favorece la integridad de los RBC durante el proceso de manipulación y modificación. El PBS no podrá estar enriquecido en BSA durante el proceso inicial de biotilación, pero sí posteriormente (PBS-BSA, 4%) para favorecer la estabilidad de los RBC modificados, disminuir las uniones inespecíficas tanto en los marcajes, como en las reacciones de formación de complejos con la droga. Para la

biotinilación de los RBC, la sangre recogida se lava 6 veces en PBS no enriquecido, con el fin de eliminar el exceso de proteínas y grupos amino libres en el plasma. El lavado eritrocitario se realiza mediante centrifugación, 10 minutos a 1000 g (8°C). Tras los lavados, los RBC se resuspenden al 10% de hematocrito en PBS y se añade el reactivo de biotina (NHS-LC-biotina o NHS-LC-LC-biotina, cuyos brazos espaciadores son de 22,4 ó 30,5, respectivamente) a la concentración molar indicada. Seguidamente, la mezcla se incuba durante 30-60 minutos a temperatura ambiente y el exceso de biotina se elimina mediante 3 lavados en PBS-BSA. Los RBCb obtenidos se mezclan con eritrocitos normales (N-RBC), con el fin de aumentar el volumen y disminuir uniones inespecíficas durante los procesos de cuantificación o modificación posterior, y se resuspenden al 10% de hematocrito.

Para la modificación de los RBC directamente *in vivo* inyectamos el reactivo de biotina (Sulfo-NHS-LC-biotina), a través de la yugular de ratones anestesiados, empleando las concentraciones molares indicadas [221].

Para cuantificar el número de biotinas accesibles en los RBCb añadiremos un exceso de 10^6 moléculas de ^{125}I -SA sobre RBCb y los incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente. El exceso de ^{125}I -SA que no haya reaccionado lo eliminamos mediante 3 lavados en PBS-BSA y, finalmente, cuantificamos su unión analizando la radiactividad unida a las células.

7. FORMACIÓN DE ESPECIES PROTEICAS CAPACES DE UNIRSE A LOS ERITROCITOS.

En los siguientes apartados describiremos la formación de distintas especies proteicas las cuales combinan I) la molécula o núcleo de anclaje al eritrocito portador, bien la SA (que se une a la superficie del eritrocito biotinilado) o bien la fracción variable de cadena sencilla de un anticuerpo (scFv) contra la glicoforina A de ratón (Ter119), y II) el agente fibrinolítico adecuado. De este modo, obtendremos conjugados químicos, a través de agentes entrecruzantes y proteínas de fusión, que combinen las propiedades de las distintas especies individuales en una misma proteína.

7.1 Conjugados químicos entre la estreptavidina y los activadores del plasminógeno.

La formación de los conjugados químicos la realizaremos gracias a los agentes entrecruzantes, donadores (SATA) y receptores (SMCC) de grupos sulfhidrilo, los cuales

modificarán a cada una de las especies individuales, SA y PA, para posteriormente formar los conjugados moleculares SA-PA. Atendiendo a la naturaleza del PA utilizaremos dos representantes derivados del tPA para su modificación: la TNK y la Ret.

7.1.1 Modificaciones de las proteínas.

La SA y el PA se modifican con los reactivos bifuncionales SATA y SMCC, que incorporan en su estructura el grupo NHS-éster, el cual establece un enlace covalente con las aminas primarias de las proteínas. Para que se pueda llevar a cabo esta reacción, las proteínas deben estar en un medio tamponado libre de aminas primarias. Por lo tanto, para proporcionar el medio adecuado para la modificación proteica realizamos un intercambio de la solución tampón inicial por la de reacción. Dicho intercambio se realiza bien mediante diálisis por difusión pasiva, a través de una membrana de 6 kDa, o bien por columnas de desalación. En el caso de los PA, es común que las preparaciones farmacéuticas incorporen residuos amino libres como lisinas o argininas o que se utilice un tampón TRIS rico en grupos amino libres, por tanto, el intercambio de medio se realizará por un tampón HEPES-Tween (300 mM de HEPES, 0,01 % Tween 80[®], pH 7,4) de suficiente densidad, para evitar la precipitación del PA. Dado que la SA se encuentra en PBS (20 mM, pH 7,4), siendo éste un medio libre de aminas primarias, no requiere los procesos de diálisis. Las modificaciones las realizamos durante 1 hora a 4°C en una proporción molar proteína:reactivo 1:10 para SATA ó 1:3 para SMCC. Los excesos de SATA y SMCC no unidos los eliminamos por filtración en columnas de desalación. En estas condiciones la incorporación media de grupos -SH o maleimido por molécula de proteína, determinada por la reacción de Ellman [250], es de aproximadamente un residuo (tabla 1MM).

	SA			TNK			Ret		
Exceso molar	10x	20x	30x	10x	20x	30x	10x	20x	30x
SATA	0,5-1	0,9-1,5	1,4-2,7	0,6-1,1	1,2-2,2	2-3	--	0,8-1,2	1,6
Exceso molar	3x	5x	10x	3x	5x	10x	3x	5x	10x
SMCC	0,7-1,1	1,5-3	3,5-4,5	--	1,1-2,3	2,5-3,6	0,6-1,2	1,3-2	1,8-2,7

Tabla 1MM. Cuantificación mediante la reacción de Ellman del número de residuos de SATA o SMCC incorporados a las proteínas. La cuantificación del SATA se realiza de un modo directo por la reacción del reactivo de Ellman con los grupos sulfhidrilo generados tras su activación por la hidroxilamina. La medición de la incorporación de SMCC se realiza de un modo indirecto, mediante la cuantificación del consumo de grupos sulfhidrilo libres de una solución de cisteína de concentración conocida.

7.1.2 Formación de conjugados.

Para generar los conjugados (SA-PA) se mezclan el PA_{SMCC} con la SA_{SATA} o el PA_{SATA} con SA_{SMCC}, en una relación molar de 1 SA: 5 PA. Para que la reacción entre el SATA y SMCC se produzca, es necesaria la activación del SATA mediante la incubación con hidroxilamina, la cual genera el residuo sulfhidrilo a partir del grupo tioacetato [184, 251, 252]. De esta manera, el grupo -SH proveniente del SATA activado reaccionará con el grupo maleimido del SMCC (fig. 2MM). Aplicando las relaciones anteriormente citadas se favorece principalmente la unión de una única molécula de SA por conjugado, disminuyendo la probabilidad de formar conjugados multimoleculares que pudieran agregar los complejos finales RBCb/SA-PA (fig. 4MM). La caracterización de los conjugados SA-PA se realizará mediante SDS-PAGE. No obstante, durante la generación de conjugados SA-PA, podrían formarse multímeros (SA_x-PA_y)_n. Por tanto, para aislar los conjugados bimoleculares SA-PA de estos y de sus especies independientes SA y PA, fraccionamos la mezcla obtenida (500 µg), mediante cromatografía líquida de proteínas (FPLC), con la columna de exclusión por tamaño Superdex 200 10/300 GL (Tricorn™) acoplada a un colector de fracciones que incorpora un espectrofotómetro (A₂₈₀ nm) con el que aislamos fracciones de 500 µl.

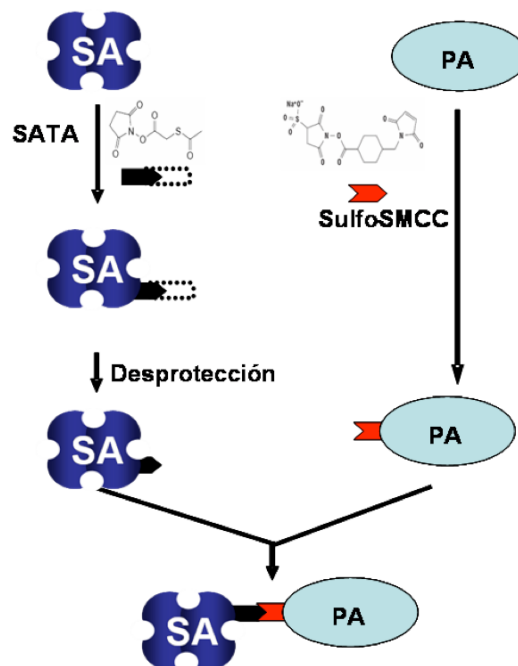


Figura 2MM. Formación de los conjugados químicos SA-PA a través de los agentes bifuncionales SATA y SMCC.

7.2 Proteínas de fusión.

Las proteínas de fusión consisten en la combinación de las propiedades de distintas proteínas en una sola mediante ingeniería genética. De este modo combinaremos las capacidades de unión de la SA o de las fracciones variables de Ac junto con las capacidades fibrinolíticas de variante de la UK de bajo peso molecular activable por trombina en lugar de por Pln.

7.2.1 Proteínas de fusión entre la fracción variable de anticuerpos y los activadores del plasminógeno.

Las primeras proteínas de fusión que utilizamos fueron generadas en el laboratorio del Dr. V.R. Muzykantov, las cuales combinaban la scFv Ter119 bien con el núcleo fibrinolítico de la mRK o bien con el de la UK-T. La mRK es una variante de ratón del tPA en la que se han deletado los dominios F-EGF-K1 y muestra resistencia frente a PAI-1, gracias a la sustitución en el núcleo proteásico del punto de interacción con PAI-1 mediante mutagénesis dirigida [228]. Sin embargo, la UK-T consiste en la variante zimogénica de la UK de bajo peso molecular, que por la delección de 2 aminoácidos se convierte en una variante de la UK activable por trombina en lugar de por Pln (fig. 3MM a) [78].

7.2.2 Proteínas de fusión que combinan el núcleo de la estreptavidina con la urokinasa activable por trombina.

7.2.2.1 Clonaje de SA y SA-UK-T.

Para clonar la secuencia de SA o de SA-UK-T en el plásmido de expresión pMT/BiP (fig. 3MM b) realizamos una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando los siguientes oligonucleótidos: 5'-GGACTAGTATGGCTGAAGCTGGTATCACCC-3' (sentido), 5'-ATAAGAATGCGGCCGCGCCGAAGAGCTACTACCCGATGAGGAAGAGGAAGCAGCGGACGGTTTT-3' y 5'-TCTCGAGTTAGGAAGCAGCGGACGGTTTT-3' (antisentido). Todos ellos incorporan en el extremo 5' un sitio de restricción, para las endonucleasas Spe I en el oligonucleótido sentido y Not I [con la cadena espaciadora (SSSSG)₂AAA] o Xho I en el antisentido. De este modo, el inserto de SA podrá digerirse con estas enzimas generando extremos

cohesivos con los del plásmido pMT/BiP (Spe I y Xho I; fig. 3MM b) o los presentados en el plasmido que contiene UK-T (Spe I y Not I; esquema UK-T fig. 3MM). La digestión mediante las endonucleasas referidas se realiza durante 3 horas a 37°C, utilizando una concentración final de dichas enzimas de 1 U/ µl. El producto de PCR lo purificamos en columnas con membrana de silica-gel, según instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Tras la migración electroforética en gel de agarosa purificamos el vector digerido (conteniendo o no la secuencia de UK-T en función de los enzimas utilizados). Para la formación de la molécula híbrida pMT/BiP-SA y pMT/BiP-SA-UK-T, utilizamos las relaciones molares vector:inserto 1:3 y 1:6, fijando la cantidad de vector en 100 ng, añadiendo 10 unidades de DNA ligasa T4 y ATP e incubándolo durante 16 horas a 16°C. Posteriormente, amplificamos los plásmidos obtenidos mediante la transformación por choque térmico de bacterias DH5α [253] y purificamos el DNA por el método de lisis alcalina [254], tras el crecimiento en medio líquido de colonias seleccionadas (kit Wizard Plus® SV Minipreps DNA Purification System, Promega). La correcta inserción la confirmamos mediante el análisis de la secuenciación de la muestra.

7.2.2.2 Mutagénesis dirigida de SA-UK-T.

Con el objetivo de introducir la mutación D117A en la secuencia de la SA asociada a UK-T y contenida en el vector pMT/BiP (pMT/BiP-SA-UKT), realizamos una PCR de 30 ciclos con una enzima de alta procesividad y baja tasa de errores. Para ello, utilizamos oligonucleótidos en los que se incluye la mutación (negrita) flanqueada por 15 nucleótidos que anillan con la secuencia parental, en presencia de los siguientes cebadores: 5'-CCCTGGTTGGTCACG **C** CACCTTCACCAAAGTT-3' (sentido) y 5'-AACTTTGGTGAAGGTG **G** GCGTGACCAACCAGGG-3' (antisentido). De este modo, la polimerasa genera copias del plásmido parental introduciendo la mutación contenida en los oligonucleótidos y dejando mellas, que serán selladas tras la transformación por los sistemas de reparación de DNA presentes en las bacterias. Para evitar la transformación bacteriana con los plásmidos originales (metilados), el producto de PCR (no metilado) se digiere con el enzima de restricción Dpn I, el cual degrada el DNA metilado. Finalmente, comprobamos la correcta incorporación de la mutación mediante la secuenciación de la muestra.

7.2.2.3 Cultivo, transfección de células embrionarias de insecto (línea celular S2) y producción proteica.

La plataforma celular escogida para la producción proteica escogido fue la línea celular embrionaria S2, derivada de *Drosophila melanogaster* en etapa tardía (20-24 horas). Son células semiadherentes que crecen formando una monocapa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 28°C sin aporte de CO₂. El cultivo lo realizamos según las instrucciones del proveedor en medio de Schneider suplementado con FBS (inactivado por calor), penicilina/estreptomicina y L-glutamina [255]. Así, 24 horas después de sembrar 3 ml de células S2 a una concentración de 2 millones/ml, realizamos su transfección con Eugene 6[®] mediante la incubación de 2 µg de una mezcla de los plásmidos pMT/BiP-inserto (SA, SA-UK-T o D117A SA-UK-T) y junto con el plásmido que confiere resistencia a la blasticidina (pBlast) en una relación molar de 20:1 (pMT/BiP:pBlast). Para la formación de proteínas quiméricas SA:SA-UK-T introducimos en la mezcla las diferentes relaciones molares (3:1; 1:1 y 1:3) de los plásmidos pMT/BiP conteniendo los insertos de SA y SA-UK-T respectivamente. Tras la incubación de las células transfectadas en un medio enriquecido en blasticidina (concentración final de blasticidina 25 µg/ml), seleccionamos aquellas células que hayan sido transfectadas correctamente y que, además de incorporar el gen de resistencia a la blasticidina, también hayan incorporado el gen que codifica para la proteína deseada. Dichas células seleccionadas son posteriormente transferidas a un medio libre de suero (Insect Xpress[®]), inducidas mediante la adición de CuSO₄ (750 µM final) y cultivadas en agitación constante (145 rpm, Innova 4.000), para permitir la correcta oxigenación de las muestras. Las células se expanden inducidas en este medio hasta alcanzar concentraciones celulares de 20 millones/ml a los 5 días.

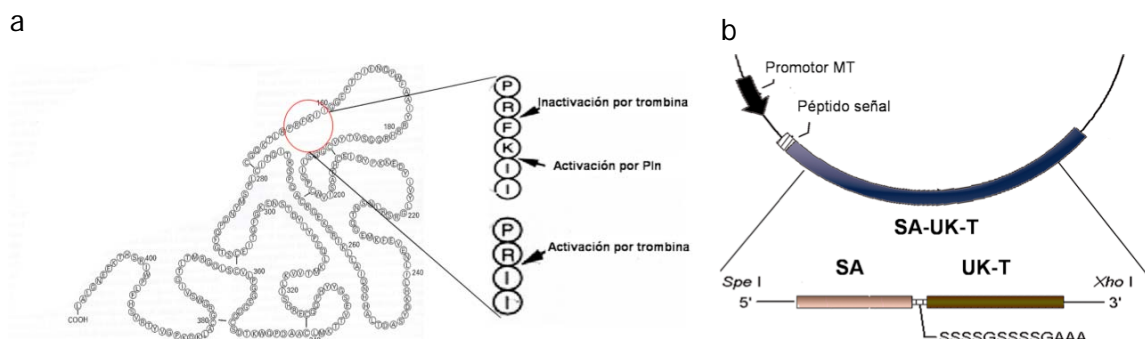


Figura 3MM. UK-T y pMT. (a) Representación esquemática de UK-T en la que se muestra el punto de delección de los dos aminoácidos que convierten la UK activable por Pln en UK activable por trombina (modificado de "Design and evaluation of a thrombin-activable plasminogen activator" [78]). (b) Representación esquemática del plásmido y del inserto SA-UK-T donde se muestran: el promotor inducible por metales (MT), el péptido señal, el inserto junto con los puntos de corte para introducirlo así como la cadena espaciadora que separa la SA de la UK-T.

7.2.2.4 Purificación de las proteínas de fusión.

Para purificar las FP recogemos el medio de las células inducidas después de 5 días. Utilizamos las columnas de afinidad M2 [77] las cuales fijarán nuestra proteína de interés a través del epítipo N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C, incluido en la FP. Finalmente, eluimos la proteína con una disolución de glicina y NaCl (1 M y 0,1 M, respectivamente), a pH 2 (tanto para SA-UK-T como para la SA-UK-T que incorpora la mutación D117A), o en gradiente de pH de 4,5 a 2 (para la purificación de proteínas quiméricas) obteniendo una solución de proteína altamente purificada cuyo rendimiento varía entre 0,1-0,5 mg/l_{medio inducido}.

7.3 Ensayos de caracterización.

7.3.1 Ensayos cromatográficos: electroforesis en gel de poliacrilamida.

Utilizamos ésta técnica para separar mezclas de proteínas, investigar la composición y subunidades de las mismas y verificar la homogeneidad de la muestra. En la electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas migran a través de poros en la matriz del gel, en respuesta a un campo eléctrico. La combinación entre el tamaño de poro del gel (determinado por la concentración del acrilamida empleado) y la carga, tamaño y forma de las proteínas determinan su migración final. Utilizamos el método clásico de Laemmli [256] en distintas condiciones de la muestra: reductoras, desnaturalizantes y pseudonativas. De este modo bajo las condiciones reductoras en presencia de SDS, β -mercaptoetanol y calentamiento a 95°C durante 10 minutos, desnaturalizamos la muestra y eliminamos los puentes disulfuro. Sin embargo, en las condiciones desnaturalizantes calentamos la muestra desnaturalizando la proteína, pero manteniendo los puentes disulfuro, puesto que carece de β -mercaptoetanol. Finalmente, en las pseudonativas, al no calentar la muestra y carecer de β -mercaptoetanol, mantenemos incluso la estructura cuaternaria. No obstante, utilizamos el prefijo "pseudo" puesto que realizamos la cromatografía en presencia de SDS.

7.3.1.1 Western blot.

Utilizamos esta técnica para verificar la presencia y el peso molecular de las proteínas de interés. Para ello, extraemos el sobrenadante de las células transfectadas y lo mezclamos con la solución tampón de Laemmli [256] (62 mM de Tris-HCl a pH 6.8, 5 % de SDS, 5 % de glicerol y 0,005 % de azul de bromofenol, sin β -mercaptoetanol dado que destruye el epítipo reconocido por el anticuerpo primario). La separación de las proteínas del extracto la realizamos mediante SDS-PAGE y, posteriormente, las transferimos a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences).

Para visualizar las proteínas específicas se realizó el siguiente protocolo a temperatura ambiente. Primeramente, bloqueamos la membrana durante 1 hora con una solución al 5% de leche desnatada disuelta en tampón TBS-T (20 mM de Tris-HCl a pH 7.2, 150 mM de cloruro de sodio y 0,1 % de Tween 20[®]), seguido de la incubación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-UK humana (American Diagnostica Inc.) diluido en ésta solución (1 hora). Tras 3 lavados de la membrana con el tampón TBS-T (10 minutos cada uno), incubamos durante 1 hora con el anticuerpo secundario antimurino acoplado al enzima HRP (peroxidasa de rábano) disuelto en la solución de bloqueo. Finalmente, realizamos otros 3 lavados previa exposición de la membrana a los reactivos "Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate" (Pierce) que producirá una reacción quimioluminiscente por la oxidación del luminol catalizada por la enzima HRP y potenciada con ECL ("Enhanced ChemiLuminescence") de Amersham Biosciences. El revelado lo realizamos mediante películas autoradiográficas donde queda impresa la luz emitida por la reacción. El análisis cuantitativo de la intensidad de las bandas lo realizamos con el programa Quantity One v4.6 (Bio-Rad).

7.3.2 Espectrometría de masas.

Utilizamos esta técnica con fines cualitativos y cuantitativos. De este modo, las distintas especies multiméricas las analizamos mediante la ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), acoplada a un analizador TOF/TOF, el cual permite determinar las masas de los fragmentos que se derivan de la descomposición metaestable de péptidos. Dicha descomposición genera la denominada huella peptídica de fragmentación del péptido, la cual es característica de la secuencia del mismo y permite su identificación inequívoca. Se mezcló 1 μ l de la disolución, obtenida tras la purificación de la muestra de SA-UK-T o de la SA comercial (1 mg/ml), con 1 μ l de

una disolución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) en acetonitrilo acuoso al 50% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemania) y 0,25% (v/v) de ácido trifluoroacético (Sigma). La mezcla se depositó en un portamuestras MALDI de acero inoxidable y se dejó secar a temperatura ambiente. Los espectros de masas MALDI se obtuvieron en un espectrómetro de masas MALDI Ultraflex (Bruker-Daltonics) [257]. Los espectros de masas se midieron en modo positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon 1000 espectros individuales. Para la calibración externa de los espectros de masas se empleó como referencia el espectro de la seroalbúmina bovina (Sigma). La calibración y el etiquetado de los espectros de masas se llevó a cabo mediante el programa flexAnalysis (Bruker-Daltonics), reflejando en una gráfica las distintas masas moleculares de las distintas especies detectadas.

7.3.3 Ensayos de funcionalidad.

Para analizar el mantenimiento de la funcionalidad de los núcleos activos de la proteína de fusión, así como establecer el poder fibrinolítico de las proteínas de fusión frente a los PA de uso terapéutico utilizamos las técnicas descritas a continuación.

7.3.3.1 Fijación de proteínas a pocillos de poliestireno.

Para estudiar la capacidad de unión y la capacidad amidolítica de las FP utilizamos el ensayo sobre pocillos recubiertos con BSA biotinilada. De esta forma, recubrimos la superficie interna de los pocillos de placas de 96 de poliestireno. Para ello, incubamos 200 μ l de una solución de 1 μ g de BSA biotinilada, o BSA no modificada como control, durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, los pocillos se lavan 5 veces con PBS y se incuban, para bloquear la unión inespecífica, con 300 μ l de PBS-BSA al 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavan 5 veces con PBS y se cuantifica la unión.

7.3.3.1.1 Ensayo de unión del sobrenadante celular.

Los pocillos así tratados los utilizamos para el análisis de la presencia de la FP (a partir del sobrenadante de las células transfectadas e inducidas) y de su capacidad de

unión a la biotina. De este modo, 200 μ l del sobrenadante celular se añaden a los pocillos recubiertos y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 6 lavados con PBS, para eliminar las proteínas que no se hayan unido, los pocillos serán incubados con 1 μ g de anticuerpos monoclonales de ratón anti-UK humana (American Diagnostica Inc.) en una solución de 300 μ l de PBS-BSA al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguidamente, los pocillos serán lavados con PBS e incubados con 300 μ l de una solución en exceso de Ac secundario anti-ratón (conjugado con peroxidasa de rábano, HRP). Esta reacción se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras los pertinentes lavados con PBS, la presencia de HRP será revelada mediante la adición de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina, Pierce) y la aparición de color medida a 450 nm [77].

7.3.3.1.2 Ensayo de unión de la proteína de fusión purificada.

Los pocillos recubiertos con BSA biotinilada se pueden usar también para la determinación directa de la unión de la FP purificada, la cual será marcada radiactivamente antes de su incubación en los pocillos. Para ello, diluciones seriadas de la FP marcada, serán incubadas en 300 μ l de solución en PBS-BSA al 1%. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos serán lavados 6 veces con PBS, cortados e introducidos en tubos de 12 x 75 mm. Dichos tubos serán analizados en un contador gamma (Perkin-Elmer) y su radiactividad cuantificada. En función de la actividad específica de la FP marcada, y la marca cuantificada en el pocillo, podemos establecer el número de moléculas de FP fijadas al pocillo.

7.3.3.1.3 Ensayos de la actividad amidolítica de la FP presente en el sobrenadante celular.

Sobre pocillos recubiertos con BSA biotinilada incubamos 300 μ l del sobrenadante de células transfectadas e inducidas durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras eliminar el medio celular mediante 6 lavados con PBS, activamos la FP fijada con 50 nM de trombina (2 horas a 37°C) y posteriormente incubamos con 2 μ M de glu-PIg (50 mM de Tris, pH 7,5). Para determinar la actividad de la PIn generada añadimos Spectrozyme® PL (American Diagnostica Inc.) y medimos la densidad óptica a 405 nm [77].

7.3.3.2 Zimografía en gel.

Utilizamos esta técnica para verificar la presencia de nuestra proteína de fusión y determinar su actividad plasminogenolítica y zimogénica. Para ello, realizamos una migración electroforética de la FP en geles del 10% de poliacrilamida con un 1% de leche desnatada y 20 µg/ml de Plg. Tras la renaturalización de la proteína en el gel mediante la adición de Tritón X-100 al 2.5% en PBS durante 30 minutos, añadimos la solución de revelado ("zymogram developing buffer", Invitrogen), la cual contiene una mezcla iónica que favorece la actividad enzimática. Todo ello lo incubamos durante 4 horas a 37°C. Finalmente, teñimos el gel con azul de Coomassie [77, 241], obteniéndose tras los lavados unos halos blanquecinos correspondientes con las zonas de actividad lítica de la Pln (generada por la actividad del PA) sobre las proteínas de la leche.

7.3.3.3 Actividad fibrinolítica.

La determinamos mediante cinéticas de degradación de coágulos radiactivos (véase apartado 3) tanto en coágulos nacientes como en coágulos hemostáticos. Para la determinación de la actividad fibrinolítica de los coágulos nacientes añadimos la FP purificada a la disolución de Fg previa adición de CaCl₂ y trombina, mientras que para la determinación de su zimogenicidad en ausencia de preactivación los añadimos sobre los coágulos radiactivos maduros (coágulos hemostáticos).

8. COMPLEJOS ERITROCITARIOS.

8.1 Formación de los complejos: RBC-PA.

Para formar complejos RBCb-PA *in vitro*, añadimos un exceso de conjugado químico (SA-PA) o de FP, de 10⁶ moléculas por cada RBCb. De este modo, saturamos los grupos de biotina accesibles en la superficie eritrocitaria de tal manera que se favorezca la reacción de una molécula de SA por cada residuo de biotina. Para cuantificar la unión del PA incorporado a la superficie de los RBCb utilizamos los compuestos marcados radiactivamente SA-¹²⁵I-PA o ¹²⁵I-FP. Las reacciones de unión RBC biotina/ SA-PA o FP, las realizamos durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente lavamos los

complejos generados 6 veces con PBS-BSA y los resuspendemos al 10% de hematocrito [184, 214].

La formación de complejos RBC-PA con Ter119-mRK y Ter119-UK-T se realizan directamente, en la circulación del animal anestesiado, tras la inyección iv. de la FP pertinente a una dosis de 4 mg/kg [228, 241].

8.2 Ensayos de estabilidad de los complejos.

8.2.1 Mantenimiento de la unión.

Para estudiar el mantenimiento de la unión de los PA a la superficie eritrocitaria incubamos a 4°C una suspensión de los complejos (al 10 % de hematocrito) formados con el conjugado SA-²⁵I-PA o con la ¹²⁵I-FP, , durante los tiempos seleccionados. Posteriormente, lavamos los RBC-PA con PBS-BSA (3 veces), eliminando la fracción de proteína marcada liberada al sobrenadante. Finalmente, transferimos la suspensión eritrocitaria a un nuevo tubo, evitando así la unión inespecífica sobre el mismo, y contamos la radiactividad remanente.

8.2.2 Ensayos de agregación.

Este tipo de ensayo cualitativo sirve para identificar la formación de agregados eritrocitarios tras la formación de los complejos RBC_x/SA-PA o FP. De existir dicha agregación, los complejos no atravesarían convenientemente el lecho capilar generando problemas de estabilidad y eliminación. Para ello, dejamos sedimentar por gravedad en pocillos de fondo cónico, una suspensión al 1% de hematocrito. Dicha sedimentación se realiza durante toda la noche a 4°C [214, 241]. Si dicha suspensión está compuesta por eritrocitos viables y no agregados aparecerá un sedimento homogéneo de la fracción celular en el fondo del cono. Si por el contrario, la suspensión contiene eritrocitos agregados, la sedimentación de estos eritrocitos no sería homogénea y aparecerá como una mancha rojiza irregular en las paredes del pocillo (fig. 4MM).

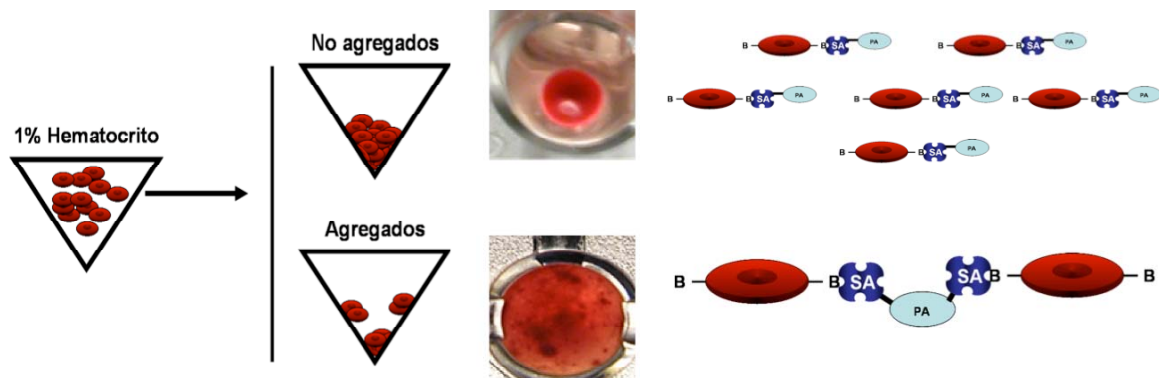


Figura 4MM. Ensayo de agregación de los RBC-PA. A la izquierda se muestra el esquema del ensayo, donde una suspensión de los complejos al 1% de hematocrito se deja precipitar durante toda la noche a 4°C, generando un sedimento de eritrocitos homogéneo y, por tanto, no agregados en el fondo del pocillo (arriba) o agregados heterogéneos en las paredes del pocillo (abajo).

8.2.3 Ensayo de hemolisis reactiva.

Otro método para estudiar la viabilidad de los RBC_{b_x}/FP es comprobar la activación de la hemolisis reactiva, de los eritrocitos alterados, mediada por la deposición de las moléculas C3b del complemento presente en el suero sanguíneo [258]. Para ello, aislamos el suero, a partir de sangre extraída en ausencia de anticoagulantes. Dicha sangre se deposita en tubos de borosilicato permitiendo su coagulación, durante 4 horas a 4°C. Para aislar el suero, deplecionado de las proteínas de la coagulación, y eliminar los restos sólidos, centrifugamos los coágulos a 800 g durante 10 minutos. Posteriormente, diluimos el suero (relación 1:5) con PBS BSA (1 mg/ml) y 450 µl de esta disolución la mezclamos con 50 µl de los RBC_{b_x}/FP (con distintos grados de modificación). Dicha mezcla la incubamos durante 1 hora a 37°C. A continuación, centrifugamos a 600 g durante 5 minutos y diluimos 250 µl del sobrenadante con 1 ml de agua destilada. El líquido obtenido se analiza mediante un espectrofotómetro para determinar el grado de hemolisis, el cual será proporcional al incremento de absorbancia a 405 nm debido a la aparición de hemoglobina liberada en el sobrenadante celular. Dicho grado de hemolisis se verifica mediante la interpolación de los valores obtenidos en una curva patrón de lisis de una suspensión conocida de eritrocitos. Utilizaremos como control de lisis total (100%) a una mezcla de 50 µl de RBC en agua y como negativo una incubación de RBC en PBS isotónico.

8.3 Ensayo in vitro de actividad de RBC-PA en coágulos.

Con el fin de estudiar la actividad fibrinolítica de los RBC-PA, utilizaremos un ensayo en un sistema de coágulos maduros (apartado 3.1) y otra aproximación para los coágulos en formación (coágulos nacientes), siendo el efecto de ésta última más similar al efecto perseguido en la clínica con estos complejos. Los ^{125}I -PFC en formación se enriquecen con los RBC-PA, previamente a la adición de CaCl_2 y trombina (volumen final 200 μl) [214]. Tras la polimerización de los coágulos radioactivos (20 minutos), éstos se cubren con un volumen de KRB y se realiza una cinética de degradación como se describió anteriormente (véase apartado 5.1 de Materiales y Métodos). Como control negativo los coágulos se enriquecen con N-RBC. Por otro lado, la actividad zimogénica de los RBCb/FP la determinamos mediante cinéticas de degradación de coágulos añadiendo los complejos (que pueden estar preactivados por la trombina) sobre los coágulos radiactivos previamente formados.

8.4 Ensayos en animales.

Para conocer el potencial trombotoprolíptico de nuestras FP es necesario analizar su comportamiento *in vivo*. Estableceremos, por tanto, sus perfiles farmacocinéticos, biodistribuciones y actividades enzimáticas tras su paso por la circulación.

8.4.1 Farmacocinética y biodistribución tisular.

Para seguir los complejos en circulación o la proteína libre utilizamos el doble marcaje formando los complejos $^{51}\text{CrRBCb}_x/^{125}\text{I}$ -FP, $^{51}\text{CrRBCb}_x/^{125}\text{I}$ -SA o ^{125}I -FP libre. Inyectamos iv. 200 μl de los complejos resuspendidos al 10% de hematocrito y diluidos en una relación 1:1 con N-RBC [214, 240, 245, 259], o 200 μl de la ^{125}I -FP libre en dosis trazadoras que permitan seguirla en el organismo (100.000 cpm). A los tiempos seleccionados, extraemos 100 μl de sangre a través de la yugular contralateral, la depositamos sobre heparina, y centrifugamos la muestra a 1.200 g. Posteriormente, analizamos la radiactividad en la fracción plasmática (sobrenadante) y en la fracción celular (precipitado). También realizamos el análisis postmortem de la radiactividad en distintos órganos.

El volumen total de sangre en el animal lo extrapolamos estimando que un 7% del total de la masa, expresada en g, se corresponde con el volumen de la sangre, expresado en ml.

8.4.2 Actividad fibrinolítica *ex vivo*.

Realizamos la fibrinólisis *ex vivo* siguiendo el protocolo descrito [214, 240, 241, 245] con la intención de conocer el tiempo de actividad de los complejos RBC-PA en circulación. Inyectamos 200 µl iv de los complejos generados *ex vivo* (RBCb/SA-UK-T o mFP) resuspendidos al 20% y diluidos 1:1 con N-RBC, o una dosis de 4 mg/kg de Ter119-PA en ratones anestesiados. En los tiempos establecidos extraemos 100 µl de sangre a través de la yugular, en ausencia de anticoagulantes (Sigmacote®), y la mezclamos rápidamente con trazas de ¹²⁵I-Fg en tubos de borosilicato, dejando coagular la muestra. Utilizaremos como control negativo la sangre de los mismos animales previamente a la inyección de la droga. Después de 20 minutos a temperatura ambiente cubrimos los coágulos formados con KRB y los incubamos a 37°C. La fibrinólisis de los coágulos estará en relación a la radiactividad liberada al sobrenadante a lo largo del tiempo.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos, se realizan mediante la ayuda del programa informático Sigma Stat 3.1 (Systat Software Inc.). Los datos se analizan primeramente para detectar el tipo de distribución de las poblaciones (paramétricas o no paramétricas) utilizando posteriormente el análisis comparativo adecuado. Los datos se representan como media (M) ± error estándar de la media (SEM). Consideramos un resultado estadísticamente significativo cuando $p \leq 0,05$, representándolo del siguiente modo: $p \leq 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) .

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PA LIBRES.

Dada la existencia de múltiples PA utilizados en la práctica clínica iniciamos nuestro estudio con la intención de establecer las características del tPA y sus derivados de diseño utilizados en clínica (Ret y TNK) en nuestros modelos experimentales y así conocer mejor sus propiedades enzimáticas y de interacción con las proteínas plasmáticas. En base a dichos resultados: I) podremos seleccionar un PA según el tipo de patología trombótica, dependiendo de la composición y del tipo de coágulo (arterial, venoso o cardíaco), y II) estableceremos el comportamiento específico de los distintos PA con el fin de seleccionar o diseñar el agente más adecuado para formar complejos con los RBC portadores en terapias trombotróficas. Así, nos centraremos en aquellos PA anteriormente citados, y la UK, excluyendo los PA en fase de ensayo clínico, y aquellos que han demostrado antigenicidad (SK y SAK). Para ello estudiamos la actividad fibrinolítica de las distintas drogas en un modelo *in vitro*, altamente controlable, donde estableceremos la relación del PA con los diferentes componentes del coágulo (Fn y Plg), la presencia o no de componentes plasmáticos y su comportamiento en función del tiempo de vida media en circulación. Dichos resultados los compararemos con los obtenidos *in vivo* en un modelo de ratón de embolia pulmonar.

1.1 Capacidad fibrinolítica.

Para estudiar la capacidad fibrinolítica de los distintos PA y caracterizar sus distintas potencias, realizamos cinéticas de degradación de coágulos de ^{125}I -Fn en presencia o ausencia de plasma y en condiciones equimolares. Al utilizar coágulos puros de Fn (PFC) observamos como concentraciones de 2 nM de tPA, Ret y TNK muestran la misma actividad fibrinolítica (fig. 1R a), como es esperable al compartir el mismo núcleo catalítico. Sin embargo, la UK, con distinto centro catalítico, requiere concentraciones superiores (3,3 nM) para mostrar una misma actividad. Para comprobar que la equiactividad de tPA y sus derivados no se debe a posibles fenómenos de saturación, los cuales podrían enmascarar las diferencias, realizamos una titulación decreciente (2-0,1 nM) donde se repite el mismo comportamiento equiactivo de tPA, TNK y Ret, lo que certifica la misma capacidad plasminogenolítica (fig. 1R b). Por otro lado, al analizar la actividad fibrinolítica de los distintos PA en presencia de plasma (PPP) observamos una disminución parcial de la actividad de Ret (2 nM), frente a tPA (2nM) y TNK (2nM), y una

disminución casi completa de la de UK (3,3 nM). Al mismo tiempo, tPA y TNK mantienen entre ellos una actividad similar y superior a la Ret (fig. 1R c). Estos resultados incitan a estudiar en mayor profundidad las diferencias de comportamiento entre el tPA y sus derivados. Para ello, analizamos la actividad fibrinolítica de los distintos PA sobre PPP enriquecidos en Fn (fig. 1R d), donde UK, al igual que en el caso anterior sobre los PPP, se mantiene inactiva. Ret pierde prácticamente toda su actividad y, sorprendentemente, TNK disminuye sensiblemente su actividad, sugiriendo un papel relevante o modulador de la Fn en el proceso fibrinolítico, en función del PA utilizado.

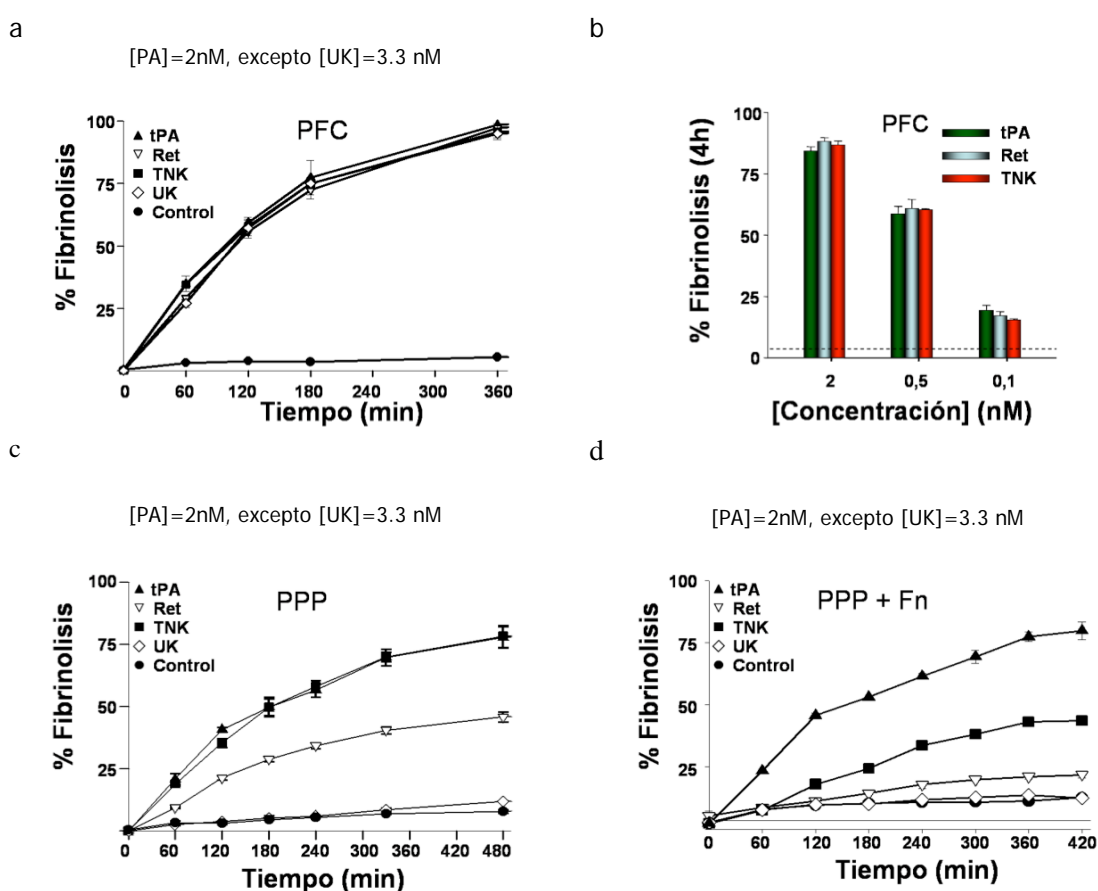


Figura 1R. Cinéticas de degradación de coágulos en exposición constante al PA. (a) Cinética de degradación de PFC recubiertos por una solución de PBS (control) o PBS en presencia de 2nM para tPA, Ret o TNK y 3,3 nM para UK. (b) Capacidad fibrinolítica comparativa a las 4h de titulaciones decrecientes (eje de abscisas) para tPA, Ret y TNK en PFC. (c) Cinética de degradación sobre PPP. (d) Cinética de degradación realizada sobre PPP enriquecidos en Fg (3mg/ml). M±SEM; n ≥ 9 experimentos para cada condición.

Estos resultados apoyan la existencia de distintos factores activos en el control de la fibrinólisis, no solo en cuanto a la naturaleza del centro catalítico del PA sino también en cuanto a la contribución de factores propios del coágulo y del entorno, por ejemplo los inhibidores plasmáticos.

1.2 Susceptibilidad del tPA y sus derivados a los inhibidores plasmáticos: PAI-1 y TAFIa.

Como hemos citado anteriormente, una de las posibles causas responsables de las diferencias fibrinolíticas observadas sobre los coágulos plasmáticos, puede venir definida por la contribución de los inhibidores (de mayor o menor especificidad) de los activadores del plasminógeno. Si bien existen múltiples inhibidores (PAI-1, TAFIa, C1-inhibidor, α_2 -macroglobulina, α_1 -antitripsina, entre otros) PAI-1 es el que I) más especificidad muestra por los PA, II) posee una mayor concentración plasmática (tabla 2I), y III) forma complejos irreversibles PA:PAI-1 [260, 261]. Por lo tanto, realizamos cinéticas de degradación de PFC en presencia de tPA o sus derivados, preincubados con PAI-1. En concordancia con lo postulado, observamos como a medida que aumenta la concentración de PAI-1, la Ret muestra una mayor susceptibilidad, mientras que la TNK, variante diseñada para resistir la inhibición por parte del PAI-1 [42, 61, 154, 177], es la droga más efectiva (fig. 2R a).

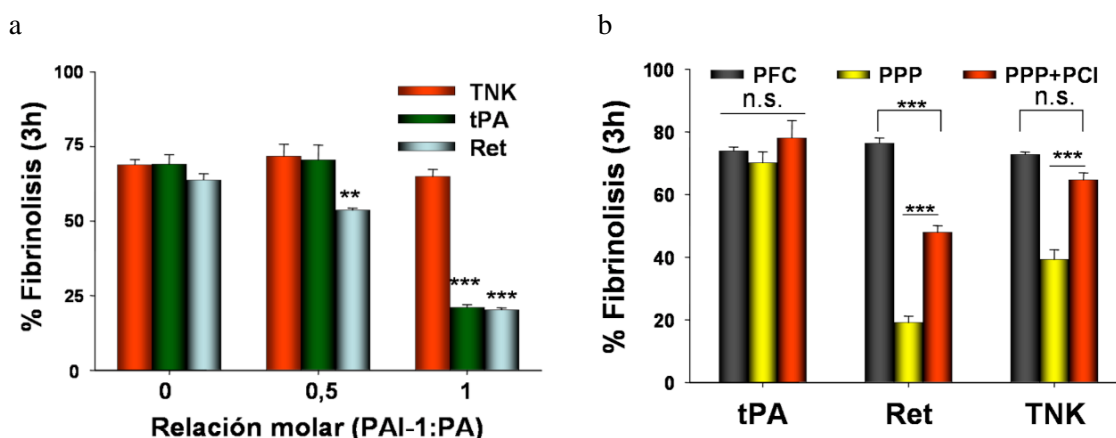


Figura 2R. Acción de los inhibidores plasmáticos PAI-1 y TAFIa en la cinética de degradación de coágulos de PFC y PPP. (a) Capacidad fibrinolítica en PFC de 2 nM de PA preincubados durante 15 minutos con distintas relaciones molares (eje de abscisas) de PAI-1. (b) Efecto inhibitorio de TAFIa sobre un ensayo fibrinolítico de 2 nM de PA sobre PFC o sobre PPP-enriquecidos en fibrinógeno (3mg/ml), preincubados o no con PCI (30µg/ml). Los datos de cada gráfica se representan como $M \pm SEM$; $n \geq 5$ experimentos. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Otro agente inhibidor importante en plasma es el TAFIa, el cual disminuye el efecto fibrinolítico a través de la reducción de los residuos Lys C- terminales generados en la Fn (véase Introducción, apartado 4.1.2). Como vimos en la figura 1R d, el enriquecimiento en Fn de los coágulos de PPP potenciaron el efecto inhibitorio del plasma sobre Ret y mostraron un descenso significativo en la actividad de TNK. En este sistema, al preincubar los coágulos con PCI, inhibidor específico del TAFIa, revertimos el efecto

que TAFIa produce sobre la TNK y recuperamos parcialmente la capacidad fibrinolítica de Ret (fig. 2R b). Es interesante remarcar que dicho grado de recuperación para Ret en presencia de PCI (2,5) es superior al obtenido para TNK (1,75). Sin embargo, no se observa ningún efecto sobre el tPA, ni cuando se enriquecen con Fg los coágulos (de forma paralela a lo que ocurría en la figura 1R), ni cuando se incorpora al coágulo el PCI (fig. 2R b).

1.3 Actividad, unión y penetración de los PA en exposición interrumpida.

Los resultados anteriores se obtuvieron mediante una exposición constante de los coágulos a los distintos PA. Sin embargo, la actividad de las drogas en una situación terapéutica muestra no solo el efecto de los inhibidores o la composición del coágulo, sino que también se puede ver influido por la concentración de dicha droga en el trombo. Así, una alta retención del PA facilitará su efecto fibrinolítico sobre el mismo. En este sentido, incubaciones transitorias de los PA sobre los PFC reflejarán, de forma más eficiente, los bajos niveles de droga que alcanzan finalmente al coágulo. En este modelo, la Ret se muestra como la droga más efectiva, mientras que la actividad tanto de tPA o TNK disminuye en un 50% aproximadamente y la de UK en un 70%. (fig. 3R a). Dicho incremento de actividad de Ret está en consonancia con una mayor retención de ^{125}I -Ret (fig. 3R b-barras rojas). Sin embargo, los resultados de retención de los ^{125}I -PA sobre PFC deplecionados de Plg eliminan las diferencias existentes entre ellos (fig 3R barras grises), lo cual sugiere una importante contribución de los distintos componentes del coágulo en la fase de retención. El incremento de moléculas de Ret en el coágulo podría deberse a una mayor relación superficie del coágulo/tamaño del PA, gracias al menor tamaño molecular de esta droga (39 KDa) frente al de tPA o TNK (60 KDa). Sin embargo, su limitada especificidad por la Fn, debido al dominio K2 dependiente de Lys, favorece su difusión hacia el interior de los coágulos [158] y con ello el incremento de moléculas retenidas. La contribución de este último efecto es suficientemente interesante, no solo por verificar su retención, sino porque la fibrinólisis sería más efectiva al actuar la droga tanto desde el exterior del coágulo como desde su interior. Para comprobar en nuestro modelo de incubación transitoria este efecto sugerido, utilizamos Fg y PA marcados fluorescentemente (FITC y DyLight 633, respectivamente), sabiendo que ni la conjugación del fluoróforo sobre el Fg impide su coagulabilidad (fig. 3R c –Fn-FITC-), ni el marcaje

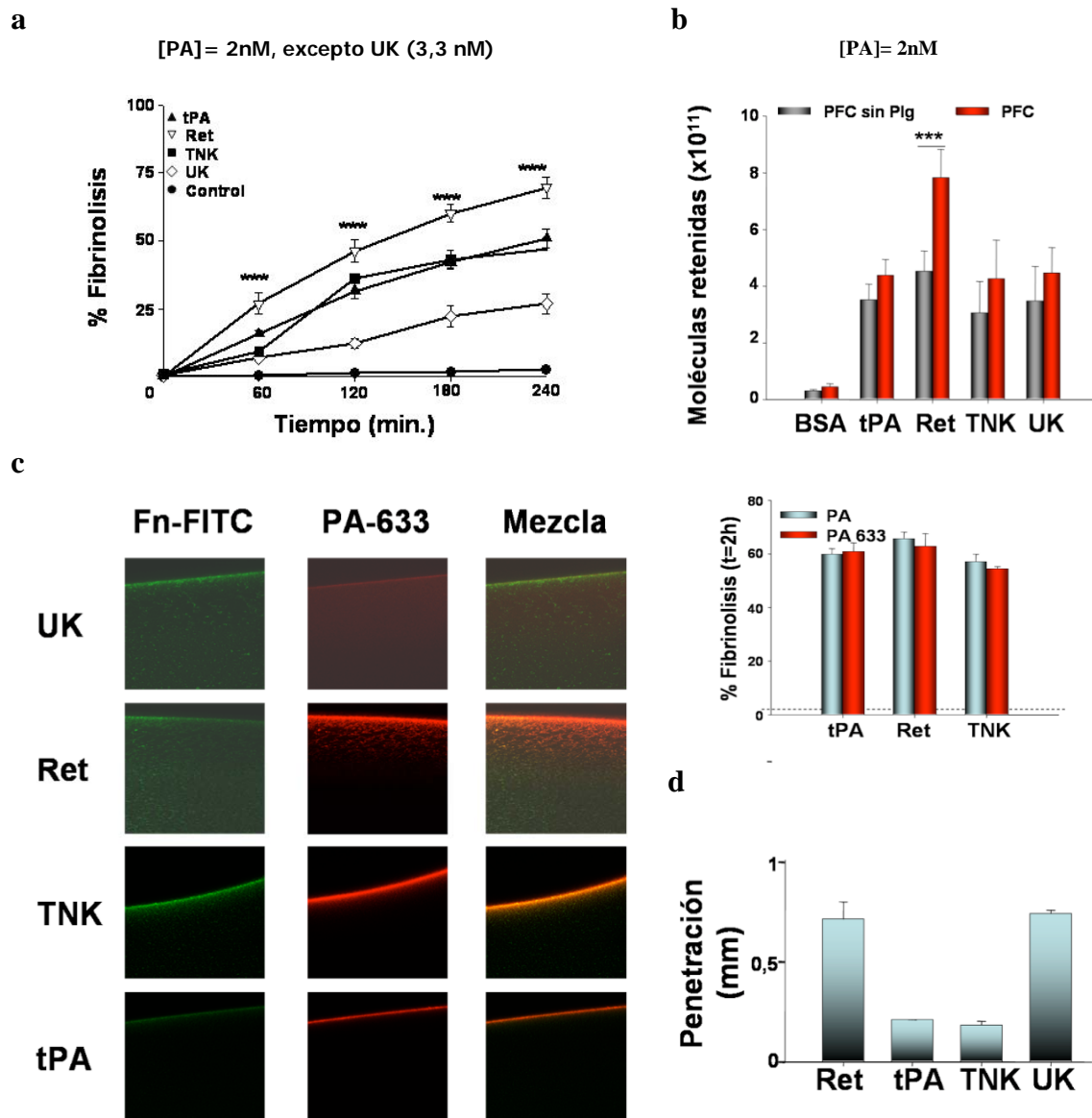


Figura 3R. Exposición transitoria (5 minutos) de los PA sobre PFC: actividad fibrinolítica, retención y penetración de los PA. (a) Cinética fibrinolítica de los distintos PA retenidos sobre ^{125}I -PFC (10 mg/ml) tras incubación a dosis equiactivas de las drogas. La incubación se realizó a 40°C para evitar la activación fibrinolítica inicial. $M \pm S.E.M$, $n=4-9$. (b) Retención de moléculas de ^{125}I -PA sobre PFC (10 mg/ml) bien en presencia (Fg) o ausencia de Plg (Fg-Plg). $M \pm S.E.M$, $n=5-9$. (c) Imágenes representativas mediante microscopía confocal del análisis de la penetración de los PA marcados con fluoróforo 633 (rojo) sobre PFC-enriquecidos en Fg (3mg/ml) marcado con FITC (verde). La colocalización de ambos marcajes (mezcla) aparece coloreada en naranja. (Panel interno) Actividad fibrinolítica en PFC (2 horas) de las drogas marcadas con agente fluoróforo en un ensayo de degradación por exposición constante del PFC a la droga; $M \pm S.E.M$, $n=3$. (d) Medición de la distancia de penetración de los distintos PA marcados fluorescentemente en el PFC; $M \pm S.E.M$, $n=3$.

controlado de los PA (0,5-1 moléculas de fluoroforo/PA) alteran su capacidad fibrinolítica (fig. 3R c, panel). Si medimos la distancia de penetración de los PA así como su colocalización con la Fn mediante microscopía confocal, observamos como Ret y UK penetran más profundamente hacia el interior del coágulo, como esperábamos y en función de su menor (Ret) y limitada (UK) capacidad de unión a la Fn. Por otro lado, el tPA y la TNK quedan atrapados en la superficie de los coágulos debido a su alta afinidad por la Fn (fig. 3R c y d). Estos últimos colocalizan completamente con la Fn del coágulo (fig. 3R c, "mezcla") donde se hace patente el color naranja por la superposición de ambas imágenes. Dicha colocalización se evidencia también en el caso de la Ret a lo largo de su distancia de difusión, acorde con su cierta afinidad por la Fn. Sin embargo, la colocalización desaparece en los coágulos incubados con UK (tono rojo en la mezcla), debido a su falta de especificidad por la Fn, a pesar de que este PA profundiza en el coágulo a niveles similares a la Ret (fig. 3R c y d).

1.4 Caracterización de los PA *in vivo*: retención de los PA y actividad fibrinolítica.

Para comprobar el comportamiento de los distintos PA *in vivo*, utilizamos el modelo de tromboembolismo pulmonar en ratón (véase Materiales y Métodos apartado 4). La retención ocurre de forma inmediata, por efecto meramente mecánico, distribuyéndose de forma homogénea en el órgano [71] y si no existe un tratamiento fibrinolítico efectivo, los coágulos se mantienen durante al menos 3 horas sin variación reseñable (fig. 4R a). Por lo tanto, para comprobar la capacidad fibrinolítica de las drogas en estudio, inyectamos en el ratón una dosis equimolar de los distintos PA dentro del rango farmacológico usado en la clínica (0,5-2 mg/kg). Usando la dosis más baja de 8,3 nmol/kg (comparable a la dosis de 0,5 mg/kg para tPA) observamos como Ret es la droga más activa (fig. 4R b, panel izquierdo). Ret disuelve la carga embólica casi por completo tras 50 minutos de su administración. Por el contrario, tanto tPA, la droga de elección en clínica, como TNK, una droga con la misma vida media que Ret y resistente al principal inhibidor de los PA, el PAI-1, no solo son incapaces de producir unos niveles de lisis comparables al de Ret, sino que no muestran un efecto fibrinolítico apreciable (fig. 4R b, panel izquierdo). Este mismo comportamiento se muestra en la UK (fig. 4R b, panel izquierdo), una droga que *in vitro* mostró una menor eficiencia enzimática que tPA o TNK (véanse figs. 1R y 2R). Incrementando 4 veces la dosis de PA administrada en el animal,

33 nmol/kg (comparable a 2 mg/kg de tPA), la Ret aumenta su efecto fibrinolítico, pese a que el margen mejorable es escaso, y tPA consigue igualar los resultados obtenidos por la dosis baja de Ret (8,3 nmol/kg). TNK mejora sustancialmente su efecto fibrinolítico, pero queda a la par del efecto de UK sin llegar a la eficiencia del tPA (fig. 4R b, panel derecho). Conscientes de estos resultados, comprobamos si la mayor actividad de Ret también coincidía con una mayor retención de la droga en la zona embólica. Para ello, utilizamos coágulos sin marcar, e inyectamos droga marcada radiactivamente. Los resultados se muestran tras 10 minutos de la inyección de la droga, cuando aún no ha sido posible obtener actividad fibrinolítica y usando concentraciones trazadoras y equimolares de los PA. De esta forma, y paralelamente a la actividad de Ret en el modelo, es esta droga la que aumenta considerablemente su presencia en el órgano embólico frente a la escasa retención de las drogas altamente específicas con respecto a la Fn (tPA y TNK) o frente a la capacidad de penetración de la UK (fig. 4R c).

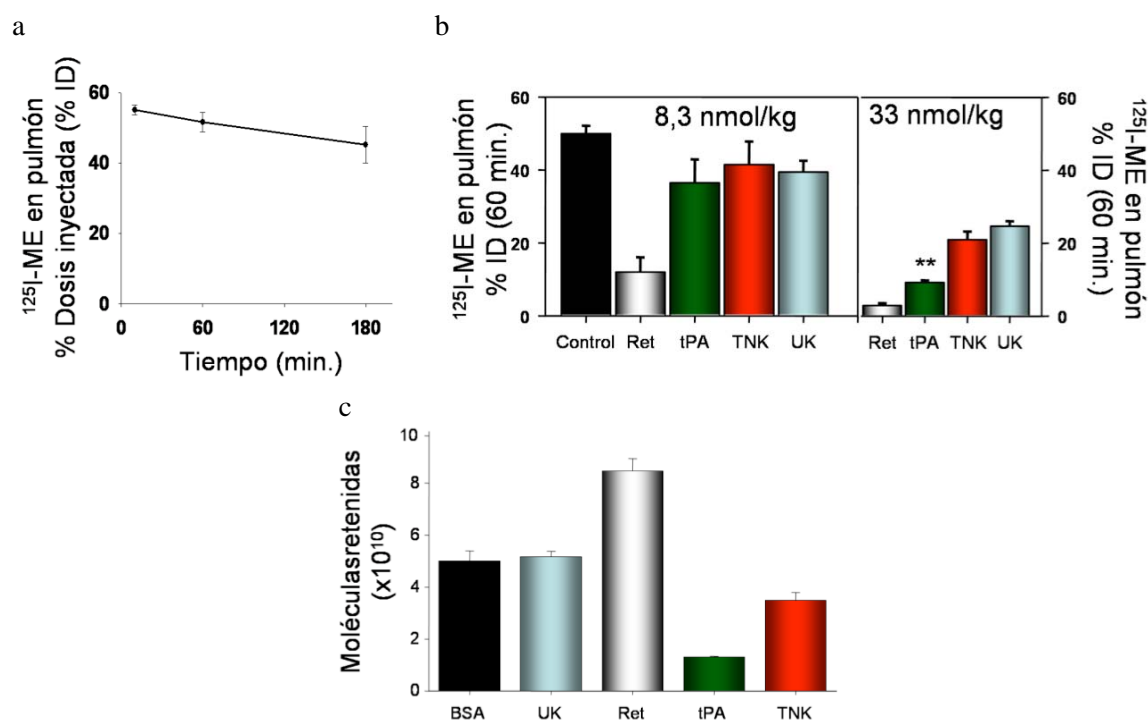


Figura 4R. Degradación de ME en la vasculatura pulmonar y retención de los PA. (a) Cinética de degradación endógena de los ¹²⁵I-ME en la vasculatura pulmonar del ratón tras su administración intravenosa y retención. Los datos recogen M±SEM, n= 6-9 provenientes de 2-3 experimentos distintos. (b) Análisis de la capacidad fibrinolítica de los distintos PA sobre los ¹²⁵I-ME retenidos en la vasculatura pulmonar del ratón. La droga se administra a las dosis indicadas (equivalentes a 0,5 -izquierda- y 2 mg/kg -derecha- de tPA) 10 minutos después de los ME. Los datos se presentan como la M±SEM, siendo n= 10-12 animales (8,3 nmol/kg); 3-5 animales (33 nmol/kg). (c) Cuantificación de las moléculas de ¹²⁵I-PA retenidas en los pulmones de ratones pretratados con ME. La retención se mide 10 minutos tras la inyección de la droga, M±SEM n= 9-10 animales de 3-4 experimentos distintos.

2. FORMACIÓN DE CONJUGADOS SA-PA Y COMPLEJOS RBC-PA.

Resultados previos del laboratorio ponen de manifiesto el desarrollo de una nueva especie terapéutica inexistente hasta el momento: el uso de agentes fibrinolíticos en la terapia trombotoprolíctica. Para ello, el PA debe unirse a la superficie eritrocitaria desde donde ejerce su acción trombolítica de los coágulos nacientes, preservando la viabilidad de los hemostáticos. Sin embargo y pese al avance indiscutible que este sistema ofrecería, se trata de un proceso largo y complicado que requiere el aislamiento de los RBC de la sangre, su modificación química y posterior unión de la droga antes de administrarlos al paciente. Durante los últimos años han surgido múltiples trabajos tendentes a mejorar el sistema de generación de los complejos RBC-PA donde estos se podrían formar potencialmente en circulación mediante el uso de Ac monoclonales [79]. No obstante, éste proceso pierde universalidad en cuanto a las especies testadas, limitando mucho los ensayos de comprobación terapéutica. En los próximos apartados desarrollaremos diferentes aproximaciones con la intención de facilitar la generación de los complejos trombotoprolícticos, mediante la obtención de conjugados SA-PA. De esta manera recuperaremos de nuevo la universalidad del sistema mediante la unión de dichos conjugados a la superficie eritrocitaria biotinilada, habilitando así el ensayo a eritrocitos de cualquier especie animal.

2.1 Biotinilación directa in vivo.

En este primer apartado, nos centramos en la posibilidad de modificar directamente los RBC con biotina en sangre. Esto facilitaría la forma de generar los complejos RBCb/SA-PA en el paciente hospitalario, además de abrir la posibilidad de generar los eritrocitos biotinilados también en las propias bolsas de transfusión, utilizadas comúnmente en cirugía, donde la trombotoprolifaxis postoperatoria es esencial. El grado de modificación de los RBC con biotina, que no altera la viabilidad celular, permite la incorporación de un número de moléculas de SA que fluctúa entre las $3-18 \times 10^4$ moléculas/RBCb. Estas cantidades las obtenemos según el proceso clásico de biotinilación (aislando previamente los RBC de sangre) en un rango de concentraciones de biotina de entre 0,02 a 0,04 mM. No obstante, es posible aumentar el grado de modificación eritrocitaria con concentraciones mayores del reactivo biotinilante, uniendo más moléculas de SA de una forma lineal (fig. 5R, línea). Estos resultados se reproducen de forma efectiva al modificar directamente en circulación la sangre de los animales. Así al inyectar iv. concentraciones del orden de 1,3-2,6 mM de reactivo biotinilante, obtenemos una

modificación eritrocitaria paralela al rango de 0,02-0,04 del proceso clásico, mientras que al inyectar concentraciones superiores (5,2 mM) obtenemos modificaciones elevadas de los RBC (fig. 5R, barras). De este modo, podremos generar los RBCb en sangre completa, bien directamente en circulación o bien en la bolsa de transfusión sanguínea.

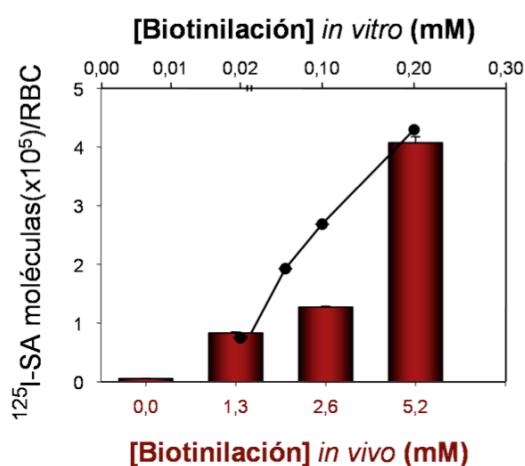


Figura 5R. Biotilación eritrocitaria *ex vivo* e *in vivo*. Análisis del grado de modificación con biotina de los eritrocitos de ratón tras su aislamiento de la sangre, eje "x" superior y línea continua, o directamente en la sangre del animal tras la inoculación intravenosa del reactivo de biotina a las concentraciones indicadas, eje "x" inferior y barras. La cuantificación del grado de biotilación se realiza tras la incubación de un exceso de $^{125}\text{I-SA}$ sobre los eritrocitos aislados; $M \pm \text{SEM}$, $n=6-12$.

Por otro lado, podemos observar como grados moderados de modificación de los RBCb_x (aquellos que incorporan de 3 a 18×10^4 moléculas de SA/RBCb_{10-40} ; siendo "x" la concentración de biotina expresada en μM) muestran una circulación prolongada al estudiar los complejos marcados radiactivamente $^{51}\text{CrRBCb}_{10-40}/^{125}\text{I-SA}$ (fig. 6R a y b). Sin embargo, su circulación se encuentra sensiblemente comprometida al aumentar el grado de modificación de los eritrocitos, y así los $\text{RBCb}_{100}/\text{SA}$ (fig. 6R a y b), los cuales incorporan 27×10^4 moléculas de SA, son retirados de la circulación a través de hígado y bazo de forma más rápida (fig. 6R d y e). Ambos marcadores radioactivos se distribuyen en la fracción celular sanguínea $>95\%$ (véase Materiales y Métodos apartado 8.4.1) lo que sugiere que en todo momento la molécula conjugada al eritrocito (en este caso SA) se mantiene unida a su portador en circulación (fig. 6R c). Para el resto de concentraciones más moderadas ambos marcadores isotópicos también se distribuyen de forma paralela (fig. 6R d y e), donde aparte de la sangre (datos recogidos en las gráficas a y b), los isótopos aparecen también en hígado y bazo. Sin embargo, aunque en el caso de los RBCb_{100} los niveles en hígado y bazo son elevados, para modificaciones menores los niveles son sensiblemente más bajos coincidiendo con grados de modificación eritrocitarios más bajos, sugiriendo una circulación más estable.

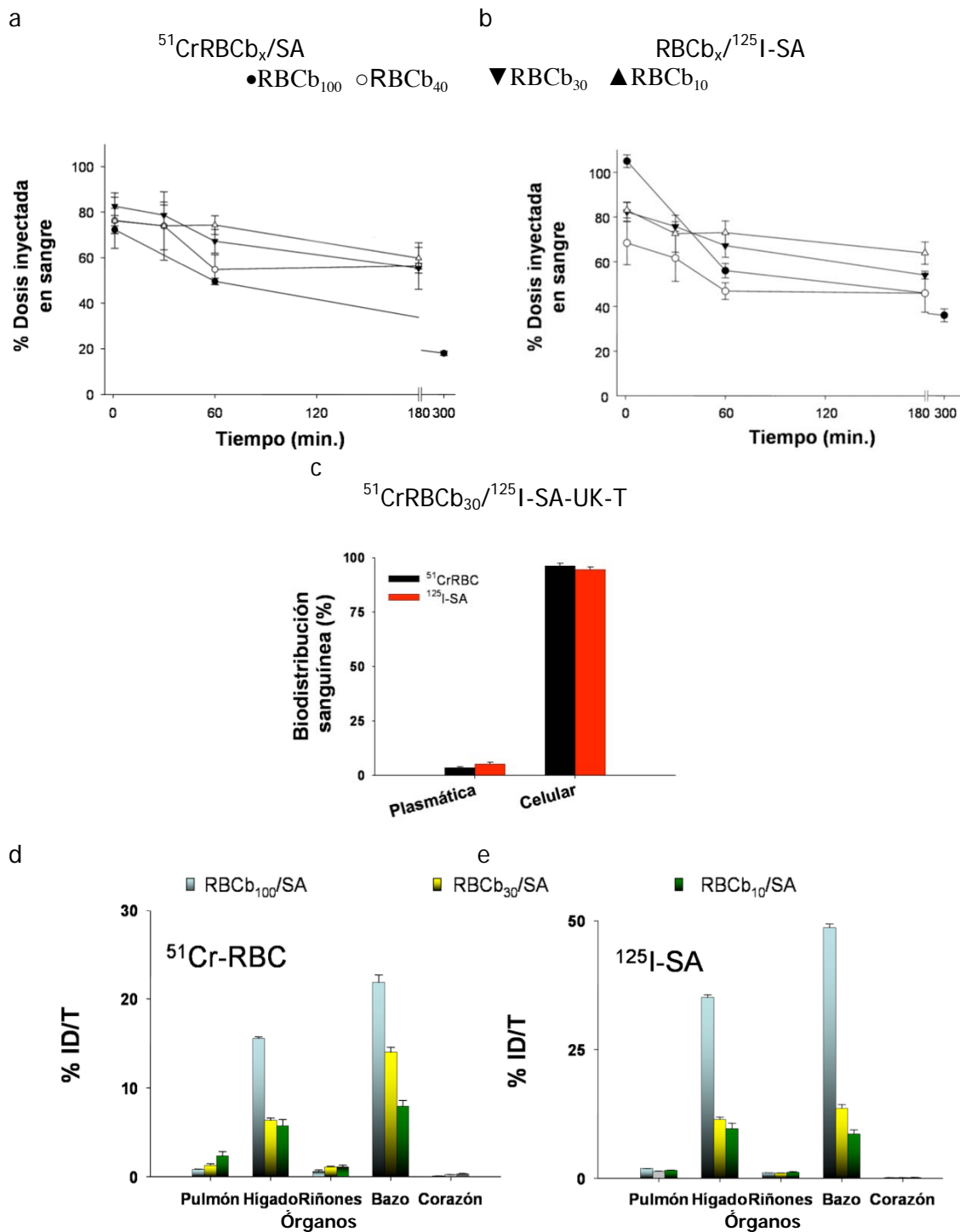


Figura 6R. Estudio de la circulación de complejos RBC/SA. Cinética en sangre de los complejos $^{51}\text{CrRBCb}_x/^{125}\text{I-SA}$ (a) Seguimiento del ^{51}Cr asociado al RBCb_x del complejo. (b) Seguimiento del ^{125}I asociado a la SA del complejo. Los datos se presentan como el porcentaje presente en sangre de la dosis inicial inyectada. (c) Biodistribución de los $^{51}\text{CrRBCb}_x$ del complejo por tejido 1 hora después de la administración de los mismos. (d) Biodistribución de los $^{125}\text{I-SA}$ de los complejos por tejido. Se excluye el dato de la sangre para magnificar los niveles de los tejidos en la gráfica. $M \pm \text{SEM}$, $n=3$ animales por grupo.

2.2 Modificaciones de la SA y del PA con los agentes bifuncionales SATA y sulfo-SMCC.

Tras comprobar que la incorporación de los residuos de biotina en la superficie eritrocitaria directamente en circulación es factible y que ésta alcanza niveles adecuados sin alterar su capacidad de circulación, procedemos a generar conjugados SA-PA los cuales puedan formar complejos con los RBCb en un solo paso. En el presente apartado perseguimos la obtención de compuestos químicos SA-PA, unidos mediante enlaces covalentes formados entre los agentes entrecruzantes (SATA y sulfo-SMCC), los cuales son introducidos selectivamente en ambos componentes del conjugado. Ambos agentes entrecruzantes reaccionan con las aminas primarias de la SA y de los PA gracias al grupo NHS-éster, incorporando de 0,5 a 4,5 residuos del reactivo según el exceso molar aplicado (de 3x a 30x; véase tabla 1MM). Tras su incorporación, es necesario comprobar que el grado de modificación de la SA o del PA no compromete su funcionalidad. Podemos observar (fig. 7R a) como modificaciones moderadas de la SA (~1 residuo/molécula) con SATA mantienen su capacidad de unión a la superficie de eritrocitos biotinizados, mientras que la introducción de 1 residuo de SMCC por molécula de SA disminuye levemente la unión de ésta sobre los RBCb. En ningún caso, las modificaciones por estos agentes alteran la migración electroforética de la SA modificada resultante (fig. 7R b) mostrando, tanto SA_{SATA} como SA_{SMCC} una única banda que se corresponde con el PM esperado de la SA sin modificar.

Dado que buscamos la obtención de conjugados (SA-PA) estables en circulación, trataremos de modificar las moléculas de forma individual evitando la pérdida de funcionalidad de las mismas y favoreciendo la generación de compuestos bimoleculares SA-PA. De esta manera, trataremos que el conjugado resultante, además de incorporar una única molécula de PA, presente una única molécula de SA. De esta manera evitaremos la generación de conjugados multimoleculares que promuevan interacciones múltiples entre varias unidades de SA presentes en un mismo conjugado y diversos residuos de biotina, bien en la misma superficie eritrocitaria o entre las superficies de distintos RBCb. De ocurrir así, la unión multivalente podría provocar a) la alteración de las proteínas controladoras del complemento, b) la disminución de la deformabilidad de los eritrocitos y/o c) la generación de especies agregadas (fig. 2MM) fácilmente eliminables por el RES.

Para conjugar a la SA, elegimos dos moléculas distintas de PA, por un lado la TNK y por otro la Ret. Así, las modificaciones de la TNK con SMCC o SATA muestran en SDS-

PAGE bajo condiciones reductoras un comportamiento diferente. De este modo, en el caso de la modificación con SMCC aparecen tanto las bandas correspondientes a la TNK nativa (fig. 8R a –TNK-), como también un conjunto de bandas de mayor PM que podrían reflejar la generación de especies multimoleculares (fig. 8R a, -SMCC-). En el caso de la modificación con SATA se aprecian exclusivamente las bandas correspondientes a la TNK nativa (fig 8R a, -SATA-): 60 kDa, correspondiente a la proteína de cadena sencilla, y 35 kDa y 25 kDa, como representantes de su conversión a la proteína de doble cadena. Con el fin de buscar una segunda alternativa, utilizamos otro agente fibrinolítico que carece de varios núcleos de la molécula original de tPA, los cuales podrían fomentar la interacción multimolecular. De este modo las modificaciones de Ret con SMCC no producen multímeros (fig. 8R b) mostrando una banda que migra aproximadamente a 35 kDa, al igual que la Ret no modificada, de acuerdo con su PM esperado (39 kDa).

Las modificaciones de los PA con los reactivos elegidos muestran un mantenimiento de su potencia fibrinolítica, siempre y cuando el grado de modificación no exceda la incorporación de más de un residuo de reactivo por molécula de PA. Esto se refleja en los ensayos de degradación sobre coágulos (PFC) con modificaciones crecientes de TNK_{SATA} y Ret_{SMCC} (fig. 8R c y d, respectivamente), donde observamos como la incorporación de 0,8 residuos de reactivo por molécula de PA mantiene una capacidad fibrinolítica idéntica a la de la proteína sin modificar.

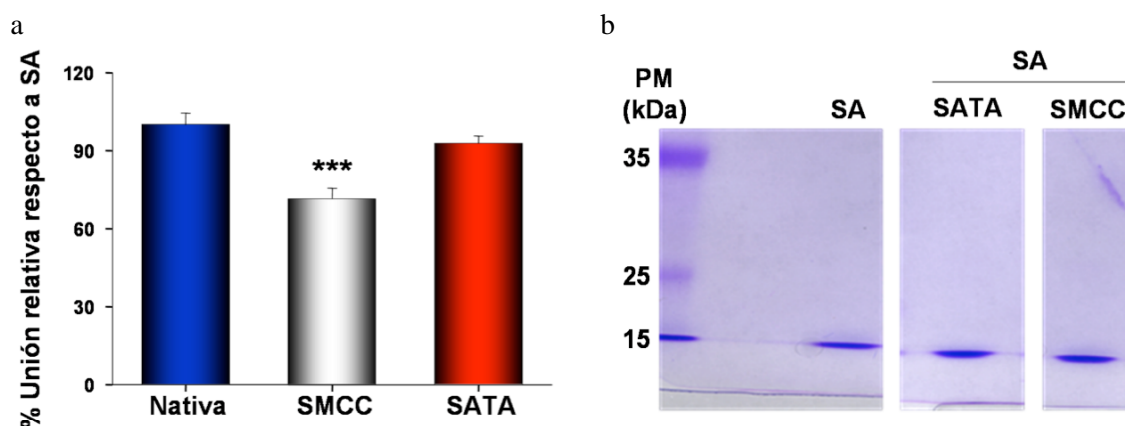


Figura 7R. Estudio de la funcionalidad de SA tras su modificación por los agentes bifuncionales SATA y sulfo-SMCC. (a) Muestra el porcentaje de unión de la SA modificada tanto con SATA como con SMCC comparada con la SA sin modificar sobre $RBCb_{20}$. $M \pm S.E.M$, $n=5-12$. (b) SDS-PAGE representativo en condiciones reductoras de la SA y la SA modificada tanto con SATA como con SMCC, incorporando 1 residuo de reactivo por molécula de SA.

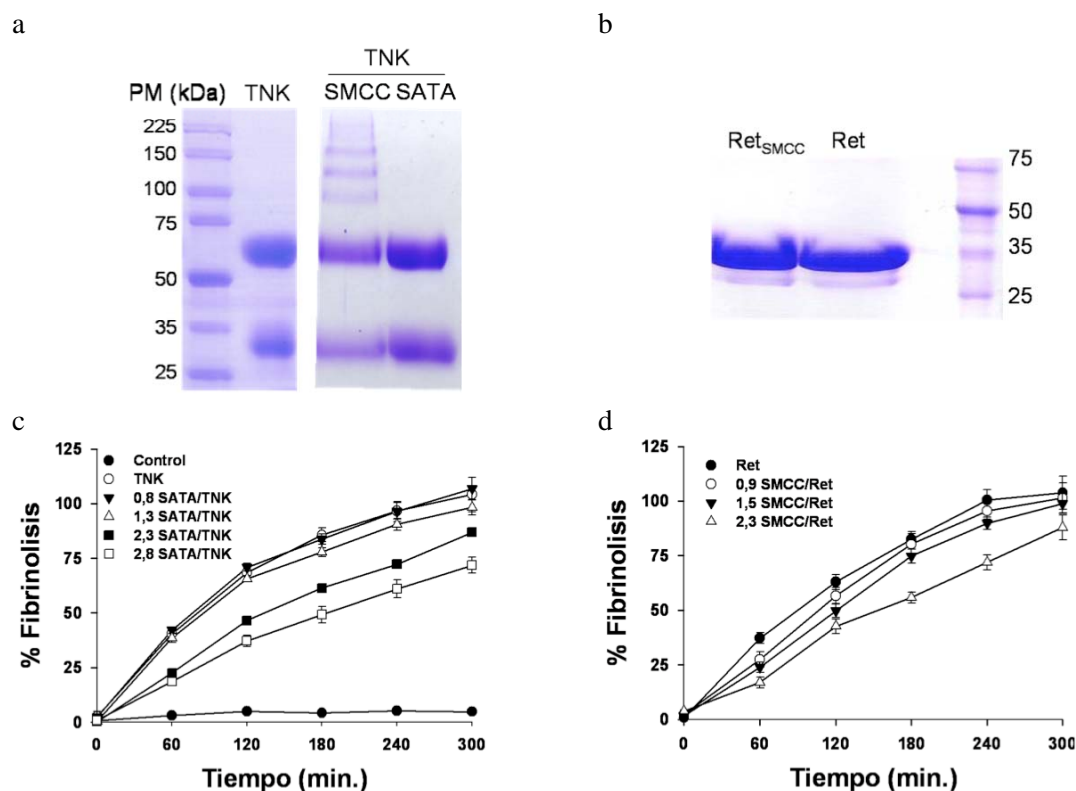


Figura 8R. Estudio de la funcionalidad de PA modificados por los agentes bifuncionales SATA y sulfo-SMCC (a), SDS-PAGE representativo en condiciones reductoras de la TNK modificada, o no, con 0,8 residuos de SATA o SMCC por molécula de PA (b) SDS-PAGE representativo en condiciones reductoras de la Ret sin modificar o modificada con 0,8 residuos de SMCC por molécula de PA. (c y d) Muestran cinéticas de degradación de PFC con distintos grados de modificación de la TNK_{SATA} (c) o de la Ret_{SMCC} (d). Los datos se muestran como M±S.E.M, n=3 por condición y proteína.

2.2.1 Formación de conjugados SA-TNK.

Puesto que la conjugación del PA al RBC aumentará considerablemente la vida media del fibrinolítico en circulación, y dado que estará expuesto a la acción constante de los inhibidores plasmáticos (principalmente PAI-1), escogimos la TNK como la candidata inicial para realizar los conjugados químicos, ya que esta molécula presenta resistencia frente al PAI-1 (fig. 2R a).

Si bien es posible formar conjugados SA-TNK de forma independientemente al agente entrecruzante incorporado en cada una de las moléculas a conjugar (fig. 7R y 8R), nos decantamos por los conjugados SA_{SMCC-SATA}TNK debido a que la modificación de la TNK con SATA no forma agregados multimoleculares *per se* (fig. 8R a). En este sentido, la combinación de SA_{SMCC} con TNK_{SATA} genera la aparición de nuevas bandas de PM de 40 kDa y 45 kDa que se corresponden con los conjugados formados entre una molécula de SA y otra de TNK de doble cadena, y de 75 kDa que representan derivados con la TNK de

cadena sencilla (fig. 9R a calle 1 y fig. 9R b calles 4-6, flechas). Además, dichos conjugados ocurren únicamente tras la activación del residuo SATA de la TNK_{SATA} (fig. 9R b calle 3 inactivada versus calles 4-6 activada) que permite la reacción de ésta con el SMCC, hecho que pone de manifiesto la especificidad y el control de la formación del complejo deseado. Además estos conjugados aumentan a medida que disminuimos la relación $SA_{SMCC}:SATA$ TNK (fig. 9R b; calles 4 -1:1-, 5 -1:3-, 6 -1:5-), seleccionando la relación 1:5 puesto que la formación de especies multimoleculares sería la menos favorable. No obstante y pese a que en la TNK_{SATA} individual no aparecían agregados de alto peso molecular, la generación del conjugado con SA_{SMCC} sí que parece mostrar la presencia de especies multimoleculares no bien definidas (fig. 9R a, calle 1; 9R b, calles 4-6, llave).

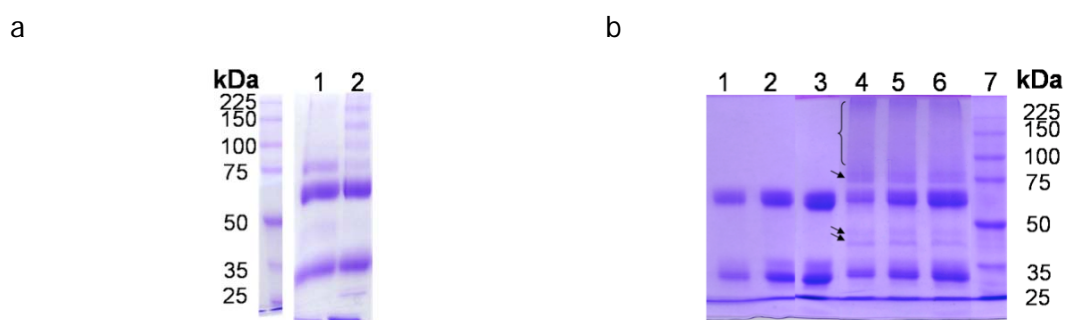


Figura 9R. Formación de conjugados SA-TNK. Geles representativos SDS-PAGE en condiciones reductoras de los conjugados SA-TNK. El gel de la izquierda (a) muestra los conjugados formados mediante $SA_{SMCC-SATA}TNK$ (1) apareciendo como dos bandas a 50 y 75 kDa, o $SA_{SATA-SMCC}TNK$ (2) apareciendo como un grupo de bandas multimoleculares. (b) El gel de la derecha muestra el estudio de la conjugación bajo distintas relaciones molares de la SA_{SMCC} y la TNK_{SATA} , donde la calle 1 muestra a la TNK , calle 2 TNK_{SATA} , calle 3 TNK_{SATA} (sin tratamiento con hidroxilamina) + SA_{SMCC} , calles 4-6 $SA_{SMCC} + TNK_{SATA}$ en presencia de hidroxilamina pero a relaciones molares 1:1 (4), 1:3 (5) y 1:5 (6). La calle 7 muestra el patrón de pesos moleculares.

2.2.1.1 Unión de los conjugados SA-TNK a RBCb.

Pese a la presencia de dichas especies multimoleculares en los conjugados SA-TNK, quisimos comprobar si estos eran capaces de unirse a los RBCb, eligiendo una modificación moderada de los RBC con reactivo biotilante que disminuyese la posibilidad de agregaciones ($RBCb_{20}$). Para ello marcamos radiactivamente la ^{125}I -TNK previa modificación con SATA. Por lo tanto, generamos los conjugados $SA-^{125}I$ -TNK los cuales se unen de forma específica a los $RBCb_{20}$, 14.090 ± 1.132 moléculas/ $RBCb_{20}$ frente a 682 ± 79 moléculas/RBC (fig. 10R a). Además, el conjugado demuestra ser fibrinolíticamente activo, al introducir 10^7 RBC-PA en el interior de PFC (fig. 11R c). Sin embargo, los complejos $RBCb_{20}/SA$ -TNK generan precipitados anormales en pocillos de fondo cónico,

frente a la precipitación homogénea y estable mostrada por los RBCb₂₀/SA, lo cual sugiere la agregación de los RBCb₂₀/SA-TNK (fig. 10R b), que podría estar relacionada con la formación de conjugados multimoleculares (fig. 9R b, calles 4-6, llave). La agregación eritrocitaria al generar estos complejos impediría su utilización *in vivo*, dado que serían retirados rápidamente de la circulación [195].

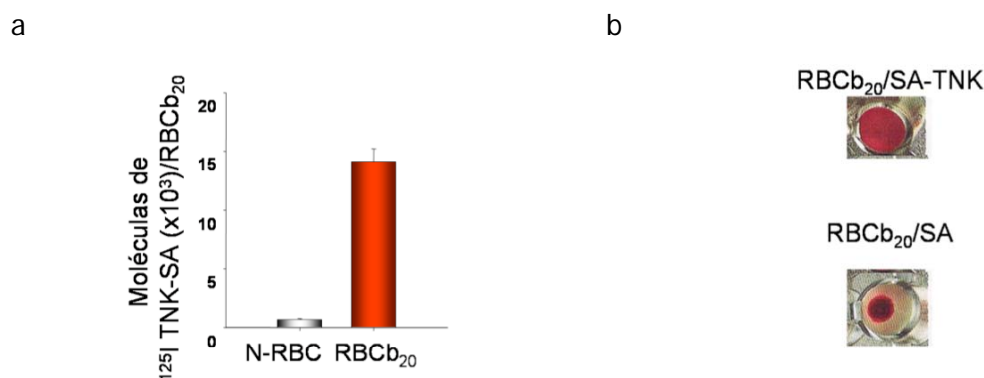


Figura 10R. Unión y agregación de los complejos RBCb₂₀/SA-TNK. (a) Análisis de unión sobre eritrocitos modificados con reactivo de biotina (RBCb₂₀) o controles (N-RBC) de conjugados 1:5 de SA_{SMCC}: SA_{TATN}K. (b) Ensayo de precipitación eritrocitaria donde se observa la precipitación homogénea en el fondo del pocillo para los RBCb/SA y la heterogénea de los complejos RBCb₂₀/SA-TNK sugiriendo agregación.

2.2.1.2 Purificación de los complejos SA-TNK mediante FPLC.

Con la intención de analizar más detenidamente la aparición de estos compuestos multimoleculares (SA_x-TNK_y)_n y aislar los conjugados bimoleculares sometimos la muestra a una separación cromatográfica en función de su peso molecular mediante columnas de FPLC. Los eluidos de la columna proveen diferentes especies de PM variables que representan conjugados (SA_x-TNK_y)_n de mayor a menor PM, pero cuyas separaciones muestran picos no bien definidos dada la escasa diferencia de PM entre los distintos compuestos obtenidos (fig. 11R a, fracciones 2-6), salvo para la muestra que no ha reaccionado y que se eluye en las fracciones finales (fig. 11R a, SA+TNK -cuadro negro-). La conjugación de las especies purificadas en cada una de las fracciones seleccionadas (fig. 11R a, fracciones 2-6) a los RBCb otorgan compuestos que producen una agregación decreciente (fig. 11R b) y que culminan en la fracción 6 con un conjugado en el que se ha disminuido considerablemente el grado de agregación. Por tanto, sería potencialmente estable en circulación. Además, la fracción 6, genera un complejo RBCb₂₀/SA-TNK fibrinolíticamente activo cuya actividad enzimática, proveniente de 10⁷ RBCb₂₀/SA-TNK, se encuentra sensiblemente disminuida en comparación con el compuesto no purificado (fig.

11R c). Sin embargo, la proximidad de los pesos moleculares de SA-TNK entre las especies bimoleculares y las multimoleculares es relativamente próxima y la resolución de la purificación por FPLC es muy limitada. Esto da lugar a un rendimiento de la purificación en torno al 3 %, por lo que la generación de conjugados suficientes para iniciar experimentos *in vivo* supone un coste económico que supera las posibilidades del laboratorio.

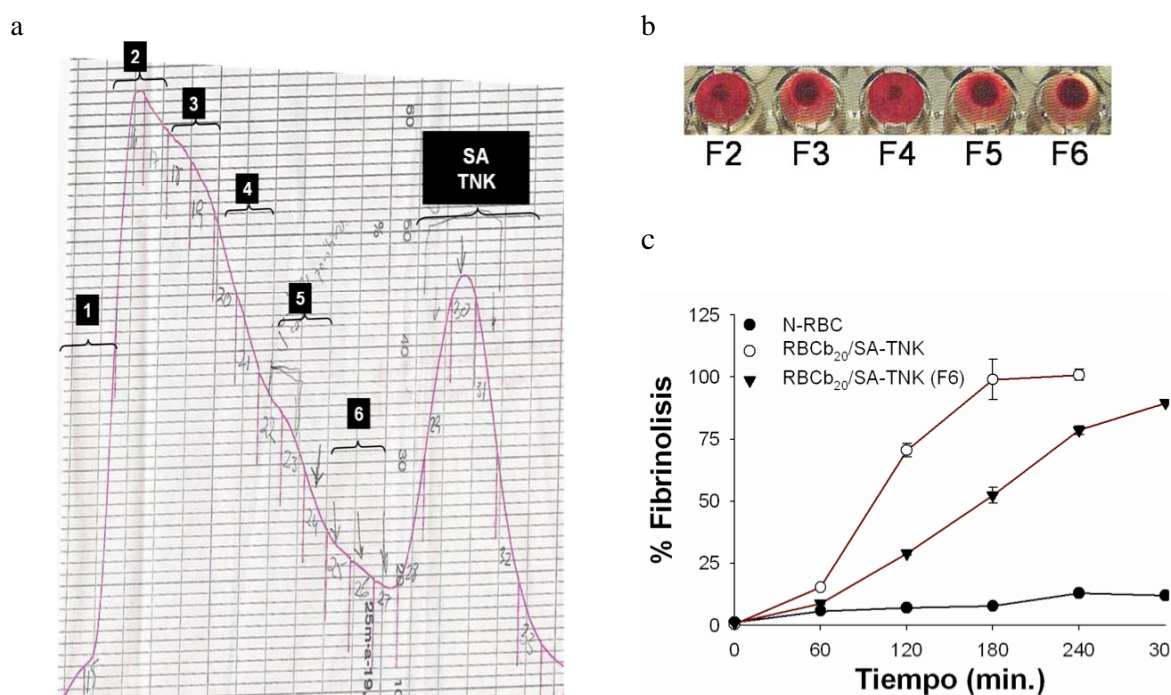


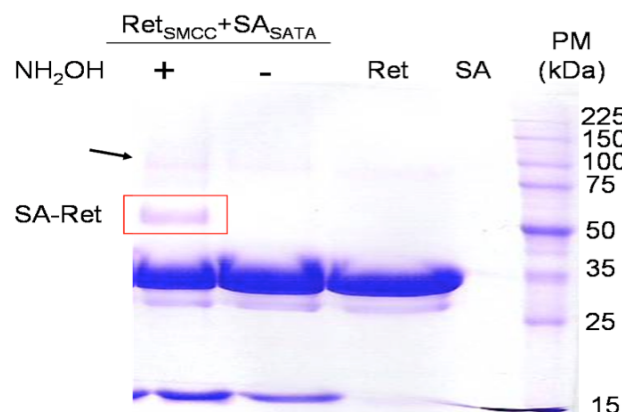
Figura 11R. Purificación de los conjugados SA-TNK, agregación y actividad fibrinolítica de los complejos RBCb₂₀/SA-TNK. (a) Purificación mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño de los conjugados en relación 1:5 de SA_{SMCC}: SA_{TAT}TNK donde se observan las distintas fracciones eluidas (1-6) de mayor a menor PM de los conjugados o de la proteína remanente que no haya reaccionado (SA y TNK). (b) Ensayo de precipitación eritrocitaria de los complejos RBCb₂₀/SA-TNK formados con las distintas fracciones purificadas en (a). (c) Cinética de degradación sobre PFC en los que se incorporan N-RBC (como control) o RBCb₂₀/SA-TNK, los cuales han sido modificados por los conjugados formados directamente o bien por los conjugados purificados (F6).

2.2.2 Formación de conjugados SA-Ret.

Con el fin de buscar una alternativa más eficiente a la conjugación anterior, utilizamos la Ret_{SMCC}, la cual presenta menos aminas libres accesibles para su modificación por el agente entrecruzante, limitando posiblemente la formación de multímeros de (SA_x-Ret_y)_n. De este modo, cuando incubamos la Ret_{SMCC} con la SA_{SATA}, sin activar mediante la hidroxilamina, los reactivos entrecruzantes no reaccionan entre sí y observamos las bandas correspondientes a las especies individuales (fig. 12R: calle Ret_{SMCC}+SA_{SATA} "-" y

calles Ret y SA). Sin embargo, cuando se activa la SA_{SATA} aparece una banda a 50 kDa correspondiente a la especie conjugada SA-Ret (fig. 12R: calle Ret_{SMCC}+SA_{SATA} "+").

Figura 12R. Estudio electroforético de los conjugados SA-Ret. Se muestra un gel representativo SDS-PAGE en condiciones reductoras de las especies individuales o mezclas para su conjugación en presencia o ausencia del catalizador de la conjugación: la hidroxilamina (NH₂OH). La caja roja indica la presencia del conjugado bimolecular y la flecha la presencia de especies multimoleculares.



Los conjugados SA-Ret muestran una unión dosis dependiente sobre RBCb_x. De este modo, a medida que aumenta el grado de biotilación de los RBC aumenta el número de moléculas de SA-¹²⁵I-Ret incorporadas de forma específica a la superficie de los RBCb_x (fig. 13R a). Así, se alcanza un máximo de aproximadamente 85.000 moléculas de SA-¹²⁵I-Ret/RBCb₂₀₀, sin haber llegado aún a la saturación del sistema. Otro hecho interesante es la falta de agregación observada en los complejos formados con RBC biotilados moderadamente (RBCb₂₀₋₆₀/SA-Ret), mientras que la agregación comienza a aparecer con niveles más elevados de biotilación, RBCb₁₀₀ ó RBC₂₀₀ (fig. 13R b). La actividad fibrinolítica de los complejos RBCb_x/SA-Ret aumenta de forma paralela al grado de modificación de los RBCb, lo cual está en consonancia con el número de moléculas de Ret unidas a la superficie eritrocitaria, por lo tanto, el aumento del grado de biotilación eritrocitaria producirá una fibrinólisis más rápida (fig. 13R c). Aunque todos estos resultados son altamente prometedores, los complejos RBCb_x/SA-Ret muestran un problema esencial que radica en un desprendimiento considerable de la unión del conjugado a su portador tras un tiempo relativamente corto (pocas horas desde su preparación), con aproximadamente un 50 % del conjugado unido inicialmente desprendido de la superficie eritrocitaria. Aunque aquellos eritrocitos conjugados poseen una estabilidad *in vitro* de los complejos importante, dicha estabilidad (referente a la unión) disminuye considerablemente tras una simple incubación (fig 13R d). Dicha falta de control sobre la muestra sugiere no proseguir con la consecución de los experimentos *in vivo*. Además, es probable que las alteraciones de las moléculas de PA y SA y su conjugación inicial mediante sucesivas transformaciones den unas especies poco

controlables. Todos estos resultados nos llevan a desarrollar otras opciones centradas en la síntesis de los conjugados perseguidos mediante el diseño genético.

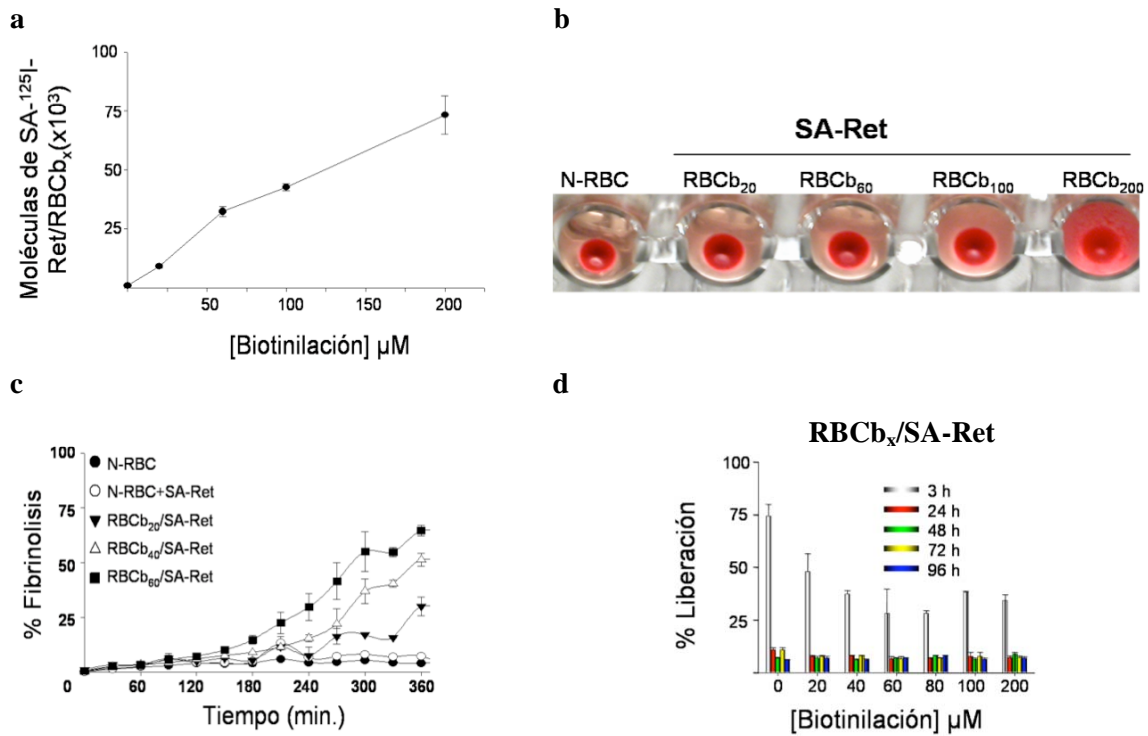


Figura 13R. Caracterización de los complejos RBCb_x/SA-Ret. (a) Unión específica del conjugado SA-Ret sobre eritrocitos biotinilados a distintas concentraciones. (b) Ensayo de precipitación de RBCb_x/SA-Ret en pocillo. (c) Ensayo fibrinolítico sobre PFC de conjugados RBCb_x/SA-Ret formados a partir de distintos grados de modificación eritrocitaria. (e) Ensayo de estabilidad *in vitro* de los complejos formados con los RBCb_x. M \pm SEM, n= 6- 12 Determinaciones provenientes de 2-4 experimentos.

3. GENERACIÓN DE FP Y CARACTERIZACIÓN DE SU POTENCIAL TROMBOPROFILÁCTICO.

En el apartado anterior pudimos observar como los conjugados químicos entre la SA y el PA producían especies que podrían generar los complejos RBC-PA. Sin embargo, mostraban limitaciones determinantes para su desarrollo.

En el siguiente apartado y con el fin de eliminar las posibles interacciones multimoleculares de los conjugados químicos SA-PA, decidimos diseñar proteínas de fusión entre los núcleos de SA y PA. Como introdujimos anteriormente, las FP ofrecen la posibilidad de obtener una única proteína que incorpora los núcleos de interés de dos proteínas independientes y distintas entre sí. En el presente apartado estudiaremos el diseño y analizaremos el comportamiento de la proteína de fusión sugerida.

3.1 Un PA de diseño activable en el entorno protrombótico: UK-T.

En colaboración con el grupo del Dr. Muzykantov (Universidad de Pennsylvania) y con la intención de seleccionar el núcleo fibrinolítico (PA) de la proteína de fusión objeto de nuestro estudio, comparamos diferentes PA desarrollados por su laboratorio. La aproximación del grupo de la Universidad de Pennsylvania buscaba la generación de proteínas de fusión, que utilizaran como núcleo portador el fragmento variable (scFv) del anticuerpo monoclonal contra GPA de ratón (Ter119). De este modo establecemos dos aproximaciones diferentes: I) mRK, un PA de ratón híbrido entre TNK y Ret, que contiene modificaciones en el núcleo enzimático similares a la TNK (posee resistencia frente a PAI-1) y carece de los dominios F, EGF y K1 (al igual que Ret), y II) UK-T, un derivado de UK activable por trombina en lugar de por plasmina, que circulará en forma de zimógeno, activándose en el coágulo en formación. Los resultados del uso de estas proteínas demostraron una circulación estable durante el tiempo testado [79, 228]. Sin embargo, mientras que mRK pierde su capacidad fibrinolítica de forma paralela al tiempo de circulación en el animal (fig. 14R a), la incorporación del núcleo de UK-T demuestra una actividad superior que se mantiene constante durante el tiempo de circulación (fig. 14R b). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la droga más favorable para el diseño de la proteína de fusión con SA sea la UK-T.

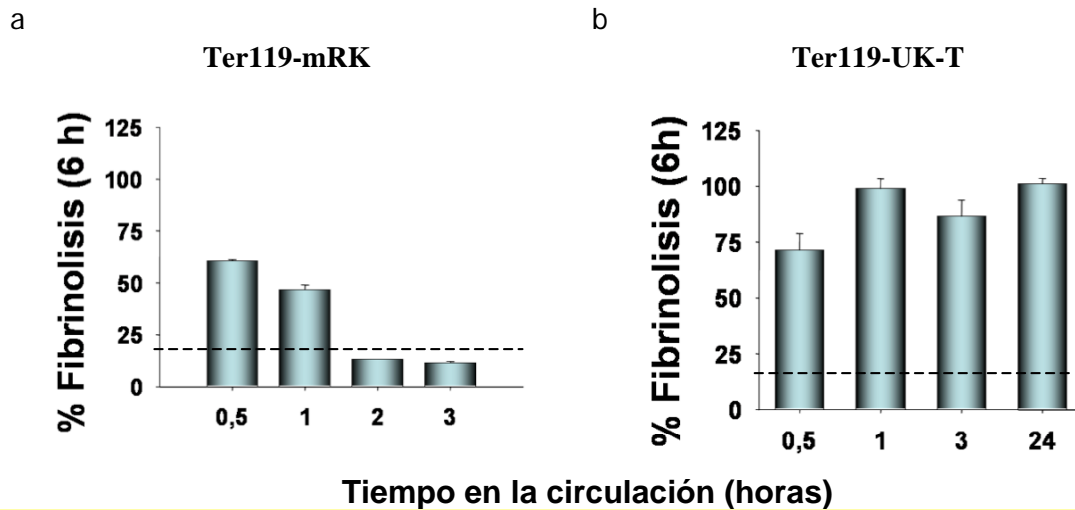


Figura 14R. Fibrinólisis *ex vivo* producida por las FP Ter119-PA. Los gráficos muestran la fibrinólisis espontánea (6 horas a 37 °C) producida por los coágulos formados a partir de sangre completa extraída, a los tiempos indicados (eje abscisas), de ratones previamente inyectados con 4 mg/kg de Ter 119-mRK (a) o Ter119-UK-T (b). La línea discontinua indica la fibrinólisis de un coágulo control formado con la sangre extraída de cada ratón previa a la administración de la droga. M ± SEM; n= 6 animales por grupo y 4 coágulos diferentes por tiempo.

3.2 Producción y purificación de la proteína de fusión SA-UK-T.

Para producir la FP necesitamos transfectar, de un modo estable, las células de insecto (S2) con un plásmido cuyo inserto contenga la información genética de los núcleos proteicos de las proteínas SA y UK-T en una misma proteína (fig. 3MM b). Dicho plásmido se incorporará al ADN de las células elegidas, produciendo y liberando al medio la proteína de fusión deseada tras la inducción de las células (fig. 3MM b). Como la SA-UK-T generada porta el núcleo de la SA, y ésta es una proteína tetrámerica, la SA-UK-T generada debería de tetramerizar. Para verificar dicha producción, analizamos el sobrenadante celular mediante western blot (fig. 15R). Así, observamos la aparición de la banda de 47 kDa correspondiente al hipotético monómero de SA-UK-T (13kDa del núcleo de SA y 34 kDa de la UK-T), tras someter a la muestra a condiciones desnaturizantes (fig. 12R, 95°C). Sin embargo, en condiciones pseudonativas observamos la banda de 190 kDa, correspondiente al tetrámero SA-UK-T (fig. 12R, R.T.).

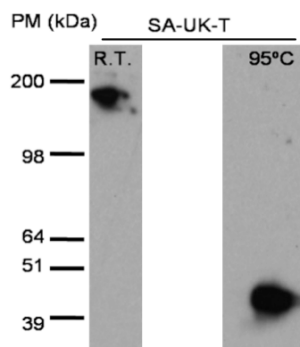


Figura 15R. Presencia de la SA-UK-T en el medio de las células S2 trasfectadas e inducidas. (a) Western blot representativo en condiciones pseudonaturales (R.T.) y desnaturalizantes (95°C), del sobrenadante celular revelado con Ac anti-UK.

Para la purificación de la proteína del medio celular utilizamos columnas de afinidad M2 (véase Materiales y Métodos apartado 7.2.2.4). El western blot del medio celular muestra a la SA-UK-T tras el revelado mediante un anticuerpo contra UK-T (fig. 16R a). La eficiencia de la columna para purificar la proteína se observa por la disminución de SA-UK-T en el líquido filtrado (fig. 16R a, DC) en contraposición a lo mostrado en el medio de partida (fig. 16R a, AC). La SA-UK-T, presente en un litro de medio celular es retenida tras su paso por la columna de afinidad y posteriormente eluida en fracciones de 1 ml de tampón glicina, según muestra el patrón de elución caracterizado mediante la presencia de proteína medida a 280 nm (fig. 16R b, fracciones 2-7). El western blot mostrado (fig. 13R b, figura superior), identifica a la SA-UK-T como la proteína recuperada tras la elución.

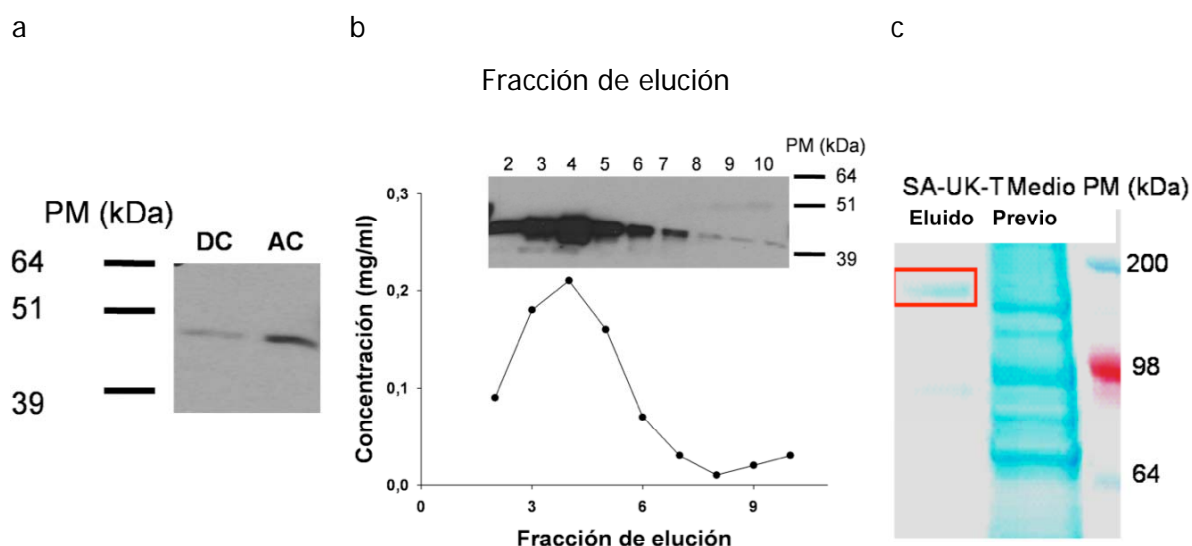


Figura 16R. Purificación de la SA-UK-T del medio celular mediante la columna de afinidad M2. (a) Western blot en condiciones desnaturalizantes, revelado con anti-UK, del medio celular antes de su paso por la columna de purificación (AC), y después de su paso por la misma (DC). (b) Caracterización de la presencia de proteína, mediante análisis espectrofotométrico a 280 nm, en las fracciones de eluido provenientes de la columna de purificación (panel superior) análisis mediante western blot de las fracciones de elución. (c) Tinción de Coomassie de un gel de SDS-PAGE al 7.5% en condiciones pseudonaturales, del medio celular previa purificación ("Previo") y tras su purificación en la columna M2 (Eluido).

Tras el análisis cuantitativo del eluido obtenemos un rendimiento final de 0,4 mg de SA-UK-T por litro de medio celular. Además, el análisis cromatográfico en gel (SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie) muestra claramente, en el medio sin purificar, una mezcla de distintas proteínas, con distintos PM (fig. 13R c, Previo). Por el contrario, el PM del eluido (fig. 13R c, Eluido) presenta una banda mayoritaria (~97%) de 190 kDa, que corresponde con el PM esperado para el tetrámero, y una banda minoritaria de 90 kDa, que podría corresponderse con el PM esperado para el dímero.

Llegados a este punto decidimos analizar la FP generada mediante espectrometría de masas. Esta técnica permite la separación de una muestra en sus componentes moleculares o atómicos debido a sus distintas masas. Por tanto, un análisis comparado de la proteína de fusión con la proteína original de SA nos podrá decir si existen similitudes en el comportamiento de ambas proteínas, como así debería suceder, al poseer la FP un núcleo de SA. No obstante, debido a las condiciones de procesamiento instrumental de la muestra en el espectrómetro de masas, tanto la FP como la SA pierden su estructura proteica cuaternaria en el transcurso de la medida, con lo que no podremos medir de forma estricta la conformación real final de la FP (si se genera tetramérica, trimérica, dimérica o monomérica) o la contribución de cada una de las estructuras poliméricas en la molécula final. De este modo, realizamos el análisis espectrométrico de la SA original. Así, esta última, muestra cuatro picos en su espectro que coinciden con las estructuras principales de monómero, dímero, trímero y tetrámero molecular en función de sus pesos moleculares (13, 26, 39 y 52 kDa). Por el contrario, la FP presenta 6 picos principales donde el primero 34 kDa, podría relacionarse con restos no fusionados de la UK-T y posteriormente cinco picos distribuidos a 47 y 49, 98, 146 194 kDa coincidentes con fracciones del monómero, dímero, trímero y tetrámero de la FP respectivamente (unidad SA-UK-T de $PM_{teórico}=47$ kDa, formado por el núcleo de SA=13 kDa y el núcleo de la UK-T=34 kDa).

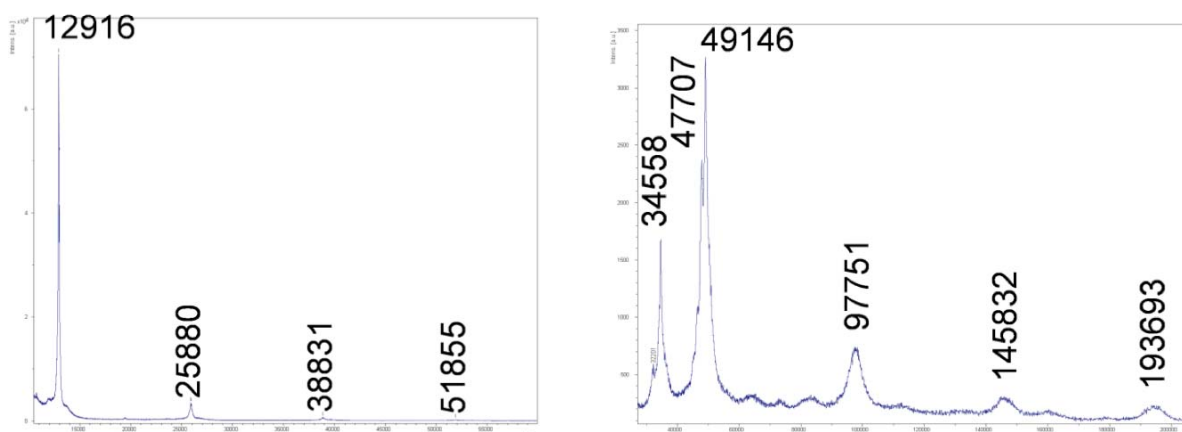


Figura 17R. Análisis espectrométrico de SA y SA-UK-T. Distribución de los picos de proteína analizados en una muestra de SA comercial (izquierda) y en una muestra de la SA-UK-T purificada del medio celular (derecha). En cada pico se muestra el PM correspondiente.

3.2.1 Caracterización bioquímica de los núcleos activos de la proteína de fusión.

Una vez identificada la producción de la proteína de interés y comprobadas las características básicas de PM y migración en gel de la proteína generada, pasamos a verificar el correcto funcionamiento de cada uno de los núcleos activos de la proteína resultante. Para ello, realizamos ensayos de unión a biotina, a través del núcleo de SA, y enzimáticos para la porción fibrinolítica de UK-T. Para estudiar la afinidad de SA-UK-T por la biotina realizamos ensayos de ELISA (fig. 18R a) y radioensayos de unión (fig. 18R b) sobre pocillos recubiertos con BSAb, observando que existe una unión específica y ascendente para la SA-UK-T en paralelo a la concentración de FP utilizada.

En experimentos paralelos al ELISA, comprobamos la actividad enzimática del núcleo fibrinolítico midiendo la actividad de la Pln. De este modo, aquellos pocillos donde la SA-UK-T ha quedado retenida y ha sido preactivada, producen un incremento de color asociado a la actividad amidolítica de la FP al convertir el Plg en Pln, color que no se aprecia en aquellos pocillos con la FP no preactivada, ni en aquellos pocillos incubados con una FP (390-UK-T) que carece del núcleo de SA y, por tanto, no reconoce la biotina (fig. 18R c).

Una vez comprobada la actividad amidolítica de la FP es importante testar si ésta degrada la Fn de los coágulos. Por lo tanto, en un primer experimento, añadimos el medio de las células inducidas (preactivado o no con trombina) durante la formación de ^{125}I -PFC, obteniendo una lisis total de los coágulos en ambas condiciones. No obstante, en el grupo

de preactivación del medio con trombina, la lisis completa de los coágulos se obtiene en un tiempo significativamente menor (fig. 18R d). Lo siguiente es comprobar la actividad de la FP y así tras su purificación verificamos si se mantiene el efecto fibrinolítico, para ello utilizamos proteína preactivada o no con trombina sobre ^{125}I -PFC. Este experimento demuestra la disolución de los coágulos incubados con la FP preactivada (fig. 18R e, barra roja), aunque también certifica una cierta capacidad fibrinolítica de la FP basal (fig. 18R e, barra gris), la cual podría provenir de la preactivación de la droga mediante el efecto residual de la trombina añadida al coágulo durante su formación y que no puede ser excluida del ensayo.

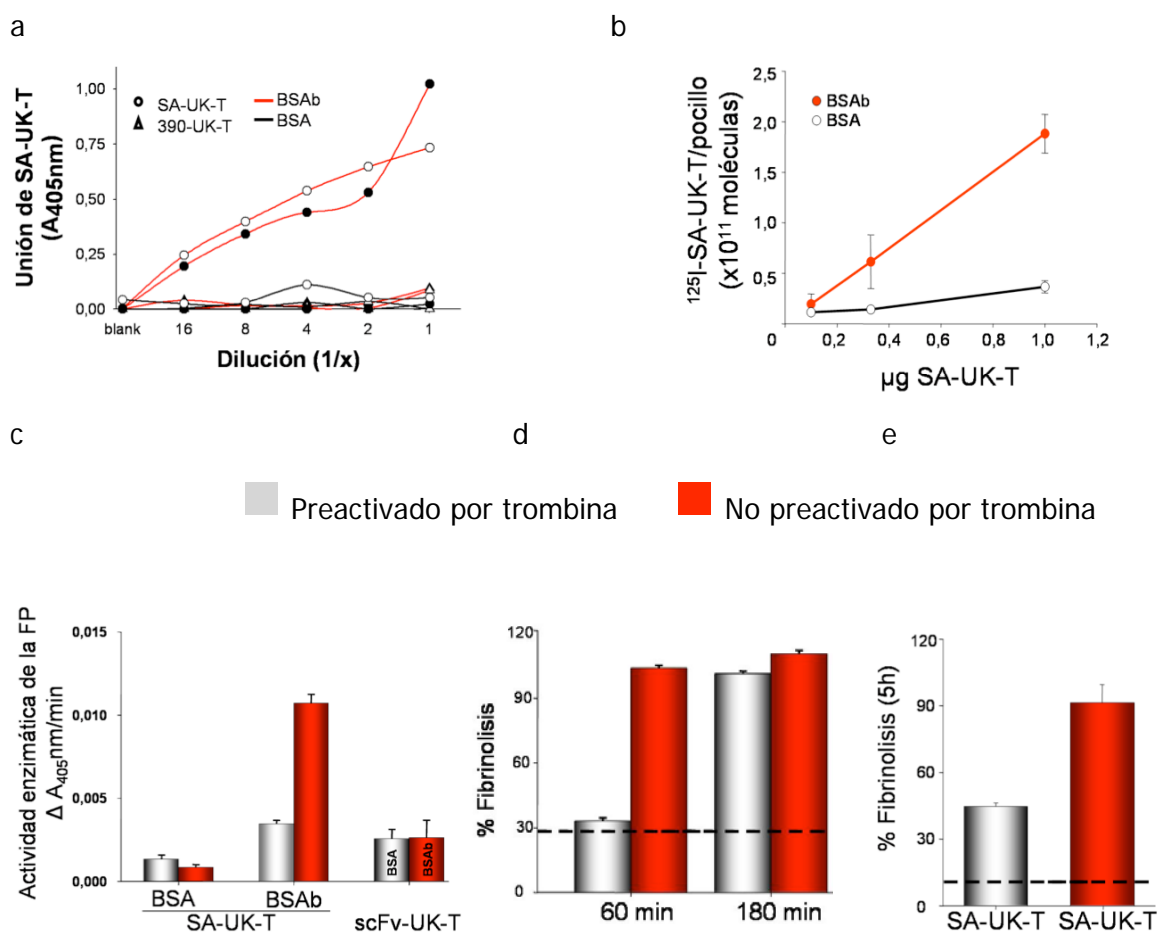


Figura 18R. Caracterización in vitro de los núcleos activos de SA-UK-T. (a) ELISA realizado mediante incubación, del sobrenadante de las células, transfectadas e inducidas, sobre pocillos recubiertos con BSA o BSAb y revelados con Ac anti-UK o anti-flag. (b) Radioensayo de unión de moléculas de ^{125}I -SA-UK-T purificada sobre pocillos recubiertos con BSA o BSAb. (c) Ensayo de actividad cromogénica del núcleo fibrinolítico con spectrozyme®, tras incubar el sobrenadante de células transfectadas e inducidas sobre pocillos recubiertos con BSA o BSAb. (d) Ensayo fibrinolítico en coágulo nascente, en el que se incorpora SA-UK-T (preactivada –rojo- o no –gris- por trombina) durante la formación del ^{125}I -PFC. (e) Ensayo fibrinolítico en coágulo maduro o hemostático, en el que se añade 2 nM de SA-UK-T (preactivada –rojo- o no –gris- por trombina) sobre ^{125}I -PFC ya formados. $M \pm \text{SEM}$, $n=3$.

3.2.2 Caracterización de los complejos RBCb/SA-UK-T.

Una vez comprobada la actividad de los núcleos proteicos y dado que esta FP fue diseñada con la intención de unirse a RBCb, el siguiente grupo de experimentos se planean para constatar su capacidad de formar complejos con estas células. Para determinar la unión, incubamos ^{125}I -SA-UK-T con RBC modificados con dosis crecientes de reactivo de biotina obteniendo la unión de 2.736 ± 61 moléculas por RBC biotinilado con una solución de $100 \mu\text{M}$ de NHS-LC-biotina, es decir, RBCb_{100} (fig. 19R a). Esta unión es muy inferior a la obtenida para la SA nativa (412.524 ± 30.567 moléculas/ RBCb_{100}) lo cual sugiere la existencia de algún tipo de impedimento para la unión de la ^{125}I -SA-UK-T a dicho eritrocito biotinilado. Dado que la FP obtenida tiene un PM muy superior a la SA nativa, y que el núcleo de la UK-T podría estar interfiriendo estéricamente con su acercamiento a la superficie eritrocitaria, decidimos utilizar un brazo espaciador más largo, lo que permite distanciar el residuo de biotina de la superficie eritrocitaria, utilizando en la biotinilación el NHS-LC-LC-biotina (véase Materiales y Métodos apartado 6). El resultado con este nuevo reactivo de biotina aumenta, la unión de la ^{125}I -SA-UK-T a los RBCb, hasta 4 veces más (11.260 ± 1.559 moléculas/ RBCb_{100} , fig. 19R a,). Dado que la SA-UK-T es fundamentalmente un tetrámero (figs. 15R y 16R a y b), esta unión implicaría aproximadamente 45.000 moléculas de fibrinolítico por RBCb_{100} y 8.979 ± 1.188 para los RBCb_{30} lo que permitiría alcanzar fácilmente una dosis del profármaco en el rango terapéutico convencional para los fibrinolíticos actuales (equiparable a 0,3-0,2 mg/kg de tPA). Esta unión de la FP sobre los RBCb_x se mantiene estable durante las primeras 24 horas (96%) y decae aproximadamente en un 30% en las siguientes 24 horas (68% remanente a las 48 h; fig. 19R b).

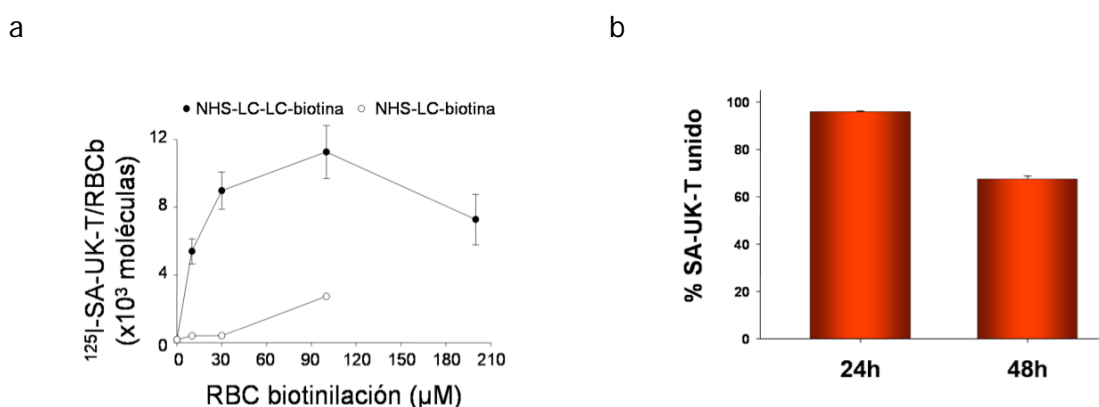


Figura 19R. Unión de SA-UK-T a los RBCb_x y estabilidad de su unión in vitro. (a) Unión de la ^{125}I -FP sobre los RBC con distinto grado de biotinilación y con los distintos agentes biotinilantes testados (NHS-LC-biotina o NHS-LC-LC-biotina). (b) Estabilidad de la unión de ^{125}I -FP sobre los RBCb tras 24 y 48 horas a 4 °C. M \pm SEM, n= 9-12 determinaciones a partir de 3 experimentos.

Pese a que la unión de la FP es estable en el tiempo, lo primero que hay que comprobar es que la viabilidad del eritrocito no se altera. Por tanto, formamos complejos $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$ ($x=10-100$) y verificamos su estabilidad, tanto frente a la hemólisis mediada por complemento como por ensayos de agregación, los cuales en caso de aparecer comprometerían su circulación. La hemólisis de RBCb_x/SA , en presencia de suero (como donador de proteínas del complemento), ocurre de forma activa a partir de una modificación superficial con reactivo biotinilante de $200 \mu\text{M}$ [258]. Como control positivo de nuestro experimento utilizamos $\text{RBCb}_{400}/\text{SA}$, los cuales se lisan de forma efectiva en presencia del suero (fig. 20R a, barra gris). En contraposición a estos resultados, los complejos $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$ obtenidos con un grado de biotinilación eritrocitaria inferior o igual a $100 \mu\text{M}$ no presentan hemólisis (fig. 20R. a, barras rojas). Además, cualquiera de los $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$ analizados en este rango de biotinilación tampoco muestran agregación (fig. 20R b), a diferencia de lo que ocurría con los complejos formados mediante la conjugación química (véanse figs. 10R b, 11R b y 13R b).

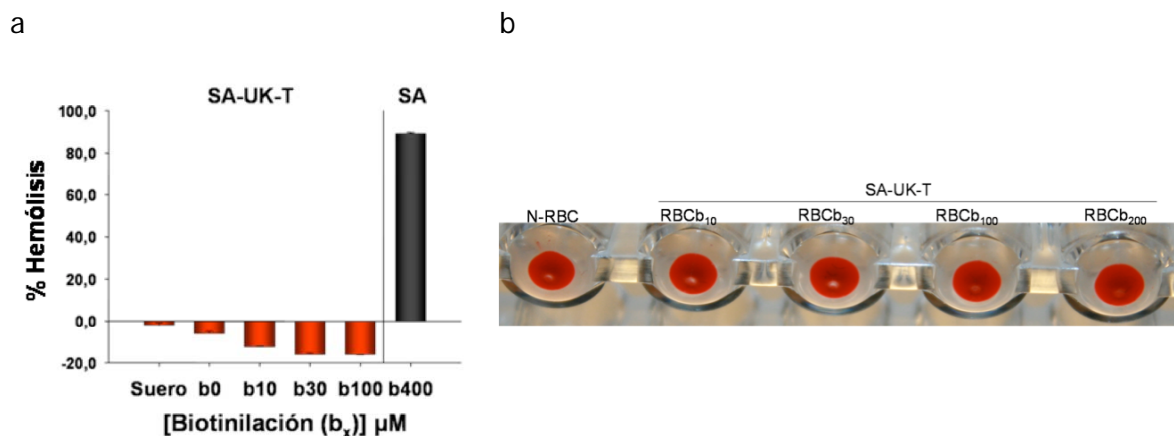


Figura 20R. Estudio in vitro de la de la viabilidad de los $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$. (a) Estudio de la hemólisis reactiva, inducida por acción del complemento, en la suspensión de $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$ (barras rojas) o $\text{RBCb}_{400}/\text{SA}$ (barra gris), usado como control positivo, mediante su incubación en presencia de suero sanguíneo; $M \pm \text{SEM}$, $n=3$. (b) Ensayo de precipitación eritrocitaria de los $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$

Como hemos visto que el rango de biotinilaciones (10-100) de los eritrocitos es capaz de generar complejos específicos, estables en su unión y también en su viabilidad, el siguiente paso se centra en comprobar la capacidad fibrinolítica de los complejos $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$ obtenidos. Hemos visto que la UK-T está diseñada para activarse específicamente en el entorno protrombótico y, por tanto, deberá alcanzar su mayor capacidad fibrinolítica en el coágulo naciente. Así, la incorporación de los complejos durante la formación del PFC (previa adición de CaCl_2 y trombina) produjo la lisis completa de los mismos en un tiempo inferior a las 3 horas para todos los complejos

analizados, siendo menor el tiempo cuanto mayor es la modificación del eritrocito (fig. 21R a) y, por consiguiente mayor el número de moléculas de FP unidas. Es importante destacar que la trombina empleada para iniciar la coagulación (fig. 21R a), y cuya concentración está en el rango de la fisiológica, es suficiente para activar a su vez a la UK-T en la superficie eritrocitaria. Por el contrario, la adición de los complejos sobre los PFC formados (coágulos maduros o hemostáticos) no encuentran la suficiente trombina para activar su núcleo fibrinolítico y así la lisis de los coágulos solo comienza a hacerse patente a tiempos muy superiores (fig. 21R b, barras negras) a los vistos en la figura anterior (fig. 21R a). Tan solo si los complejos RBCb_x/FP son preactivados mediante la adición de trombina, antes de su incorporación al ensayo fibrinolítico, observamos un claro efecto fibrinolítico para todas las especies testadas y dependiente del grado de modificación eritrocitaria (fig. 21R b, barras verdes). Sin embargo, estos complejos muestran una actividad sensiblemente inferior al ensayo en coágulo naciente.

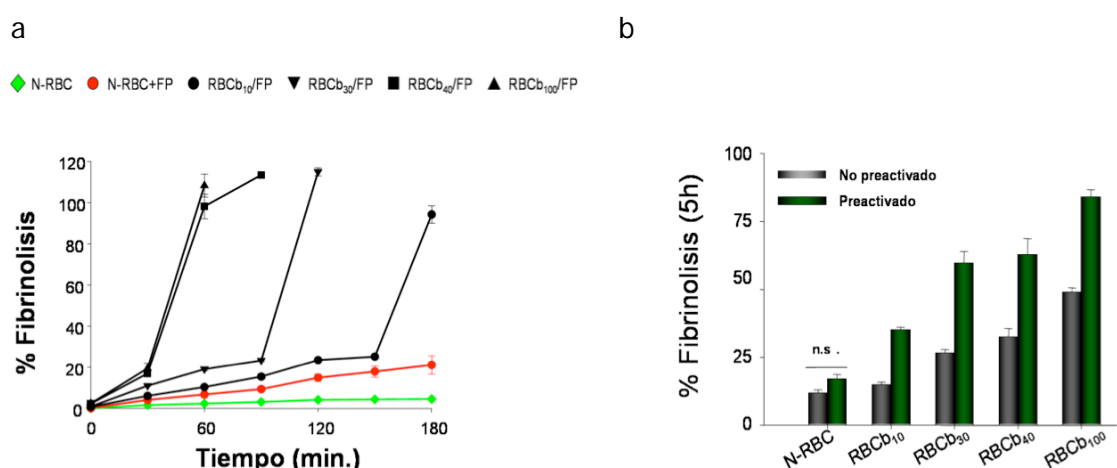


Figura 21R. Fibrinolisis de coágulos nacientes y coágulos maduros. (a) Fibrinolisis de coágulos de ¹²⁵I-PFC que incorporan en su interior eritrocitos control (N-RBC) o complejos formados con eritrocitos biotinilados a distintas concentraciones (RBCb_x/FP). (b) Fibrinolisis de coágulos de ¹²⁵I-PFC sobre los que se añade la misma dosis de complejos RBCb_x/FP, previamente activados por trombina (barras verdes) o no preactivados (barras negras). Todos los datos muestran significancia estadística excepto los N-RBC (n.s.). M±SEM, n= 6 para cada condición..

En consonancia con estos resultados, si se comparan los efectos fibrinolíticos de complejos formados con un grado de modificación eritrocitaria, que proporcione complejos estables en circulación (por ejemplo RBCb₃₀ según se observa en la fig. 6R a), la potencia fibrinolítica es diferente según se incorpore el RBCb_x/SA-UK-T dentro o fuera del coágulo. Así, cuando el RBCb_x/SA-UK-T queda incorporado en el coágulo en formación su actividad es significativamente superior, siendo prácticamente testimonial si el

complejo se añade una vez generado el coágulo, lo cual magnifica el efecto tromboprolifáctico protector de estos complejos (fig. 22R).

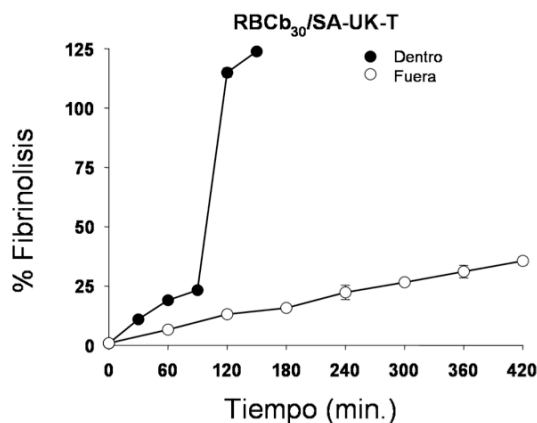


Figura 22R. Cinética de degradación de coágulos con los RBCb₃₀/SA-UK-T. Estudio fibrinolítico en ¹²⁵I-PFC producido por 5 l de complejo portando (0,04 nM) de FP en el interior de los coágulos (●), o en su exterior (○).

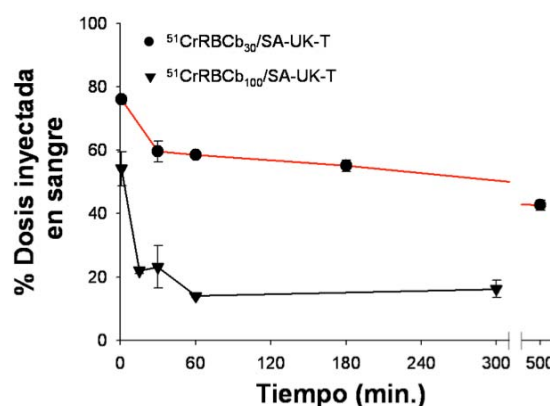
3.2.3 Circulación y actividad de los complejos RBCb/SA-UK-T.

El siguiente paso es la comprobación de que el complejo RBCb_x/SA-UK-T es estable *in vivo* y demuestra actividad fibrinolítica tras su circulación. Para conocer su perfil farmacocinético, marcamos radiactivamente al agente portador ⁵¹CrRBCb y caracterizamos el mejor grado de modificación eritrocitaria para albergar a la FP. Así, conjugamos la SA nativa a los ⁵¹CrRBCb_x modificados dentro de los rangos estables en los ensayos *in vitro* del apartado anterior (x= 10-100, fig. 20R). No obstante, el grado de modificación de los eritrocitos genera complejos con una presencia en sangre desigual (fig. 23R). Así, la circulación de los RBCb₁₀₀/SA-UK-T está más comprometida que para aquellas modificaciones moderadas (RBCb₃₀/SA-UK-T), similar a lo que ocurría con los complejos de RBCb₃₀/SA que demostraron ser estables *in vivo* (fig. 6R a). No está de más recordar, que este grado de modificación eritrocitaria (RBCb₃₀) genera complejos con una carga de moléculas de FP alrededor de 9.000 moléculas por eritrocito (fig. 19R) que está muy próxima a la máxima unión obtenida (11.260±1.559) y, que teniendo en cuenta el carácter tetramérico de las moléculas, aportarían 4 veces más residuos de agente fibrinolítico, lo cual representa niveles terapéuticos similares al tratamiento convencional (equiparable a 0,2 mg/kg de tPA).

Figura 23R.

Farmacocinética

comparativa de los RBCb₃₀-₁₀₀/SA-UK-T. Farmacocinética comparativa de complejos inyectados iv. en el ratón, realizados con ⁵¹CrRBCb_x/SA-UK-T, donde x= 30 ó 100 μM de NHS-LC-LC-biotina; M±SEM, n= 5-6 animales.



Vistos estos resultados, generamos complejos RBCb₃₀/SA-UK-T y pasamos a estudiar su farmacocinética. Para poder seguir en todo momento ambas especies del complejo en circulación y su biodistribución en órganos, utilizamos el doble marcaje ⁵¹CrRBCb₃₀/¹²⁵I-SA-UK-T y comparamos los resultados con la FP libre (¹²⁵I-SA-UK-T), no conjugada a eritrocitos. De este modo, al inyectar iv. ¹²⁵I-SA-UK-T libre, observamos como esta se elimina rápidamente de la circulación tras su inyección (fig. 24R a, ▼). Tan solo permanece un 4,3 % de la ¹²⁵I-SA-UK-T inyectada en sangre a los 15 minutos y su distribución sanguínea se produce principalmente en la fracción plasmática (fig. 24R b), mostrando un porcentaje superior al 90 % en dicha fracción. Mientras, su eliminación se produce, principalmente, a través del hígado (fig. 24R c). Por el contrario, al analizar los complejos ⁵¹CrRBCb₃₀/¹²⁵I-SA-UK-T en circulación, comprobamos como éstos circulan de un modo estable manteniéndose la marca del portador ⁵¹Cr en el torrente sanguíneo (60% a 1h, 55% a 3h y un 42% a las 8 horas). De hecho, estos porcentajes son muy similares a los observados para el caso de los RBCb₃₀/SA (67,2 ± 5,2% a los 60 min. y 55,3 ± 2,18 % a las 3 horas, fig. 6R). En el caso de la distribución sanguínea de la marca de la FP observamos como en los primeros minutos existe una caída algo más sustancial que la observada para el portador, sin embargo tras los primeros 30 minutos, la relación de ambos isótopos (⁵¹Cr:¹²⁵I) se estabiliza en sangre y se mantiene de forma constante a lo largo del tiempo (1,7 a los 60 minutos, 2 a los 180 minutos y 2 a las 8 horas). Además, la biodistribución de la marca radiactiva entre las fracciones plasmática y celular arrojó un porcentaje superior al 80% de la marca de FP conjugada en la fracción celular frente a un porcentaje superior al 95% para la marca del portador eritrocitario (fig. 24R b), apoyando la idea de la circulación conjunta. Por otro lado, la biodistribución de las especies en los principales órganos muestra a la sangre como el órgano donde se sitúa la mayoría de la

marca, mientras que la contribución del hígado y el bazo se relaciona con la eliminación de aquellos eritrocitos portadores, junto con su carga, que no han resistido convenientemente el proceso de modificación, dando lugar a células fácilmente reconocibles por el sistema fagocítico del RES (fig. 24R d). Estas, sin embargo, representan un porcentaje muy bajo y sugieren la circulación estable de los complejos formados.

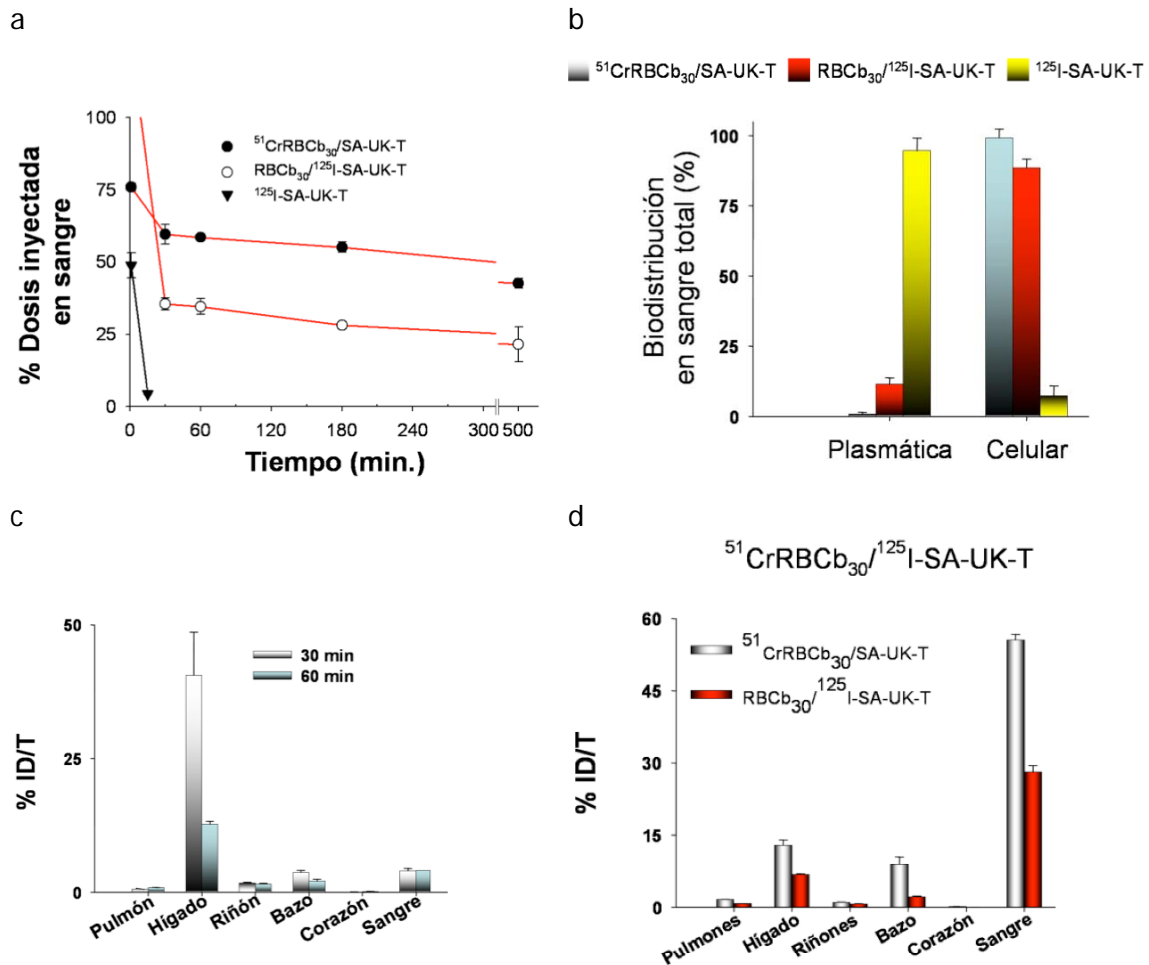


Figura 24 R. Estudio farmacocinético de la droga libre comparada con los complejos RBCb₃₀/SA-UK-T. (a) Farmacocinética comparativa de los complejos $^{51}\text{CrRBCb}_{30}/^{125}\text{I-S-A-UK-T}$ o $^{125}\text{I-S-A-UK-T}$ no asociada a RBC, tras su inyección intravenosa en el ratón. (b) Distribución de los compuestos marcados en la fracción celular o plasmática de la sangre a los 15 minutos ($^{125}\text{I-S-A-UK-T}$ libre, amarillo) ó 60 minutos ($^{51}\text{CrRBCb}_{30}/^{125}\text{I-S-A-UK-T}$) donde se observa el marcaje correspondiente al portador (gris) o la FP unida (rojo). (c) Biodistribución tisular de $^{125}\text{I-S-A-UK-T}$ libre tras 30 y 60 minutos de su inyección. (d) Biodistribución de $^{51}\text{CrRBCb}_{30}/^{125}\text{I-S-A-UK-T}$ tras 60 minutos de su inyección. M±SEM; n=4 animales por grupo.

Con la intención de conocer si estos complejos mantenían su actividad fibrinolítica tras su paso por la circulación extrajimos sangre de los animales inyectados con los RBCb₃₀/SA-UK-T a los tiempos indicados en la gráfica (fig. 25R) y realizamos ensayos de fibrinólisis *ex vivo* (véase Materiales y Métodos apartado 8.4.2). En ellos pudimos observar, como a pesar de la escasa cantidad de droga presente en el ensayo farmacocinético a las 8,5 horas (aproximadamente un 20% de la dosis inyectada), existía una lisis efectiva de los coágulos tras 20 horas de incubación (fig. 25R, barras oscuras). Dicho efecto fibrinolítico no se producía en los coágulos formados con la sangre extraída de los mismos animales previa inyección de los complejos (fig. 25R, barras claras). Este resultado indica la presencia de droga fibrinolítica circulante y asociada a los eritrocitos, la cual es capaz de ser activada en el entorno protrombótico.

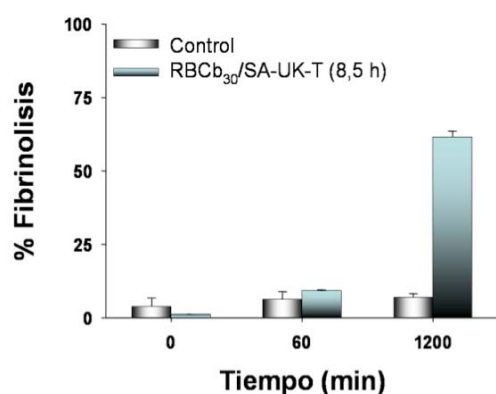


Figura 25R. Estudio fibrinolítico *ex vivo* de la sangre de animales inyectados con RBCb₃₀/SA-UK-T. Fibrinólisis espontánea *ex vivo* de la sangre extraída, sin anticoagulante, de los ratones inyectados con 0,6 nmol/kg del complejo y sacrificados a las 8.5 horas de la inyección. Como control incluimos la sangre de los mismos animales antes de la administración del complejo. M±SEM, n= 4 animales por grupo y 2 coágulos por condición, en total 8 coágulos por determinación.

3.3 Generación de quimeras SA:SA-UK-T y detección en el medio celular.

Con el fin de generar FP que a) disminuyan los posibles impedimentos de tipo estérico, b) aumenten la unión de moléculas a los RBCb y c) mejoren, si es posible, su capacidad circulatoria, decidimos disminuir el número de residuos voluminosos (UK-T) en el núcleo tetramérico de la FP. Generamos tetrámeros mixtos SA:SA-UK-T, de tal modo que 1, 2 ó 3 subunidades pertenezcan a la SA-UK-T y las subunidades restantes pertenezcan a la SA. De este modo, tratamos de aumentar la contribución de restos del núcleo original de la SA dentro del tetrámero. Si bien esto produciría un descenso en la carga fibrinolítica unida por molécula, esperamos obtener una carga neta unida superior, puesto que la FP resultante podría unirse de un modo más efectivo. Para la generación de las proteínas quiméricas transfectamos de un modo estable (Materiales y Métodos apartado 7.2.2.3) las células S2 con los plásmidos pMT/BiP conteniendo las secuencias de SA y SA-UK-T respectivamente, en función de distintas relaciones molares SA:SA-UK-T (3:1, 1:1 y 1:3). Tras la inducción de las células transfectadas, comprobamos la generación de estas proteínas quiméricas mediante western blot revelado con un Ac anti-UK (fig. 26R a), donde se observan distintas bandas que se corresponderían con el PM esperado para las distintas relaciones de SA:SA-UK-T en la proteína resultante (83 kDa para la 3:1; 118 kDa para la 1:1 y 153 kDa para la 1:3). No obstante, la especie mayoritaria obtenida tras su migración electroforética tenía un PM de aproximadamente 120 kDa, que se correspondería con un tetrámero mixto de 2 subunidades de SA y otras 2 subunidades de SA-UK-T. También podíamos identificar la variante tetramérica (~190 kDa) y la monomérica (~90 kDa) de SA-UK-T en el tetrámero final, según la relación molar de plásmidos trasfectados de partida (fig. 26R a). Tras observar la presencia de dichas especies en el western, comprobamos la existencia de capacidad fibrinolítica del sobrenadante en un ensayo zimográfico, antes de proceder a la purificación de la FP más favorable. La fig. 26R b, muestra como aparecen halos de actividad únicamente en aquellos geles donde ha existido una preactivación de las muestras con trombina (fig. 26R b, derecha – activada por trombina- e izquierda -no preactivada por trombina-). Dicha actividad produce distintas bandas electroforéticas que se corresponderían con distintos PM provenientes de una mezcla no pura de las proteínas quiméricas en el sobrenadante celular. Esta alta multiplicidad de bandas obtenidas en la zimografía frente al western blot se relacionaría con la alta sensibilidad que el ensayo primero mantiene sobre el segundo (pg frente a ng). No obstante, el ensayo parece mostrar la presencia de un producto de

mayor actividad (flecha), que de acuerdo con lo observado en el western blot probablemente se trate de la especie 2:2.

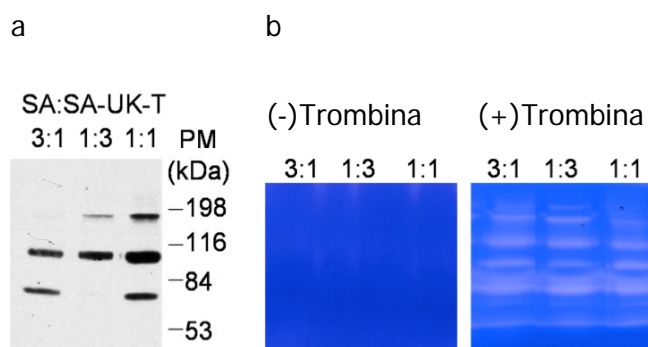


Figura 26R. Determinación y caracterización de las FP quiméricas SA:SA-UK-T. (a) Análisis representativo por western blot del sobrenadante de las células S2 transfectadas e inducidas con distintas relaciones de los plásmidos de la SA:SA-UK-T. (b) Zimografía representativa del sobrenadante celular proveniente de las células S2 trasfectadas e inducidas a las relaciones de plásmidos transfectados. Geles en ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de trombina.

3.3.1 Purificación y unión de la de la FP quimérica.

Comprobada la presencia de proteína activa en el medio pasamos a purificarla mediante el uso de la columna de afinidad M2, seguida de una elución de la mezcla mediante gradiente de pH (entre 2 y 4,5). De esta manera, nos proponemos separar la muestra en función del número de residuos de UK-T presentes en la mezcla de tetrámeros de FP resultantes, y donde la separación se producirá de forma paralela al número de puntos de al Ac anti-flag de la columna por cada tetrámero fijado (fig. 27R a). Al realizar dicho gradiente, observamos como las fracciones con un pH mayor mostraron un enriquecimiento de los productos de mayor PM y a medida que disminuía el pH obteníamos el producto mayoritario de 120 kDa (2 SA: 2 SA-UK-T) observado en los análisis del sobrenadante celular (fig. 26R a y b). No obstante, no eramos capaces de aislar muestras completamente puras mediante este sistema de elución. Pese a ello, nos propusimos estudiar la capacidad de las FP parcialmente purificadas sobre proteínas biotiniladas (fig. 27R b) e incubamos la ^{125}I -quimera, o la ^{125}I -SA comercial como control, sobre pocillos pretratados con BSAb. La quimera revela una mayor retención sobre los pocillos de forma paralela al aumento de su concentración añadida. Dicho aumento de unión es también paralelo a la mostrada por cantidades proporcionales de SA (fig. 27R b). Seguidamente, probamos su unión sobre los eritrocitos biotinilados, ya que éste es el soporte adecuado para la utilización perseguida de la FP. Sin embargo, la unión sobre eritrocitos biotinilados, en el rango adecuado para su buena circulación sanguínea, era

muy limitada y apenas mostraba una unión significativa por encima de las 1.500 moléculas de FP quimérica en los RBCb₀₋₄₀ analizadas (fig 27R c).

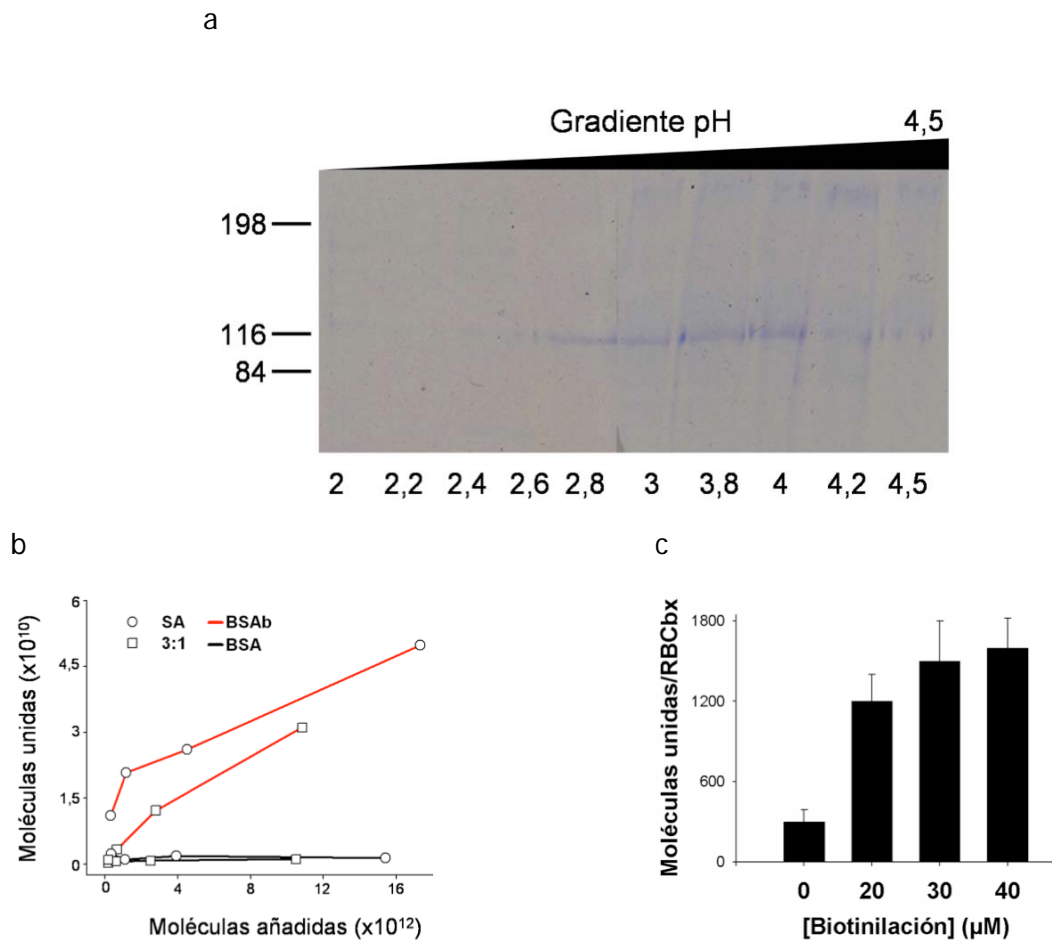


Figura 27R. Purificación y unión de las FP quiméricas SA:SA-UK-T. (a) SDS-PAGE representativo al 7.5% en condiciones pseudonativas, de las distintas fracciones de elución de la proteína retenida en la columna de purificación, tras el paso del medio de células transfectadas con 3:1 de SA:SA-UK-T. Las fracciones fueron eluidas bajo gradiente de pH (eje de abscisas). (b) Radioensayo de unión de las ¹²⁵I-FP (obtenidas de las células transfectadas 3:1 y purificadas) o ¹²⁵I-SA incubadas sobre pocillos recubiertos con BSA o BSA-b, $M \pm \text{SEM}$, $n = 3-4$ determinaciones por punto (c) Ensayo de unión de las ¹²⁵I-FP purificadas de las células 3:1 sobre RBCb_x, x indica el grado de biotinylación del eritrocito (eje de abscisas); $M \pm \text{SEM}$, $n = 3-4$ determinaciones por preparación celular.

3.4 Generación de la SA-UK-T monomérica.

Hasta ahora las FP diseñadas (FP tetraméricas originales y sus derivados quiméricos) han mostrado una unión y estabilidad limitada sobre los eritrocitos. Efectos que no han mejorado, ni siquiera con la generación de proteínas quiméricas que controlasen los posibles impedimentos estéricos del tetrámero de fusión original. Por tanto, buscaremos un diseño donde no tengamos una estructura compleja y desarrollaremos una FP en forma monomérica (mFP) mediante la mutación selectiva del núcleo de SA, la D117A SA [219] (véase Materiales y Metodos 7.2.2.2). Dicha mFP reduciría potencialmente los supuestos impedimentos estéricos, conservando una SA mutada con una suficiente avidéz por la biotina ($K_d = 8,9 \times 10^{-9}$ M). Una propiedad asociada en este diseño radica en la capacidad de desplazar la unión de esta mFP por la SA original [220]. Esto es debido a que la disminución de afinidad del mutante monomérico por la biotina, permitiría su desplazamiento por la SA tetramérica, de mayor capacidad de unión por la biotina ($K_d=10^{-14}$ M) [218]. Esta característica es crucial en el hecho de generar una FP de duración controlable, ya que cuando no fuese necesario el efecto tromboprolifáctico en el paciente, la proteína podría ser desplazada del eritrocito portador.

3.4.1 Producción y purificación de mFP.

Las células transfectadas de un modo estable (véase Materiales y Métodos apartado 7.2.2.3) con el vector pMT/BiP conteniendo la secuencia D117A SA-UK-T, fueron inducidas para la producción y liberación de la proteína, y su presencia en el medio celular fue confirmada mediante western blot (fig 28R a), donde observamos la aparición de dos bandas (190 y 47 kDa) en condiciones pseudonativas que se corresponden con el homotetrámero y el monómero de D117A SA-UK-T (fig. 28R a, RT), de acuerdo con el comportamiento descrito en la literatura [219]. Como es preceptivo, en condiciones desnaturizantes (fig. 28R a, Q), la forma tetramérica desaparece y solo observamos la señal monomérica (47 kDa). Tras la purificación de la mFP a través de la columna de afinidad M2, la electroforesis en condiciones pseudonativas muestra una banda prevalente a 47KDa (fig. 28R. b), donde realizando un análisis densitométrico, la contribución de la forma monomérica representa un 97% (fig. 28R c).

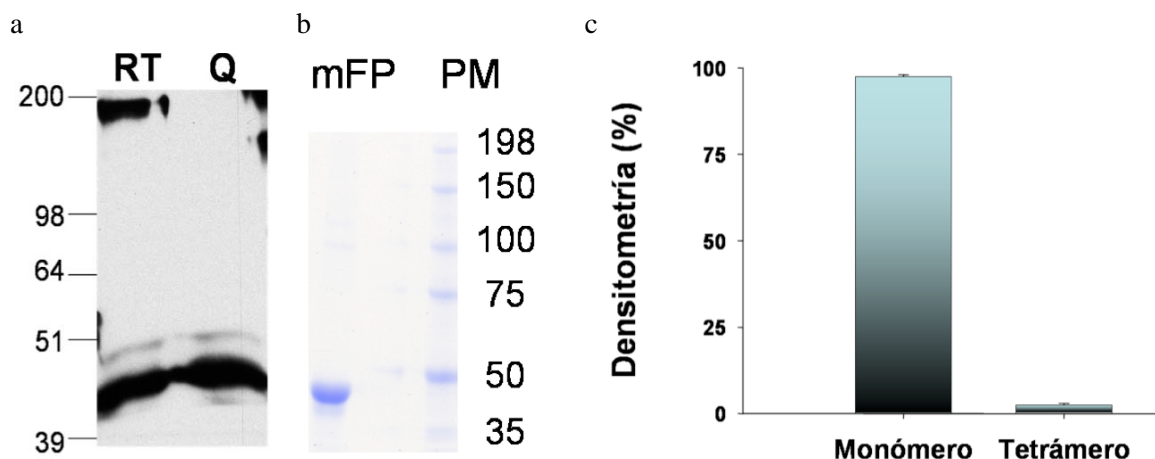


Figura 28R. Análisis del tamaño de la D117A SA-UK-T (mFP) generada en las células S2. (a) Análisis representativo por western blot del medio de las células, transfectadas e inducidas, en condiciones pseudonativas (RT) o desnaturalizantes (Q). (b) SDS-PAGE representativo al 7.5 % y condiciones pseudonativas, de la proteína mFP tras su purificación (c) Análisis densitométrico de la mFP proveniente del gel electroforético mostrado en "b".

3.4.2 Unión al portador de mFP.

Para estudiar la capacidad de unión de la mFP, la purificamos y marcamos radiactivamente. La ^{125}I -mFP incubada con los RBCb, muestra una unión específica y creciente, dependiente del grado de biotilación del RBC (fig. 29R a), alcanzando la saturación con un máximo de 137.017 ± 12.595 moléculas de mFP/RBCb₄₀, y 357 ± 63 sobre los N-RBC. Al igual que ocurría con la FP tetrámerica (SA-UK-T) la unión se encuentra favorecida al biotinilar los RBC con la NHS-LC-LC-biotina, con el brazo espaciador más largo, logrando una unión hasta 5,6 veces superior a la obtenida con la NHS-LC-biotina para el mismo grado de modificación 23.277 ± 744 (fig 29R a). Al estudiar la estabilidad de la unión durante 72 horas observamos una permanencia de la mFP, unida al RBCb₁₀₋₄₀, superior al 85% durante los 3 días de duración del ensayo (fig. 24R b). Dado que la D117A SA posee una menor afinidad por la biotina que la SA original [219], realizamos estudios de disociación de la mFP sobre los complejos mediante la acción competitiva de la SA. De esta forma, al incubar los complejos RBCb_x/mFP con un exceso de SA, se produce un desplazamiento de aproximadamente el 50% de las moléculas de ^{125}I -mFP unidas (fig. 29R c).

Los estudios de agregación realizados con RBCb₁₀₋₂₀₀/mFP mostraron una sedimentación equivalente a la de los eritrocitos no modificados, para cada uno de los grados de biotilación alcanzados (fig. 29R d). Dichos resultados sugieren la generación de complejos estables RBCb/mFP, capaces de incorporar en la superficie eritrocitaria dosis terapéuticas del agente fibrinolítico (8,1 nmol/kg).

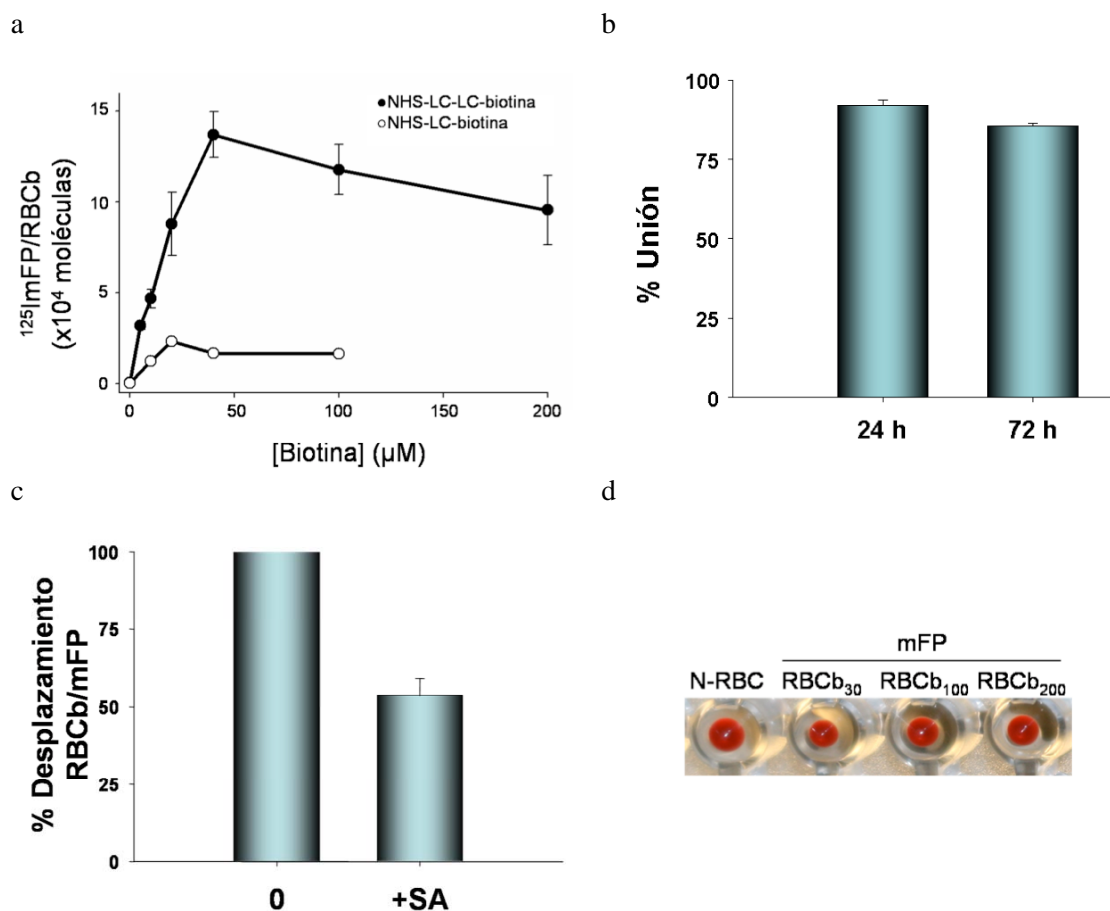


Figura 29R. Unión de la mFP a los RBC portadores. (a) Estudio de la unión de ^{125}I -mFP a los RBC $_x$ modificados con distintos reactivos de biotina; $M \pm \text{SEM}$, $n=6-18$. (b) Estabilidad de la unión de la ^{125}I -mFP sobre los RBC $_{30}$ durante 72 horas; $M \pm \text{SEM}$, $n=6$. (c) Desplazamiento de la unión de la ^{125}I -mFP sobre los RBC $_{10-30}$ mediante la incubación con un exceso de moléculas de SA comercial; $M \pm \text{SEM}$, $n=8$. (d) Ensayo representativo de precipitación eritrocitaria de los complejos RBC $_{30-200}$ /mFP.

3.4.3 Actividad fibrinolítica de mFP y de los complejos RBCb/mFP in vitro.

Para estudiar la actividad enzimática de la mFP realizamos primeramente una zimografía en gel (véase Materiales y Métodos apartado 7.3.3.2), comprobando que en presencia de trombina, la actividad zimogénica es muy superior a la observada en su ausencia (fig 30R a). Es interesante resaltar que la actividad plasminogenolítica revelada en la zimografía (halos blanquecinos) aparece fundamentalmente en la zona coincidente con la de distribución del monómero en la cromatografía (fig. 28R b). No obstante, en este tipo de ensayo existe un bandedo múltiple, el cual podría responder a una cierta inespecificidad zimogénica, apoyada por la extremada sensibilidad de la técnica zimográfica. Sin embargo, en el ensayo fibrinolítico sobre PFC previamente formados, la actividad enzimática de la proteína libre demuestra una dependencia total de la existencia de trombina, de tal manera que en su ausencia la mFP presenta un poder fibrinolítico

residual (fig. 30R b, ▼) similar al de los coágulos control (fig. 30R b, ○). Es importante resaltar que, al igual que lo observado con la SA-UK-T, la mFP posee una actividad fibrinolítica similar a la del tPA (fig. 30R b, ○ -tPA- y ▲ -mFP-). Este comportamiento fibrinolítico y selectivo de la presencia de trombina para la mFP, se repite también con la proteína unida a los eritrocitos y así los RBCb₁₀/mFP, (fig. 30R c) solo muestran actividad fibrinolítica si previamente han sido preincubados con trombina (preactivados), pero muestran una actividad similar al grupo control (N-RBC) en ausencia de dicha preincubación (no preactivados).

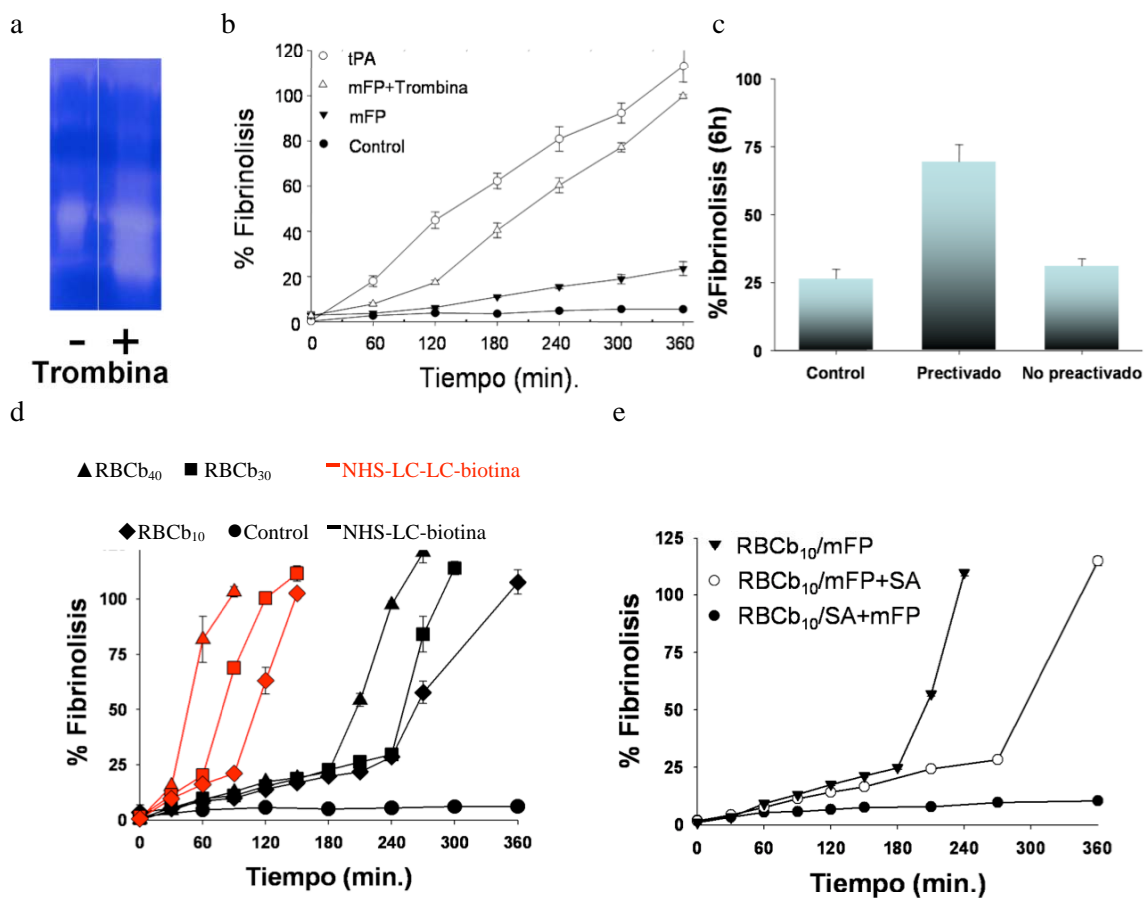


Figura 30R. Actividad enzimática de mFP y RBCb/mFP. (a) Zimografía representativa del medio de las células S2, transfectadas e inducidas, y preincubado (+) o no (-) con trombina. (b) Cinética fibrinolítica comparativa sobre ¹²⁵I-PFC de cantidades equimolares (2 nM) de tPA y mFP, preactivada o no con trombina; M±SEM, n=3. (c) Análisis fibrinolítico sobre ¹²⁵I-PFC de RBCb₁₀/mFP (0,2 nM), preactivados o no por trombina, tras 6 horas de incubación; M±SEM, n=6. (d) Cinética fibrinolítica comparativa de ¹²⁵I-PFC formados en presencia de idénticos volúmenes de RBCb_x/mFP (x= 10-40 M) generados mediante los distintos agentes biotinylantes; M±SEM, n=3. (e) Análisis fibrinolítico sobre ¹²⁵I-PFC, previamente formados, sobre los que añadimos idénticos volúmenes de RBCb₁₀/mFP, RBCb₁₀/mFP preincubados con un exceso de SA nativa y RBCb₁₀/SA preincubados con un exceso de mFP; M±SEM, n=6.

Una vez comprobadas I) la actividad plasminogenolítica de la mFP, II) su unión sobre la superficie de los RBCb de un modo específico, y III) el mantenimiento de la actividad plasminogenolítica de la proteína tras su unión a eritrocitos, nos proponemos

estudiar la actividad fibrinolítica de los complejos RBCb/mFP desde el interior de los coágulos. Esto posee una relevancia máxima en cuanto a que estamos aplicando este complejo a una hipotética terapia trombotoprolíctica. La figura 30R d compara la efectividad fibrinolítica de complejos formados con eritrocitos biotinilados con NHS-LC-biotina o el NHS-LC-LC-biotina. Las biotinilaciones eritrocitarias serán realizadas en el rango de concentraciones 10-40 μM de reactivo de biotina, que además de asegurar una incorporación de moléculas de mFP creciente y lineal (fig. 29R a), representa un grado de modificación que genera complejos potencialmente estables en circulación. Así comprobamos como los complejos formados con el agente biotinilante más corto (NHS-LC-biotina) obtienen una fibrinólisis eficiente (fig. 30R d –líneas negras), pero bastante más lenta que la desarrollada por aquellos complejos formados a partir del reactivo NHS-LC-LC-biotina, de brazo espaciador más largo (fig 30R d –líneas rojas-). También observamos como independientemente del tipo de agente biotinilante empleado, aumenta la velocidad de fibrinólisis a medida que lo hace el grado de modificación con biotina, lo cual va en consonancia con una mayor incorporación de moléculas de mFP a los RBCb_x (fig. 29R a). Una de las características más interesantes de esta mFP es la de poder ser desplazable de la superficie eritrocitaria por la SA nativa (fig. 30R e). Por lo tanto y de acuerdo con los resultados mostrados en el apartado anterior, un desplazamiento parcial de la mFP de los complejos RBCb_x/mFP, mediante incubación con un exceso de SA, reduce sensiblemente su capacidad fibrinolítica (fig. 30R e). Capacidad fibrinolítica que desaparece si la mFP es añadida a los RBCb₁₀, después de que estos hayan sido incubados con SA, y por tanto la mFP ni encuentra residuos de biotina libres, ni es capaz de desplazar a la SA de éstos (fig 30R d).

3.4.4 Circulación, biodistribución y actividad de los complejos RBCb/mFP.

Una vez comprobada la capacidad de generación de los complejos RBCb_x/mFP y su efecto fibrinolítico *in vitro*, decidimos estudiar su circulación y biodistribución *in vivo*. Para ello, marcamos radiactivamente, el agente portador ⁵¹CrRBCb_x y nos propusimos verificar el grado óptimo de modificación con biotina para producir los complejos más estables en el torrente circulatorio. De este modo, la circulación de los complejos mejora al disminuir el grado de modificación con biotina (fig. 31R), siendo el complejo más estable aquel obtenido con eritrocitos biotinilados con una concentración 5 μM (línea roja). Estos RBCb₅ son capaces de incorporar 31.918 ± 2.176 moléculas de mFP en su superficie, cantidad que fácilmente proporciona una dosis equiparable a la clínica convencional (1,9 nmol/kg).

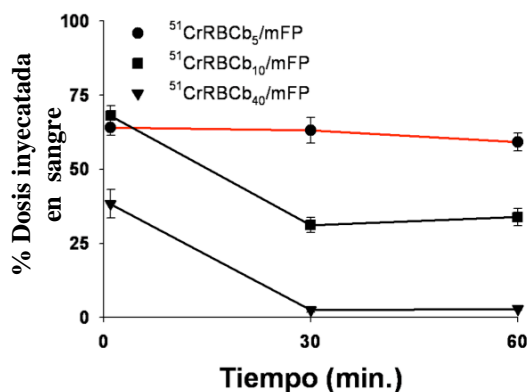


Figura 31R. Selección del grado de biotinilación RBCb_x/mFP más estable para su circulación en ratones. Análisis farmacocinético, durante 60 minutos, de las distintas preparaciones de ⁵¹CrRBCb_x/mFP inyectadas intravenosamente en el ratón. M±SEM, n=3 animales por punto.

Tras haber seleccionado el grado de modificación más apropiado para la generación de complejos, comparamos la circulación de ambas especies, portador y mFP, mediante la utilización del doble marcaje radiactivo, obteniendo los complejos ⁵¹CrRBCb₅/¹²⁵I-mFP. A su vez, el marcaje radiactivo de la mFP nos permite realizar un grupo control de animales, donde verificar la farmacocinética de la ¹²⁵I-mFP libre y así comprobar la ventaja de la unión de ésta a los eritrocitos. La ¹²⁵I-mFP libre inyectada iv. en el ratón experimenta una inmediata eliminación de su circulación, quedando tan solo un 26 % de la dosis inicial inyectada tras el primer minuto. Este porcentaje decae incluso por debajo del 10% durante los siguientes 15 minutos (fig. 32R a –línea amarilla-). Por el contrario, la circulación de la mFP unida al eritrocito sigue un perfil paralelo de circulación al de su portador (fig. 32R a). Así la circulación de la mFP conjugada es muy superior al de la proteína libre, mostrando un porcentaje del 50% durante las 3 primeras horas y aún, por encima del 25% tras 15 horas de circulación. Otra diferencia significativa en cuanto a la circulación de la mFP libre o la unida a eritrocitos, radica en la biodistribución sanguínea de la marca radiactiva. De esta manera, en el caso de la proteína libre, la radiactividad se localiza fundamentalmente en el plasma (aproximadamente un 75%), mientras que la mFP unida al eritrocito se presenta en un 90% en la fracción celular (fig. 32R b), lo cual indica la persistencia de la unión al portador. A su vez la distribución sanguínea de la marca para el portador supera el 95 % en la fracción celular, lo que indica una integridad mantenida del RBCb₅ portador. De acuerdo con este comportamiento, la mFP asociada a los RBCb₅ además de mostrar una farmacocinética paralela a la de su portador permaneciendo mayoritariamente en sangre, muestra también una distribución paralela en el resto de órganos (fig. 32R c y d), donde ambos isótopos se localizan de forma limitada tanto en hígado (como órgano principal de la eliminación de sustancias extrañas o alteradas) como bazo (órgano primordial en la eliminación de eritrocitos senescentes o dañados). No obstante, esta localización

disminuye con el tiempo (1h frente a 3h), lo cual apunta a una retirada inicial de aquella mínima porción de eritrocitos, que tras su modificación quedaron algo más lábiles que otros y no soportaron los primeros envites del torrente circulatorio al ser inyectados (fig. 32R c y d).

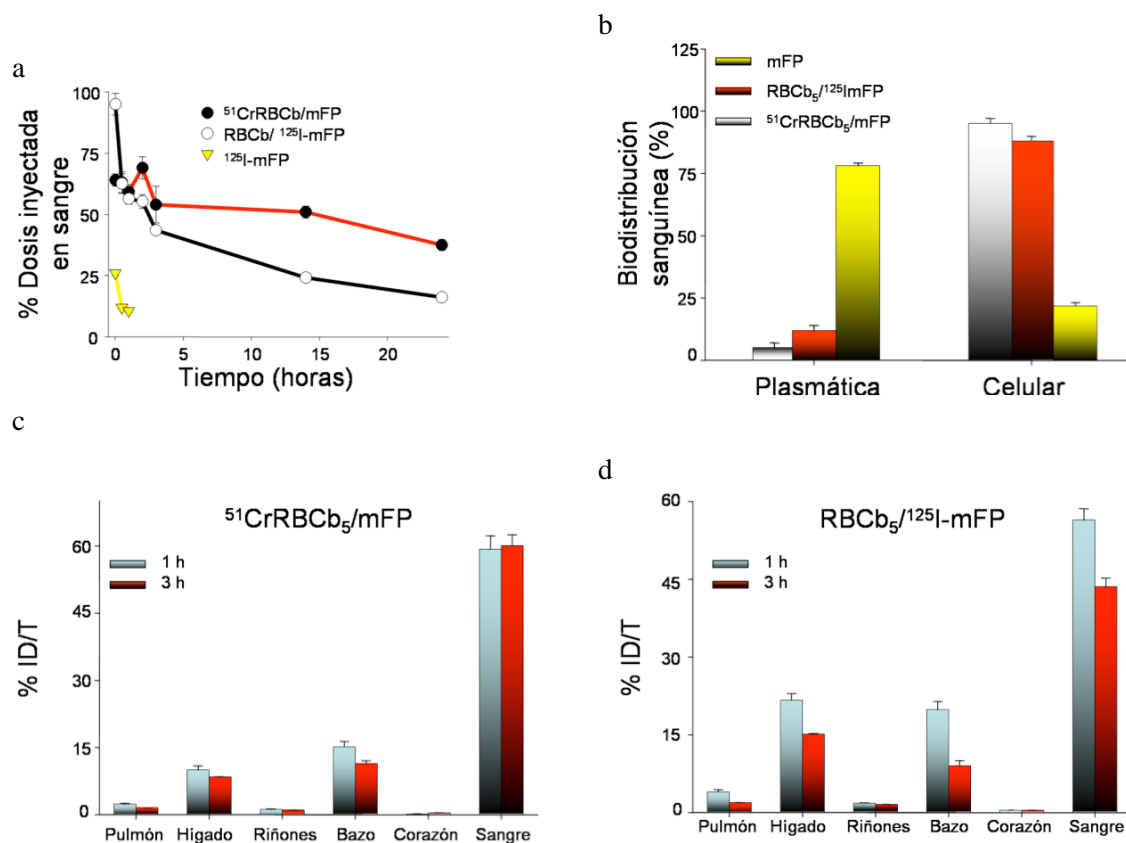


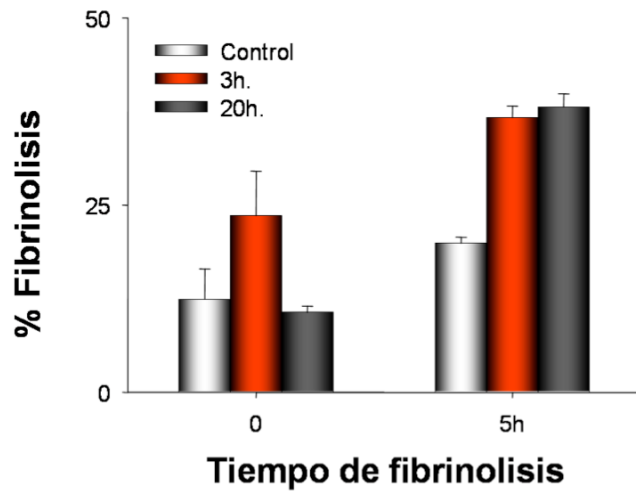
Figura 32R. Estudio farmacocinético y distributivo de los RBCb₅/mFP en ratones. (a) Análisis farmacocinético, durante 24 horas, de los complejos $^{51}\text{CrRBCb}_5/^{125}\text{I-mFP}$ o la $^{125}\text{I-mFP}$ libre, inyectadas intravenosamente en el ratón; $M \pm \text{SEM}$, $n=3$. (b) Muestran la biodistribución de los complejos (60 minutos) o la proteína libre (15 minutos) en las distintas fracciones (plasmática o celular) de la sangre. (c y d) Biodistribución tisular de los complejos $^{51}\text{CrRBCb}_5/^{125}\text{I-mFP}$ tras 1 ó 3 horas de circulación. $M \pm \text{SEM}$, $n=3$ animales por tiempo.

Tras demostrar la estabilidad de la circulación de los complejos, verificamos la actividad fibrinolítica de éstos tras su paso por la circulación sistémica. De esta manera, comprobamos como aquellos coágulos formados con sangre extraída de animales que han recibido una inyección de complejos se degradan de forma eficiente (fig. 33R). Es interesante resaltar, como el efecto "protector" o degradativo de los coágulos se mantiene en el tiempo y así coágulos formados con sangre extraída, tras 3 ó 20 horas de circulación del complejo, son capaces de degradarse de forma eficiente y similar tras 5 horas de incubación (37% y 38% respectivamente), mientras que coágulos formados con la sangre control de los mismos animales extraída antes de recibir la inyección de los complejos, no

eran capaces de lisarse (barras grises). Estos resultados demuestran como los RBCb₅/mFP circulan de forma estable y preservan su actividad durante su circulación, obteniendo una capacidad tromboproliférica eficiente.

Figura 33R. Actividad fibrinolítica de los RBCb₅/mFP tras su paso por la circulación.

Fibrinólisis espontánea de coágulos formados a partir de sangre extraída (en ausencia de anticoagulantes) de ratones inyectados con 0,5 nmol/kg de mFP en 200 μ l de RBCb₅/mFP, tras permanecer en la circulación 3h (barra rojas) ó 20 horas (barra gris oscura). La determinación fibrinolítica se realiza después de incubar el coágulo durante 5 h a 37°C. El control lo componen los coágulos formados a partir de la sangre extraída de los mismos animales antes de administrarles los complejos. M \pm SEM; n= 4 animales por tiempo y 2 coágulos por animal y condición (total 8 coágulos por condición).



DISCUSIÓN

1. PA LIBRE.

El tPA continua siendo la droga más utilizada en el tratamiento de las patologías tromboembólicas. La incorporación de nuevas drogas para el tratamiento de las enfermedades vasooclusivas se encuentra retrasada por: I) la imposibilidad de comparar dosis en las mismas unidades y en el mismo tipo de coágulos, II) la escasez de análisis básicos de actividad y de ensayos clínicos comparando los distintos PA y III) la falta tanto de coordinación entre hospitales, como de una clasificación general de las dosis y regímenes de administración. Para sobrepasar estas limitaciones, se ha propuesto el diseño de nuevos PA, bien derivados de los utilizados en clínica o bien de moléculas existentes en la naturaleza, que mejoran la su aplicabilidad terapéutica. Sin embargo, las características de los PA clásicos y los de nuevo diseño, no permiten su utilización en trombopprofilaxis. Con la intención de disminuir el riesgo de los efectos adversos del tPA (principalmente el riesgo de hemorragias intracraneales) y facilitar su administración, se desarrollaron los PA de tercera generación, entre los que destacan la Ret y la TNK. Dichas variantes poseen una semivida de circulación más elevada (tabla 3I) [61], y aunque comparten el mismo núcleo catalítico difieren significativamente en sus propiedades moleculares en relación a su afinidad y selectividad por la Fn, resistencia a inhibidores, tamaño y glicosilación. En el presente estudio nos centramos en aquellos PA de mayor aplicación clínica: UK, tPA y sus derivados Ret y TNK, comparándolos tanto *in vitro* como *in vivo*.

La importancia de la selección de la plataforma experimental para el análisis de la actividad fibrinolítica.

Los estudios comparativos realizados hasta el momento se llevaron a cabo sobre coágulos de plasma humanos, los cuales incorporan numerosas sustancias que pueden intervenir directamente en el proceso fibrinolítico potenciándolo o inhibiéndolo (véase tabla 2I). Además, como se ha descrito en la introducción, gran parte de los componentes plasmáticos sufren variaciones en su concentración, ya sea por su regulación endógena mediante ciclos circadianos [103-105] (por ejemplo tPA y PAI-1), o por la condición específica del donante, de esta forma, la concentración de Fg posee una elevada variabilidad en función de la situación fisiológica y/o fisiopatológica (edad, obesidad, diabetes, ejercicio físico, embarazo, fármacos, consumo de alcohol, etcétera) [262]. Debido a estas variaciones, el efecto fibrinolítico de las drogas en estudio puede verse

dramáticamente afectado por la contribución de esos componentes, que impiden la comparación directa de los distintos PA. Por todo ello, inicialmente nos centramos en el análisis de aquellos fibrinolíticos de uso clínico más avanzado, en un sistema puro altamente controlado, donde no exista la contribución de inhibidores u otras proteínas que interfieran en la fibrinólisis. Así se establecerá primeramente una concentración constante y fisiológica de Fg, el cual juega un papel activo en el proceso fibrinolítico localizándolo y ejerciendo un efecto potenciador sobre el tPA y sus derivados.

Al estudiar la actividad de los distintos PA sobre PFC podemos observar como tPA y sus derivados poseen la misma capacidad fibrinolítica (fig. 1R a), fiel reflejo de la posesión del mismo núcleo proteásico que convierte el Plg en Pln. Dicha equiactividad no se debe a un proceso de saturación, ya que al realizar una titulación decreciente de las concentraciones, observamos el mantenimiento dosis dependiente de la equiactividad para tPA, Ret y TNK (fig. 1R b). Estos resultados son contrarios a la idea preestablecida de la menor capacidad plasminogenolítica de Ret, a la cual se le había atribuido incluso una menor potenciación fibrinolítica que a tPA, por la acción de la Fn [263]. Por otro lado, podemos observar como la UK tiene una actividad fibrinolítica inferior a la mostrada por el tPA y sus derivados y, por lo tanto, requiere concentraciones superiores para ejercer una equiactividad fibrinolítica. Esto debe ser entendido desde el prisma, ya citado (véase apartado 3.1.2.1 de la introducción) a) de un núcleo proteásico inactivo, que debe ser activado por la Pln, a diferencia de lo que pasa con el núcleo proteásico de tPA y sus derivados, y b) a la falta de potenciación fibrinolítica ejercida por la Fn, ya que UK no tiene especificidad por ésta, mientras que el tPA y sus derivados forman complejos ternarios gracias a su unión a través de los dominios F y K2. Sin embargo, al estudiar los distintos PA sobre coágulos de plasma (PPP) se producen variaciones en su actividad fibrinolítica, donde solo tPA y TNK mantienen una misma actividad, mientras que el efecto fibrinolítico de UK desaparece por completo y el de Ret disminuye en un 50% (fig. 1R c). Además, si los PPP se enriquecen en Fn, hecho que es plausible en determinadas situaciones patológicas [264], aparece una mayor incapacidad de Ret para lisar el coágulo, aunque también se hace patente la disminución del efecto fibrinolítico de la TNK (fig. 1R d). Estos ensayos demuestran que el comportamiento de las drogas será distinto en función de la composición del coágulo y llama la atención sobre la presencia de determinadas proteínas plasmáticas que influyen en el efecto fibrinolítico de los PA. Entre las proteínas plasmáticas más importantes que puedan influir se encuentran los inhibidores del proceso fibrinolítico, entre los que destacan el PAI-1 y el TAFIa. Siguiendo

este razonamiento, nos propusimos investigar la contribución de los principales inhibidores plasmáticos sobre los PA analizados. Para diferenciar el efecto de uno u otro inhibidor utilizamos de nuevo PFC, privado de cualquier otra proteína plasmática distinta de Fg o Plg. Los resultados obtenidos ratificaban la contribución del PAI-1 como inhibidor de Ret, y explicaban su menor actividad fibrinolítica en los coágulos formados con plasma, sugiriendo una mayor susceptibilidad de Ret a los inhibidores plasmáticos y no a una menor capacidad plasminogenolítica en comparación con el tPA [263]. Es interesante remarcar que los coágulos de plasma (PPP) muestran la inhibición parcial de Ret y prácticamente total de UK, sin embargo no muestran la inhibición de TNK (debido probablemente a su alta resistencia frente al PAI-1) y tampoco la de tPA, pese a que ésta es también sensible al efecto de PAI-1 (fig. 2R a). Analizados los niveles de PAI-1 en plasma, así como las concentraciones que ponemos de PA en el ensayo, podemos afirmar que no llegamos a la paridad molar de ambas moléculas en el PPP (fig. 1R c). De este modo, frente a la concentración aproximada de 0,2-0,4 nM de PAI-1 en plasma, y conociendo que la concentración del PA añadida sobre el coágulo de PPP es de 2 nM, podemos observar que estamos muy por encima de dicha equimolaridad y, por lo tanto, la posible afección del tPA por parte del PAI-1 no se refleja en este tipo de ensayos.

Llama la atención el efecto inhibitorio de la TNK en aquellos coágulos de PPP enriquecidos en Fg. Este incremento de la concentración de Fg en sangre es un hecho ya demostrado en el que además intervienen múltiples factores fisiológicos y patológicos, siendo sus niveles muy variables dependiendo de la condición fisiológica, patológica y de los hábitos de vida. Pero también, puede ir asociado a determinadas enfermedades como la trombofilia asociada al factor de Leiden [265]. Nuestros resultados muestran que el enriquecimiento del PPP con Fg inhibía aún más la actividad de Ret, disminuyendo también la actividad de TNK. La mayor especificidad de la TNK por la Fn polimerizada [231], en comparación con el tPA, indica que la inhibición pueda ir asociada a un agente que interfiera en dicha unión. Como se ha indicado anteriormente (véase introducción apartado 4.1.2), TAFI elimina los residuos de Lys en posición C-terminal que sirven de anclaje para el Plg, tPA y sus derivados y que incluso pueda afectar a la formación del complejo ternario Plg-Fn-PA. Para estudiar la contribución de este inhibidor, preincubamos los PPP enriquecidos en Fg con un inhibidor de TAFIa (el PCI). Esto recuperó completamente la capacidad fibrinolítica de TNK y parcialmente la actividad de Ret (fig. 2R b). Indicando que TAFIa era el principal responsable de la disminución de actividad de TNK en los coágulos ricos en Fn. Este fenómeno es de considerable importancia, ya que el

efecto inhibitorio sobre TNK era revertido completamente, mientras que la Ret sólo recuperaba parcialmente su actividad fibrinolítica, puesto que también se vería afectada por los niveles del PAI-1, a diferencia de lo que ocurre con la TNK más resistente a este inhibidor. La contribución del TAFIa adquiere una elevada relevancia ya que su activación se realiza fundamentalmente por la trombina y, por ello, en las cercanías del coágulo donde su concentración es mayor. Este efecto puede verse aumentado en situaciones patológicas donde se podrían generar coágulos más resistentes a la fibrinólisis por la acción del TAFIa, ya sea por una activación constante de la cascada de la coagulación (factor V de Leiden, por ejemplo) [266], o por una falta de la inactivación de la trombina (por ejemplo a través de la proteína C) [267], o por la acción del endotelio patológico ya que este, a través de la trombomodulina, potencia la activación del TAFI [267]. Todo esto sugiere que en determinadas patologías el uso de TNK pudiera estar más comprometido comparándola con otros PA. El Fg, el cual es susceptible de sufrir procesos de oxidación y nitración inducidos por diversas situaciones fisiopatológicas [268], es una molécula clave en el control de la actividad de la TNK. Estas modificaciones además de alterar las propiedades propias del coágulo podrían variar la relación del PA con el entramado del mismo, favoreciendo procesos de embolización distal o limitando el efecto fibrinolítico de la droga.

La búsqueda de nuevos modelos que reflejen mejor la situación terapéutica.

Tras haber aproximado una serie de características de importancia en el comportamiento de las drogas, hay que resaltar que la situación terapéutica es muy distinta a los sistemas *in vitro* empleados. En este sentido, la disolución del coágulo por el PA depende de su concentración plasmática, de su momentánea interacción debida al flujo sanguíneo, del tipo de coágulo y su localización. Todos estos conceptos no se reproducen en el ensayo habitual *in vitro* donde el coágulo se encuentra constantemente expuesto a la actividad del PA. De este modo, las diferencias existentes entre las distintas vidas medias de las drogas pueden afectar sensiblemente a la concentración del PA en la zona patológica. Así, una incubación transitoria con el PA, en lugar de una incubación constante, emularía mejor la situación terapéutica en las condiciones más equiparables, ya que a tiempos cortos aun se mantendría la droga administrada en circulación. Por ello, realizamos ensayos donde incubamos al PA analizado con el coágulo durante 5 minutos, lo que reflejaría mejor la llegada de la droga y su presencia en la localización del coágulo. Otro factor importante que puede modular la acción fibrinolítica *in vivo* sería la

especificidad y afinidad por la Fn ya que las drogas que carecieran de ella tenderían a penetrar en el coágulo más fácilmente. Por este motivo, la UK es una droga que se usa en aplicaciones mediante catéter y es preferible al tPA, dado que este último actuaría degradando las capas externas mientras que la UK penetraría en el coágulo y lo degradaría tanto desde el exterior como desde el interior. Cuando la UK fue retirada temporalmente del mercado en 1.998 en EEUU, se fomentó la investigación con Ret como un posible sustituto, dada su menor afinidad por la Fn. La capacidad de difusión de la Ret *in vitro* se encontraba bien establecida [263], y por eso a nosotros nos interesaba estudiarlo en profundidad en nuestro modelo de embolia *in vivo*, ya que este tipo de estudios no habían sido realizados con detenimiento. Como paso previo del diseño experimental *in vivo*, debíamos avanzar los resultados y dosis más apropiadas a utilizar. En este sentido, los estudios *in vitro* previos realizados por otros grupos, donde se realizaban incubaciones constantes con las drogas, no nos permitían reproducir con proximidad las diferencias que pudiesen encontrarse posteriormente *in vivo*, debido al $t_{1/2}$ de los distintos PA. Además, es necesario determinar las dosis adecuadas y extrapolarlas con los estudios clínicos, ya que las empleadas en la clínica para Ret siguen un régimen dependiente de unas unidades arbitrarias de actividad. Establecimos las dosis en función de su molaridad lo que permite comparar directamente las distintas drogas. Así, el ensayo de exposición transitoria de PA a los coágulos de Fn, dada la equiactividad observada (figs. 1R a y b), presentaba a la Ret como el PA con una actividad significativamente mayor que la mostrada por el tPA y la TNK, siendo estas a su vez superiores a la actividad mostrada por la UK (fig. 3R a). Es razonable pensar que una mayor concentración de moléculas de Ret en el coágulo fuese la productora de una fibrinólisis más rápida. Estos resultados sugerían una mayor retención de Ret (fig. 3R b), bien fuera por difusión hacia el interior de los coágulos o bien por almacenamiento en su superficie. Diferencias que se podrían explicar en base a dos parámetros físicos importantes, por un lado el menor tamaño molecular de la Ret (39 kDa) y, por otro, la menor afinidad por la Fn que tPA y TNK, lo que permitiría una difusión más profunda en el interior del coágulo. En estos ensayos obtuvimos una menor actividad de la UK (35 kDa), pese a su menor tamaño y la ausencia de afinidad por la Fn, la cual se encontraba disminuida incluso en comparación con el tPA y la TNK (60 kDa). Al analizar la retención los distintos PA llama la atención el mayor número de moléculas retenidas de Ret (fig. 3R b), pese a tener más limitada la especificidad por la Fn, exclusivamente la dependiente de lisina a través del dominio K2, mientras que tPA y TNK poseen afinidad tanto independiente como dependiente de lisinas

(F y K2). Sin embargo, tPA y TNK presentan una retención muy similar y aproximadamente un 50% inferior a la de Ret (fig. 3R b). Es interesante resaltar que las diferencias entre las distintas drogas desaparecen al realizar el mismo tipo de ensayo sobre coágulos de Fn que no incluyen Plg en su composición. Esta ausencia de Plg sólo afecta de un modo significativo a la Ret y no al resto de PA indicando que la interacción de Ret con la Fn y el Plg es fundamental para su estabilidad (fig. 3R b). Para demostrar que el incremento en la retención de Ret se debe al efecto de difusión de ésta en la estructura del coágulo, debido a su menor especificidad por la Fn, analizamos mediante microscopía confocal la penetración de los distintos PA donde obtuvimos una mayor difusión de la Ret en el coágulo (figs. 3R c y d). En el ensayo Ret muestra una difusión tan elevada como la de UK, una molécula de tamaño similar al de Ret y sin especificidad por la Fn, pero a diferencia de esta, observamos como la Ret muestra una colocación con la Fn del coágulo. Mientras que tPA y TNK debido a su alta especificidad por la Fn también colocan con ésta, pero a nivel de la superficie externa del coágulo (fig. 3R c y d). Cabe destacar como en este tipo de ensayo la TNK muestra una mayor difusión que el tPA, lo cual puede estar relacionado con una mayor especificidad por ciertos residuos de la Fn polimerizada. Estos resultados corroboran la mayor actividad de la Ret en la exposición temporal, no sólo por su mayor retención de moléculas en el coágulo, sino también por producir la lisis del mismo desde distintos frentes: superficie e interior. Hay que resaltar la importancia de estos resultados, ya que la llegada de la droga al lugar donde debe ejercer su acción fibrinolítica está influenciada por infinidad de situaciones alteradas en el proceso patológico, por ejemplo disminución del flujo sanguíneo en la zona trombosada, incremento de la contractilidad en la vasculatura afectada, incremento de la liberación de los inhibidores por el endotelio, aumento de los niveles de trombina, etcétera.

Retepasa se muestra como un agente fibrinolítico potente para el tratamiento de la embolia pulmonar.

Los resultados anteriores se obtuvieron sobre PFC, en ausencia de los componentes inhibitorios presentes en el plasma a los que Ret ha mostrado una mayor susceptibilidad. Por lo tanto, un análisis del efecto *in vivo* reflejaría la potencia fibrinolítica de Ret. Con este fin, utilizamos un modelo de embolia pulmonar en ratón desarrollado en el laboratorio. Este modelo, en el cual inyectamos microémbolos de Fn, a diferencia de otros modelos existentes (inyección de micropartículas de poliestireno [269], de trombina

[270], de epinefrina/colágeno [271], entre otros), presenta la peculiaridad de reproducir sistemáticamente el efecto embólico. Además usando este modelo se puede modular su agresividad, la aparición de los síntomas de la embolia y reproducir incluso parámetros propios de la enfermedad humana. Además, es sensible no solo a métodos de diagnóstico clínico [272], sino también al efecto fibrinolítico tanto endógeno [71], como exógeno o terapéutico [273, 274]. Dada la alta sensibilidad y ventana de cuantificación de este modelo, puede permitir la evaluación de efectos mínimos de concentración, de variaciones en las concentraciones endógenas e incluso el efecto de la composición del coágulo (dado que podemos enriquecer el coágulo en plaquetas, en Fn o en otros componentes). Pero también, puede detectar efectos combinados de drogas [273], alteraciones patológicas de los componentes del coágulo [268] o aproximaciones terapéuticas en desarrollo [275]. El uso de este modelo animal nos ha permitido corroborar los resultados obtenidos *in vitro*. De nuevo Ret es la droga fibrinolíticamente más potente, disolviendo los ME inyectados a dosis 4 veces inferiores al tPA (fig. 4R b), siendo necesarias dosis superiores para TNK y UK. Estos resultados adquieren mayor relevancia al considerar que el efecto fibrinolítico no está influenciado significativamente por las distintas vidas medias. Esto es, en nuestro modelo utilizamos dosis equimolares ajustadas en función del peso del animal, y aunque la vida media de las distintas drogas es diferente, la retención de los ME en el pulmón es homogénea y la llegada de la droga administrada de forma directa a los coágulos, evitando el efecto de primer paso hepático, es prácticamente inmediata. Si a esto se le une el efecto de la elevada especificidad por la Fn para el tPA y TNK, frente a la limitada especificidad para Ret, hace que el efecto favorable de la vida media en el caso de Ret tenga menor importancia, y aunque pudiera tenerla en mayor medida al comparar los resultados con tPA, la comparación con TNK no representaría una mejora, puesto que Ret y TNK tienen vidas medias comparables (tabla 3I). Nuevamente, la mayor actividad se correspondía con la mayor retención de Ret sobre el pulmón de los animales embolizados, siendo esta muy superior a la mostrada por tPA, TNK o incluso UK (fig. 4R c). A diferencia de los estudios *in vitro* (fig. 3R), donde tPA y TNK poseían la misma retención de moléculas y la misma actividad fibrinolítica, pese a la difusión superior de la TNK bajo el confocal (fig. 3R d), en este modelo existe una mayor retención de TNK con respecto a tPA sobre el pulmón embolizado (fig. 4R c). Sin embargo, llama la atención la menor actividad de TNK con respecto a tPA (figs. 4R b y c). Una de las explicaciones referidas en la literatura sería que la mayor afinidad de TNK por la Fn, podría incurrir en fenómenos de competición del propio PA con el Plg por los sitios de unión compartidos en la Fn [263] y,

disminuyendo la presencia del Plg en la superficie. Esto en si mismo puede ser interesante de contestar, pero para ello sería necesario un diseño experimental específico. Por otro lado, la menor actividad de la UK (fig. 4R b), se deberá probablemente a sus limitaciones plasminogénicas y sensibilidad frente a los inhibidores (figs. 1R a, c y d) y no sobre una falta de difusión al interior (fig. 3R b), ya que los experimentos realizados *in vivo*, a diferencia de los *in vitro*, se encuentran bajo las condiciones del flujo sanguíneo. Siguiendo con este concepto, en contraposición a los ensayos *in vitro*, donde obteníamos una retención similar de la UK a la observada para tPA y TNK (fig. 3R b), en el experimento *in vivo* observamos una retención mayor de moléculas de UK en el pulmón embolizado (fig. 4R c), hecho que se deberá a fenómenos de difusión, favorecidos por la ausencia de afinidad por la Fn. Por otro lado, la menor retención de moléculas observada para tPA y TNK se deberá a los fenómenos de afinidad por la Fn y no a un efecto limitante en su diferencia de tamaño molecular (60 kDa frente a los 39 kDa de Ret), dado que BSA, molécula de 60 kDa sin afinidad por la Fn, presenta una retención de moléculas similar a la mostrada por la UK (fig. 4R c).

La actividad tan elevada de Ret en el modelo animal, donde están presentes los inhibidores de los PA plasmáticos, aumenta la importancia del efecto de Ret en el tratamiento de enfermedades oclusivas. En los experimentos *in vitro* realizados con plasma humano la Ret poseía un efecto limitado, debido a su sensibilidad por los inhibidores (fundamentalmente PAI-1, figs. 1R c y 2R a). En el modelo animal de ratón, la variación de las especies, lejos de influenciar a favor de una mayor actividad de Ret, debiera ser en contra, ya que el plasma de ratón se considera que tiene una mayor potencia inhibidora sobre los PA de uso clínico. Sin embargo, la droga que haya penetrado en el interior del coágulo, puede quedar protegida del efecto de los inhibidores tras su unión al entramado de la Fn e incluso la formación del complejo ternario Fn-PA-Plg [52, 55]. Aunque estos resultados parecen dar una explicación plausible, habría que realizar experimentos tendentes a comprobar estas observaciones.

La importancia de las dosis aplicadas: control de los efectos adversos.

El efecto algo superior de Ret *in vivo*, había sido sugerido con anterioridad en animales [276] y en ensayos clínicos [155], donde Ret no era inferior a los otros PA e incluso parecía ser más eficiente que tPA. Pese a ello, sus efectos adversos no mejoraban los producidos por su droga parental y, asociada a su falta de especificidad por la Fn, convertían a Ret en una molécula menos indicada para su uso clínico. No obstante, los

efectos adversos también son consecuencia de la dosis administrada, por lo que el establecimiento de dosis elevadas incrementa el riesgo. De hecho, las dosis administradas de los distintos PA, al igual que los distintos regímenes de administración, hacen complicada la comparación de las distintas drogas. Así, tPA se administra en dosis ajustadas al peso en regímenes de bolo seguidos de una infusión constante de la droga (0,9-1,5 mg/kg, con un máximo de 100 mg), mientras que sus derivados, Ret y TNK, se administran en dosis estandarizadas, en doble bolo para Ret (17 mg cada uno) independientemente del peso del paciente y en bolo simple para TNK, con dosis ajustadas al rango de peso del paciente (dosis que varían entre 0,5-0,6 mg/kg, con un máximo de 50 mg). Dado el menor peso molecular de la Ret, las dosis administradas solo serían comparables entre la Ret y la TNK en sujetos de aproximadamente 100 kg, siendo muy superiores las dosis administradas de tPA (al menos 2 veces). Por lo tanto, para el caso de la Ret los sujetos de un peso superior estarán recibiendo dosis finales inferiores, con la consecuente menor disolución de los trombos, y los pacientes de un peso inferior estarán sujetos a dosis elevadas del fármaco, con el consecuente riesgo de presentar los efectos adversos. Además, los distintos regímenes de administración hacen más favorable al tPA para la disolución de los trombos, puesto que se administra de un modo continuo. Aunque, la administración de tPA solo puede realizarse en el ambiente hospitalario, viéndose limitado el tiempo de recanalización en determinados pacientes con enfermedades oclusivas tales como el infarto de miocardio o la embolia cerebral y pulmonar desde que se le diagnostica el accidente hasta su llegada al hospital. Por ello, la utilización de sus derivados de vida media más larga y que favorecen su administración fuera del ambiente hospitalario (mediante una sola inyección en lugar de inyección e infusión) sería más conveniente, puesto que reducirían el tiempo desde la aparición de los síntomas hasta su tratamiento, el cual es un parámetro crítico para la evolución favorable del paciente. Al revisar los datos históricos y dadas las menores dosis administradas con Ret y TNK podríamos esperar una menor recanalización vascular a la vez que se disminuirían los efectos adversos. No obstante, los ensayos clínicos realizados para ambas drogas han demostrado en muchos de ellos al menos la no inferioridad de los derivados de tPA frente a la molécula parental [146, 170, 178].

Distintos PA pueden tener comportamientos diferentes en cuanto a su uso farmacológico, comportamientos que incluso en determinados sistemas es posible que estén pasando inadvertidos probablemente por una diferencia de unidades o de observaciones tanto clínicas como experimentales. De todas las drogas analizadas en los

modelos presentados, quizás la Ret pudiera tener un efecto más relevante en determinadas aplicaciones. Cabe destacar que en nuestro modelo, a la mayor potencia fibrinolítica mostrada por Ret, hay que unir el hecho de la toxicidad neuronal asociada al tratamiento fibrinolítico. Dicha toxicidad se produce por la extravasación de las drogas al parénquima cerebral, proceso en el que participa el dominio EGF [277], donde se produce la interacción de la molécula de tPA con los receptores NMDA (K1 y K2) de las neuronas y la activación de la microglía (dominio F) [278]. Todos estos dominios también están presentes en la TNK, pero no en la Ret, por lo que Ret podría ser una droga más segura en el tratamiento de este tipo de patologías, al disminuir su extravasación vía LRP (dominio EGF) y no activar a la microglía (dominio F), aunque mantiene su unión a los receptores NMDA a través del K2 [4]. De hecho si en el caso de Ret, se consiguiera ajustar la dosis de forma más efectiva se podrían incluso disminuir los efectos hemorrágicos asociados que se han visto en algunos estudios clínicos [155]. Otro factor importante deducido de nuestros experimentos, es la efectividad de la fibrinólisis de Ret, probablemente por su acción tanto desde el exterior del coágulo, como desde su interior. El permitir una disolución completa de los coágulos cobra una importancia especial, puesto que la aparición de una enfermedad como la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica se desencadena por la calcificación de coágulos o restos de los mismos que no han sido eliminados en el tratamiento de la embolia pulmonar. En estos casos, una vez desarrollada dicha hipertensión pulmonar, la esperanza de vida de estos sujetos no supera los 10 años y no se conoce ningún tratamiento curativo, puesto que los coágulos calcificados no se pueden fibrinolizar.

En definitiva el conjunto de estos resultados sugiere, que es necesaria una comparación exhaustiva de las distintas drogas y de sus características para poder mejorar el conocimiento de las mismas y rediseñar sus posibles aplicaciones en las distintas afecciones tromboembólicas. Si bien el tratamiento fibrinolítico en la embolia pulmonar es muy controvertido y ha suscitado múltiples discusiones [279-281], los resultados mostrados favorecen claramente la selección de Ret para el reestablecimiento de la condición hemodinámica y recuperación de la embolia pulmonar. La utilización de Ret estaría también apoyada en el tratamiento de coágulos, fundamentalmente de origen venoso, retenidos en una zona muy específica y de fácil acceso a través de su ruta de administración, por ejemplo direccionamiento por catéter (trombosis venosa profunda) o efecto de primer paso (embolismo pulmonar). De esta forma la droga de mayor retención y difusión en el coágulo, será la más efectiva para degradar el coágulo tanto desde su

superficie como desde su interior. Además, la aplicación local de Ret mediante catéteres, incluso para el tratamiento de oclusiones arteriales, podría ser interesante, ya que pese a tener una mayor contribución plaquetaria (y por tanto mayores niveles de PAI-1) también existe una mayor fuerza del flujo que favorecería la mayor penetración de la droga, lo cual produciría consecuentemente una disolución más rápida del coágulo, y además la interacción de la droga en el entramado del coágulo podría incluso protegerla del efecto inhibitorio. Como hemos indicado anteriormente, siguen siendo necesarios estudios que relacionen las interacciones de la droga inmersa en la malla de Fn y su posible efecto protector frente a los inhibidores.

Entendemos que el presente estudio podría ser una buena plataforma para ayudar a comparar datos históricos de otros trabajos y ensayos clínicos.

2. FORMACIÓN DE CONJUGADOS SA-PA Y COMPLEJOS RBC-PA.

El tratamiento trombotrófico utilizando directamente los PA actuales, como aquellos que se encuentran en fase de desarrollo clínico, sigue siendo impensable. A pesar de que estos PA incrementan sustancialmente el tiempo de vida media en circulación, continúa siendo insuficiente. Por otro lado, no ha sido posible eliminar o reducir convenientemente los efectos adversos tales como los procesos hemorrágicos. El tPA continúa siendo el fármaco de elección en muchas enfermedades oclusivas. Además, aquellos pacientes posquirúrgicos, no podrán recibir un tratamiento fibrinolítico debido a la disolución del coágulo hemostático taponante de la herida.

El diseño.

Nuestro grupo desarrolló un sistema de direccionamiento de este tipo de drogas asociadas a la superficie eritrocitaria, lo cual permitió crear un agente trombotrófico con una farmacocinética y un perfil de seguridad adecuados para una terapia trombotrófica por la disminución de los efectos adversos de los PA, y actuando selectivamente sobre los coágulos nacientes, preservando la integridad de los hemostáticos (fig. 6I). Dado que el sistema de generación clásico de estos complejos RBC-PA es largo y complicado, nos propusimos desarrollar un sistema mediante el cual la formación del RBC-PA pudiera realizarse en un solo paso y, si fuera posible, directamente

en circulación o en las propias bolsas de transfusión, requeridas en ciertos procesos quirúrgicos.

Los sistemas de direccionamiento mediante anticuerpos conjugados a los PA y que reconozcan los antígenos de la superficie eritrocitaria, se han utilizado en distintos modelos animales, sin embargo este sistema es muy limitado dado que no es posible aplicarlo con el mismo Ac en distintas especies (necesario para su validación y aprobación para su uso clínico). Dada la experiencia previa del grupo con el sistema biotina-SA decidimos seguir utilizándolo, recuperando la universalidad de la unión, pero para generar conjugados SA-PA que tras su inyección en el organismo reconocieran los RBC-biotinilados (RBCb), bien generados directamente en circulación o bien directamente en la bolsa de transfusión. La incorporación de los residuos de biotina (vitamina H) a la superficie eritrocitaria es un proceso que se ha utilizado en la clínica para los estudios eritrocinéticos en aquellos pacientes donde no se aconseje el uso de marcadores radioactivos, como el ^{51}Cr [282]. Nuestros primeros experimentos se centraron en comprobar la posibilidad de biotinilar directamente los eritrocitos en circulación y en el control de la misma. Otros laboratorios habían realizado biotinizaciones directas *in vivo* [221, 222]. No obstante, nuestro interés se centraba en el control de dicha modificación para conseguir RBCb perfectamente viables [189, 214, 258]. Observamos como modificaciones de los RBC directamente en circulación (1.3-5,2 mM) eran comparables a las realizadas *in vitro* para los RBCb₂₀₋₂₀₀ (fig. 5R). La modificación directa en sangre también es posible y por tanto, la formación de RBCb en las bolsas de transfusión es válida. Es importante resaltar que la modificación controlada de los RBC con biotina permite obtener eritrocitos biotinizados estables en circulación (RBCb₁₀₋₄₀), y que además la molécula conjugada a su superficie (en este caso la SA) permanece unida de forma estable al portador, por lo que la distribución de la marca radioactiva siempre permanece en la fracción celular de la sangre (figs. 6R a, b y c). Así, una modificación superior (RBCb₁₀₀) de los eritrocitos, genera RBC modificados que dejan de circular adecuadamente en sangre y aumentan su eliminación por parte del hígado y bazo (figs. 6R a, b, d y e). Estudios previos del grupo de investigación demostraron como valores similares de modificación estables (RBCb₂₀) eran capaces de mantener la SA o incluso una molécula unida posteriormente sobre la SA fijada (según el método clásico), como por ejemplo un anticuerpo en circulación [246]. Cantidades de modificación superiores (RBCb₇₀ o RBCb₂₀₀) eran capaces de terminar con la circulación de los RBC tras la hemólisis reactiva mediada por el sistema del complemento, aparte de la contribución de

los órganos del RES, hígado y bazo [258]. Si el grado de modificación de los eritrocitos por parte de la biotina era superior (del orden de los RBCb_{700}), la eliminación de los eritrocitos era mediada por el sistema de complemento, pero en lugar de hacerlo a través de la hemólisis reactiva, la contribución de este se centraba en la opsonización y la fagocitosis reactiva por parte del RES, proceso que podría ser utilizado en el direccionamiento de drogas a este sistema [258, 283]. Es interesante señalar que la modificación obtenida de RBC biotinilados y estables (RBCb_{10-40} μM *in vitro* o $\text{RBCb}_{1.3-2.6}$ mM *in vivo*) puede incorporar alrededor de 10^5 moléculas de SA o lo que es lo mismo de droga conjugada a esta SA en el caso de que la unión del PA a la SA sea equiparable a la molécula de SA libre. En el caso de conseguir estos niveles de PA por eritrocito, alcanzaríamos fácilmente cantidades terapéuticas de uso convencional y estaríamos hablando de dosis equiparables a las utilizadas en la clínica actual (cerca de 0,5 mg/kg de tPA) en una sola inyección y además con la circulación prolongada y constante del PA asociado al eritrocito.

La historia truncada de los conjugados SA-TNK.

Vistas estas posibilidades, decidimos generar conjugados 1:1 entre la SA y el PA mediante una unión directa y covalente. Para ello modificamos a ambos, la SA y el PA seleccionado, con reactivos que interaccionan covalentemente entre sí, el SATA[®] y el SMCC[®], los cuales establecen dicha unión covalente tras una activación controlable. Es interesante remarcar, que la incorporación de estos residuos a las moléculas de PA se realizan mediante los grupos NHS (los mismos que se usan para la modificación de la droga por biotina [184, 214, 245], o por los agentes fluoróforos usados en el apartado anterior fig 3Rc –panel interno-). Dicha unión no alteraba significativamente la actividad fibrinolítica del PA, siempre y cuando dicha modificación fuese inferior a 2 residuos por molécula de PA (figs. 8R c y d).

Por otro lado, era necesario analizar la SA, ya que hasta ahora la habíamos utilizado como molécula entrecruzante que reaccionaba de un modo cuasi covalente con la biotina. Controlamos en todo momento la modificación de la SA incorporando aproximadamente un residuo del agente modificante por molécula. Dicha modificación no alteraba el patrón electroforético de la SA, siendo este idéntico al de la molécula sin modificar (fig. 7R b), y sus propiedades de unión a la biotina eran muy similares a las de la SA original (fig. 7R a). De este modo, la modificación de la SA con el reactivo SMCC producía un ligero descenso en la unión (aunque significativa en términos relativos) en

comparación con la SA original o la SA_{SATA}. Si bien este descenso no era muy pronunciado, en una primera aproximación nuestra intención fue utilizar, siempre que fuese posible, la modificación de la SA con SATA. Por lo tanto, tratamos de conjugar la SA con TNK. Este PA fue el seleccionado en primer lugar debido a la resistencia mostrada frente al principal inhibidor de los PA, el PAI-1, puesto que esperábamos que el PA unido a la superficie del RBC circulase por tiempos suficientemente prolongados en el organismo, donde se encontraría expuesto constantemente al efecto de los inhibidores. En este sentido, comenzamos por modificar y tratar de conjugar la SA_{SATA} con la TNK_{SMCC}, aunque realmente era posible la incorporación a la molécula de TNK tanto de SMCC como de SATA. A pesar de ello, la migración electroforética de la molécula de TNK modificada con SMCC difería de la observada en la TNK nativa y la modificada con SATA. En el caso de la TNK_{SMCC} podíamos observar la aparición de diversas especies de tamaño superior que coincidían con especies multimoleculares de TNK (Fig. 8R a). Además, la formación de conjugados entre la SA_{SATA:SMCC}TNK ó la SA_{SMCC:SATA}TNK eran posibles (fig. 9R a y b). Hay que resaltar que dicha conjugación era altamente selectiva y controlable, ya que se producía entre los residuos de SATA y SMCC exclusivamente tras la activación del SATA en presencia de hidroxilamina. No obstante, la generación de conjugados tenía un resultado dispar. Así, en aquellos conjugados formados a partir de TNK_{SMCC} se producían especies de alto peso molecular con bandas bien definidas (fig. 9R a –calle 2-), mientras que en los formados a partir de TNK_{SATA} dichas especies multimoleculares no producían bandas claras (fig. 9R a –calle 1- y b –llave calles 4-6-). La generación de conjugados multimoleculares podrían comprometer la estabilidad del complejo RBCb_x/SA-PA, ya que facilitarían la generación de agregados eritrocitarios mediante la incorporación de un mismo conjugado multimérico unido a varios eritrocitos a la vez (fig. 4MM). Esta formación de conjugados químicos SA_{SMCC:SATA}TNK proporcionaba conjugados de PM de 45, 50 y 75, lo que sugería la formación de las especies bimoleculares 1:1 deseadas. Como señalamos anteriormente, la generación de estos conjugados tampoco concedía migraciones completamente limpias de estructuras multimoleculares, y aunque con menos claridad, el gel cromatográfico mostraba bandas difusas y que se encontrarían por encima de los 75 kDa (fig. 9R b, llave). Estos conjugados SA_{SMCC:SATA}TNK permitían la unión específica sobre los RBCb_x, proporcionando aproximadamente 15.000 moléculas de SA-TNK por cada RBCb₂₀. Dichos valores de unión eran muy lejanos en comparación con los obtenidos para la unión de SA a la superficie de RBCb₂₀ (aprox. 80.000 moléculas de SA por cada RBCb₂₀). Además, esta unión generaba unos complejos RBCb₂₀/SA-TNK que se

agregaban claramente en los ensayos de precipitación eritrocitaria (figs. 10R b), a diferencia de los RBCb₂₀/SA, los cuales no producían agregación. Dichos agregados se producirán probablemente por la existencia de las posibles especies multimoleculares de los conjugados SA_{SMCC-SATA}TNK (fig. 9R b –llave en calles 4:6-) formadas tras la interacción de un mismo conjugado con varios eritrocitos biotinilados. Este fenómeno podría explicar también la escasez de unión de los SA-TNK por cada RBCb₂₀, ya que un mismo conjugado multimérico (SA-TNK)_n ocuparía varios residuos de biotina, en un RBCb₂₀ o en distintos RBCb₂₀, y limitaría el acceso a otras moléculas. Dicha situación ya se había descrito anteriormente durante la formación de conjugados clásicos entre RBCb_x/SA/bIgG donde un exceso de biotinilación de la superficie eritrocitaria facilitaba la generación de uniones múltiples en la misma célula o entre distintos eritrocitos [246]. Con la intención de solucionar los problemas de agregación, tratamos de separar de los compuestos multimoleculares los conjugados bimoleculares SA-TNK. Para ello utilizamos una columna cromatográfica de exclusión en función del PM. Las distintas especies poseían PM múltiplos de 60 kDa (60 kDa de las proteínas originales, 120 kDa los conjugados bimoleculares, 180 kDa los trimoleculares, etcétera). Si bien las características técnicas de la columna de purificación predecían la posible separación, la cercanía de los distintos pesos moleculares no permitía el correcto aislamiento de los conjugados bimoleculares con un adecuado rendimiento. Así, los complejos formados con las distintas fracciones del eluido (fig. 11R a) formaban complejos con una menor agregación, aunque nunca obtuvimos la ausencia de la misma en los ensayos de precipitación de los RBCb₂₀/SA-TNK (fig. 11R b). Estos complejos, tanto con los conjugados purificados como con los sin purificar, mostraron una actividad fibrinolítica específica, cuya potencia disminuía considerablemente con los complejos generados con las especies purificadas (fig. 11R c). Estos resultados sugerían un menor número de moléculas de TNK unidas a la superficie. Además, en la purificación efectuada, nunca logramos rendimientos superiores al 3% ni conjugados que evitasen completamente la agregación eritrocitaria. La posibilidad de purificar los conjugados mediante cromatografía líquida alta presión (HPLC) no parece viable, debido a que la cercanía de los PM de las distintas especies no ofrecen una diferencia suficiente para asegurar el completo aislamiento de la especie bimolecular. Todo esto nos indujo a utilizar otro PA y generar conjugados que no presentasen especies multimoleculares de partida.

El PA elegido para facilitar la formación de conjugados bimoleculares con la SA fue la Ret. Dicho PA fue elegido por carecer de los dominios E, EGF y K1, lo que podría limitar

la formación de dichas especies multiméricas observadas para los conjugados formados con la TNK. La acción del complejo RBCb/SA-Ret debe ocurrir tras su incorporación al interior del coágulo, siguiendo el principio perseguido de la tromboprolifaxis (fig. 6I). A diferencia de la resistencia del TNK frente al PAI-1, anteriormente mostramos como la Ret era más sensible al efecto de éste inhibidor, lo cual limitaría su actividad tras circulaciones prolongadas. Sin embargo, la localización de los complejos en el interior de los coágulos podría producir también un efecto protector, por la interacción de la malla de Fn con el PA, frente a la actuación de los inhibidores sobre la droga. Este efecto protector lo sugieren los resultados obtenidos con la droga libre en el modelo de embolia pulmonar de ratón (fig. 4R b), donde la Ret muestra una mayor actividad que el resto de PA analizados pese a ser la droga más sensible a los inhibidores en coágulos de plasma (figs. 1R c y d). Por lo tanto, al incorporarse el eritrocito al coágulo durante su formación favorece que la droga portada reaccione de forma inmediata con el entramado de Fn en formación, lo que podría mantenerla protegida de la acción de los propios inhibidores.

La Ret mejora las características de los conjugados químicos SA-PA.

Al utilizar la Ret, pudimos observar que su modificación con SMCC generaba una molécula, Ret_{SMCC}, que no formaba especies multiméricas (fig. 8R b), a diferencia de lo que ocurría con la TNK_{SMCC}, lo que ofrecía la posibilidad añadida de conjugar dicha Ret_{SMCC} a la SA_{SATA}, especie más favorable en cuanto a su unión a eritrocitos biotinilados. Al igual que ocurría con la TNK_{SATA}, la generación de Ret_{SMCC} no alteraba su actividad fibrinolítica con modificaciones inferiores a 2 residuos por molécula (fig. 8R d). Los conjugados entre la Ret_{SMCC} y la SA_{SATA} se formaban también de forma específica y controlada tras la activación de SATA mediante la hidroxilamina (fig. 12R "NH₂OH +"). La migración electroforética de dichos conjugados (fig. 12R) mostraba la aparición de la banda esperada de 50 kDa en condiciones reductoras (1 Ret -39 kDa- + 1 SA -15 kDa-, fig. 12R recuadro rojo), aunque también mostró una banda entorno a 90 kDa que se correspondería con los conjugados trimoleculares (1 SA + 2 Ret, fig. 12R flecha). La solución del conjugado mostró una unión creciente y lineal con respecto al grado de biotinilación eritrocitaria (fig. 13R a). Es reseñable que dicha unión no produjo agregación entre las especies moderadas de biotinilación eritrocitaria, la cual parecía intuirse con modificaciones de RBCb₁₀₀ y se hacía patente en los RBCb₂₀₀ (figs. 13R b). Además, la unión creciente obtenida con los conjugados sobre los RBCb_x generaron unos complejos (RBCb_x/SA-Ret) que mostraron una actividad fibrinolítica *in vitro* paralela al grado de

modificación eritrocitaria (fig. 13R c). Es importante resaltar que pese a que la unión del conjugado al eritrocito es específica, y el grado de incorporación del conjugado por eritrocito podría ser elevado (aproximadamente 80.000 moléculas de conjugado por RBCb₁₀₀), modificaciones moderadas de los RBCb_x preferibles para su estabilidad en circulación ($x < 30 \mu\text{M}$) no permite alcanzar cantidades muy elevadas, por ejemplo 10.000 moléculas de conjugado por RBCb₂₀ (fig. 13R a). Además, el mantenimiento de la unión del conjugado sobre el RBCb_x *in vitro*, mostró que SA-Ret se desprendía fácilmente de la superficie eritrocitaria en cantidades cercanas al 50% de la unión inicial (fig. 13R d). Dicho desprendimiento tan elevado *in vitro*, sugiere su fácil liberación del eritrocito en el torrente circulatorio, donde se encontraría expuesto a las fuerzas del flujo, limitando aun más las dosis finales de la droga en circulación.

Debido a estos resultados nada concluyentes para el control de los RBCb/SA-PA, sugieren desechar este tipo de conjugados químicos y probar nuevas aproximaciones. Basándonos en la existencia de las proteínas de fusión, que combinan los Ac o scFv con distintos PA [78, 79, 185] y la SA con otras proteínas [230], nos propusimos diseñar una proteína de fusión entre la SA y el PA.

3. PROTEINAS DE FUSIÓN.

En las últimas décadas la obtención de proteínas recombinantes se ha convertido en una herramienta rutinaria. Así, junto con el desarrollo de la biotecnología, se han producido durante los últimos años nuevas proteínas de diseño que combinan las propiedades más relevantes de proteínas diferentes, lográndose resultados muy interesantes no solo en el campo tecnológico, sino también en la terapéutica.

Selección del PA: ¿Resistente a inhibidores o zimogénico?.

Como hemos visto en el apartado anterior, la imposibilidad de controlar los conjugados químicos entre el PA y la molécula de SA, nos ha llevado a desarrollar nuevas aproximaciones a través del campo de las proteínas de fusión. Por lo que generaremos unas proteínas que combinen, por un lado, las características de la droga fibrinolítica y, por otro, el agente de anclaje a la superficie eritrocitaria, con la intención de generar los agentes tromboprolifácticos RBC-PA directamente en sangre. Al igual que en el apartado anterior la selección del PA debería orientarse a la incorporación de un PA resistente a los inhibidores del PA presentes en el plasma, ya que su unión a los RBC portadores

incrementarían, considerablemente en el tiempo, su presencia en circulación. De hecho, en el caso del conjugado químico empezamos por generar conjugados con la molécula de TNK. En este apartado, utilizaremos el núcleo de un agente fibrinolítico de diseño que resista el efecto inhibitorio plasmático. De este modo, el grupo del Dr Muzykantov desarrolló distintas proteínas de fusión que combinaban la "scFv" del anticuerpo contra la glicoforina A de ratón (Ter119) con diferentes agentes fibrinolíticos, la mRK o la UK-T [79, 228]. La mRK es una variante de diseño del tPA de ratón que combina las propiedades de resistencia frente a PAI-1 de la TNK con la inespecificidad de la Ret por la Fn. Este hecho es importante ya que la unión de un PA con afinidad por la Fn podría aumentar la fijación a las zonas de coágulos estables y generar núcleos protrombóticos, efecto no perseguido en una acción tromboprolifáctica como la esperada. Así, durante la conjugación de tPA a la superficie eritrocitaria mediante el método clásico ya se había estudiado este fenómeno, viéndose que aquellos complejos RBC-tPA eran más propensos que los RBC-Ret a la retención sobre componentes presentes en el coágulo [259]. De esta manera, tanto la unión a las estructuras típicas del coágulo, como la unión de los propios portadores eritrocitarios sobre el endotelio, podría generar estructuras de naturaleza procoagulante, al retener de forma selectiva al complejo en circulación [189]. Por otro lado, la UK-T es una variante derivada de la UK de bajo peso molecular modificada para ser activable por trombina en lugar de por Pln. De esta forma, permitiría la circulación latente del núcleo fibrinolítico y por tanto invisible para sus inhibidores plasmáticos, hasta producirse su activación por la trombina mayoritariamente en el entorno protrombótico [77-79]. Ambas proteínas de fusión (Ter119-mRK y Ter119-UK-T) se unían selectivamente a las moléculas de GPA en los RBC de ratón y se mantenían en circulación asociadas al eritrocito portador durante un tiempo prolongado [79, 228], pero mientras la mRK perdía su actividad después de la primera hora de circulación (fig. 14R a), la UK-T mantenía intacta su capacidad tromboprolifáctica en los tiempos analizados (fig. 14R b). Estos resultados convertían a la UK-T en el agente de elección para la generación de las proteínas de fusión perseguidas en el presente trabajo.

La proteína de fusión con el núcleo de la Ter119 mantenía a la droga en circulación y permitía la formación de complejos RBC-PA estables en circulación. Estos estudios no podrían ser corroborados en otra plataforma animal, ya que Ter119 reconoce selectivamente la molécula de GPA de ratón. Con el fin de poder comprobar el efecto tromboprolifáctico en diversas especies y devolver la universalidad en la unión del método clásico, nos propusimos generar una nueva proteína de fusión entre la SA y la UK-T, la

cual nos permitirá la formación de complejos con RBC modificados, siendo la biotinylación de la superficie eritrocitaria un proceso independiente de la especie, el cual ha sido ampliamente estudiado por el grupo [214, 245, 246].

Diseño racional de la proteínas de fusión.

El primer paso en el que nos centramos fue en el diseño de la proteína de fusión, y para ello, escogimos las células de *Drosophila melanogaster* (véase Materiales y Métodos, apartado 7.2.2.3, fig. 3MM) como sistema de producción proteica, por la posibilidad de obtener altas cantidades de proteína, permitir la rápida y fácil selección de las células productoras (en comparación con otros sistemas de producción eucariotas) y facilitar el proceso de purificación de las proteínas generadas. En este sentido, el proceso de purificación se facilita puesto que éstas FP son liberadas al sobrenadante, evitando así procesos de desnaturalización y renaturalización de los enzimas con agentes caiotrópicos fuertes como el guanidinio clorhídrico o la urea (procesos necesarios cuando las proteínas a purificar se encuentran en cuerpos de inclusión).

Tras la transfección, selección e inducción celular demostramos la presencia de la proteína de fusión SA-UK-T mediante western blot en el medio celular (fig. 15R), pero también tras su purificación del medio a través de columnas de afinidad (figs. 16R a, b y c). Es importante resaltar que la migración electroforética de la SA-UK-T coincide con el peso molecular esperado (fig. 15R) tanto en condiciones pseudonativas, donde no se afecta la estructura cuaternaria de la FP (aproximadamente 190 kDa), como en condiciones desnaturalizantes, mostrando una banda hacia los 45 kDa (13 kDa de la SA y 35 kDa de la UK-T). Esto nos indica la formación de homotetrámeros de SA-UK-T del mismo modo que ocurre con la SA original. Esto es de suma importancia puesto que el bolsillo hidrofóbico de unión a la biotina en la SA se encuentra entre dos subunidades de la misma (véase PDB 2IZF). Además, ciertos mutantes en los que se desestabiliza el tetrámero disminuyen la afinidad por la biotina en comparación con la SA tetramérica, en varios órdenes de magnitud [217]. La tetramerización de la SA-UK-T sería ventajosa puesto que cabría esperar una mayor carga fibrinolítica unida a los RBCb, amplificando la dosis administrada y facilitando la obtención de dosis terapéuticas *in vivo*. Esto permitiría además reducir el número de RBC modificados y disminuir el grado de biotinylación. Como hemos visto, las dosis de drogas fibrinolíticas podrían ser incluso inferiores a las utilizadas en la clínica actual, como demostramos en nuestros experimentos con la Ret, donde la necesidad de administrar niveles entre 2-10 mg/kg en ratón [284] baja a niveles en torno

a los 0,5 mg/kg (fig. 4R a). Por otro lado, el aumento de la vida media de un fibrinolítico asociado al eritrocito, puede disminuir la cantidad de droga necesaria en circulación considerablemente, de hecho, trabajos previos demostraron que dosis del orden de 0,06 mg/kg [214] mantenían un efecto tromboprolifáctico adecuado y, por lo tanto, no sería necesario aplicar dosis comparables a las utilizadas en los tratamientos agudos (0,5-2 mg/kg). En este sentido, para alcanzar dosis del orden de los 0,04 mg/kg en el paciente podríamos realizar modificaciones leves de los eritrocitos en la propia bolsa de transfusión para posteriormente administrársela, generando los complejos RBCb-FP en una población muy limitada de eritrocitos y no directamente sobre todos los RBC circulantes (como ocurría en el caso de los Ter119-PA).

Mantenimiento de la unión del núcleo de SA.

La similitud del comportamiento tetramérico de la FP y la SA original era observada en el análisis de la estructura tetramérica por espectrometría de masas (figs. 17R a y b). Además, la capacidad de unión de la FP a proteínas biotiniladas fijadas a pocillo (figs. 18R a, b y c) apoyan la funcionalidad de la SA en la fusión. También, al analizar el núcleo fibrinolítico de la SA-UK-T, éste demuestra su capacidad de permanecer latente hasta su activación por la presencia de trombina (figs. 18R c-e). Esto es de vital importancia, dado que, por un lado, preserva la actividad de la droga con el tiempo (al circular protegido del efecto de sus inhibidores plasmáticos) y, por otro, preserva la consumición o el ataque de ciertas proteínas del sistema hemostático que pudieran ser dañadas debido a una continuada actividad del fibrinolítico en la circulación sanguínea (Fg, Plg, entre otras), como se había visto con anterioridad en otras FP que portaban PA activos en todo momento, las cuales consumían selectivamente las moléculas de Fg existentes en la circulación del ratón [77].

La proteína de fusión mantenía las características de unión y actividad para las que había sido diseñada, no obstante es su unión al eritrocito portador lo que determinaría su correcto diseño para la tromboprolifaxis. En consonancia con los resultados obtenidos sobre proteínas fijadas a pocillos, la SA-UK-T mostraba una unión específica y creciente de forma paralela al grado de biotinilación de la superficie eritrocitaria (fig. 19R a). Es importante resaltar, que la unión observada sobre los RBC modificados con el reactivo de biotina de brazo espaciador corto, era muy inferior a la observada sobre eritrocitos modificados con el de brazo espaciador más largo. La necesidad de incorporar brazos espaciadores entre el grupo NHS del reactivo y el residuo de biotina, es indispensable

para separar a la molécula de biotina de la superficie eritrocitaria, donde posiblemente sea el glicocalix eritrocitario el principal responsable de la limitación de la interacción biotina-SA. Incluso la propia molécula comercial de SA, no era capaz de unirse a la superficie de eritrocitos modificados con un reactivo de biotina sin brazo espaciador [222]. En el caso que nos ocupa, el gran tamaño de la FP (190 kDa) con respecto a la SA comercial (52 kDa) requiere de esa mayor extensión en la separación. Además, los propios núcleos de la UK-T en la fusión, podrían comprometer el acercamiento y la correcta interacción de la biotina, fijada en la superficie eritrocitaria, con el bolsillo hidrofóbico de la SA de la proteína de fusión, lo que se vería beneficiado con la introducción del brazo espaciador extra de la biotina (fig. 19R a). Estas observaciones también podrían explicar la relativa limitación de la unión de la SA-UK-T a los RBCb_x donde si comparáramos el número de moléculas de SA-UK-T unidas a la superficie de los RBCb₃₀ frente al número de moléculas de SA, podríamos ver como la SA-UK-T incorpora 12 veces menos moléculas a la superficie del portador. La unión de SA-UK-T sobre los RBCb₃₀, grado de biotilación más viable de los analizados previamente *in vivo* (figs. 6R a y b), asciende a 9.000 moléculas, cantidad que podría parecer algo limitada, sin embargo, hay que entenderla en función del número de núcleos fibrinolíticos (4 por cada molécula de proteína de fusión). Así, los niveles de agente fibrinolítico presentados por célula portadora estarían en torno a las 36.000 moléculas de UK-T, niveles similares a los obtenidos con la Ter119-UK-T, la cual demostró una gran eficacia tanto *in vitro* como en modelos de trombosis en ratones [79]. La unión de la proteína de fusión a la superficie eritrocitaria se mantenía estable durante las primeras 48 horas, conservando prácticamente el 95% de la unión inicial pasadas 24 horas y produciéndose un descenso significativo durante las siguientes 24 horas (fig. 19R b). Dicho desprendimiento de la superficie eritrocitaria podría ser un reflejo de esas limitaciones de unión mencionadas anteriormente que podrían alterar la estabilidad del complejo RBCb/SA-UK-T.

Potencial viabilidad de los complejos.

Estos resultados y nuestro interés en establecer la viabilidad de los complejos, nos llevó a modificar los eritrocitos con distintos grados de biotina entre los 10 y los 100 μ M. Todos ellos eran capaces de generar complejos RBCb_x/SA-UK-T sin presentar hemólisis reactiva tras su incubación con el suero sanguíneo (fig. 20R a). Esto sugiere la ausencia de puentes intracelulares mediados por la unión de la SA-UK-T a múltiples biotinas incorporadas sobre las proteínas de superficie del eritrocito, entre las que se encuentran

las proteínas controladoras del complemento (por ejemplo el factor de decaimiento acelerado "DAF" y CD59). Lo que se puso de manifiesto en la incorporación de moléculas de SA comercial sobre eritrocitos biotinilados con el reactivo NHS-LC-biotina, en el rango de 70-400 μM , donde se observaba que dichos eritrocitos sufrían una hemólisis reactiva en presencia de suero, pero no en presencia del suero inactivado por calor. Dicha hemólisis mediada por el complemento, parecía ser la resultante de la eliminación de estos eritrocitos una vez administrados *in vivo* [258]. Por todo ello, la inexistencia de dicha hemólisis reactiva apoya en cierta medida una potencial estabilidad de los complejos. Esta verificación era necesaria, ya que el incremento de la biotinilación eritrocitaria con la NHS-LC-LC-biotina produce una unión de SA-UK-T que llama la atención, puesto que no solo se alcanza un máximo a la concentración de 100 μM , sino que al aumentar el grado de biotinilación a 200 μM disminuye la incorporación de la SA-UK-T (fig. 19R a). Este hecho podría estar reflejando la generación de posibles puentes intracelulares entre diversas proteínas biotiniladas de la superficie del portador y una misma molécula de SA-UK-T. La formación de estos puentes entre las proteínas reguladoras del complemento lleva asociada la deposición de las moléculas de C3b en la superficie eritrocitaria modificada. La disminución en la incorporación de moléculas de FP con el aumento de la biotinilación, podría ser debido al fomento de dichas uniones múltiples, haciendo plausible la explicación de la disminución de residuos de FP sobre un mismo portador [246]. Además, independientemente del grado de modificación eritrocitaria empleado, no se produjo la agregación de los complejos (fig. 19R b), lo cual indica que al menos no existe una agregación de eritrocitos que pudiera estar mediada por múltiples enlaces de una misma molécula de fusión entre biotinas pertenecientes a distintos eritrocitos portadores.

Mantenimiento de la actividad fibrinolítica.

Al estudiar la actividad fibrinolítica *in vitro* de los complejos observamos como la unión creciente de la proteína de fusión a los RBCb_x conlleva una actividad fibrinolítica más rápida al portar un mayor número de moléculas asociadas (figs. 21R a y b). Cabe resaltar como los coágulos se lisan cuando los complejos $\text{RBCb}_x/\text{SA-UK-T}$ se incorporan durante la generación de los mismos, donde la trombina está continuamente presente para catalizar la polimerización de la Fn, pero también para activar al núcleo fibrinolítico (UK-T) latente. Sin embargo, al añadirlos sobre coágulos maduros su disolución es residual. Esto es debido a que la trombina existente en el medio de generación del

coágulo, indispensable para activar el núcleo fibrinolítico de la UK-T en la FP, está restringida al núcleo del mismo donde los RBCb/SA-UK-T no tienen acceso. Pero si el complejo es preactivado en presencia de trombina, antes de incorporarlo al ensayo fibrinolítico, también se produce la fibrinólisis completa de estos coágulos, pero al actuar desde el exterior el tiempo de lisis es muy superior (60 % de lisis a las 5 horas para los RBCb₃₀/SA-UK-T, fig. 21R b) al de los complejos incorporados en el interior del coágulo en formación (100% lisis antes de las 2 horas, fig. 21R a). Este comportamiento, convierte a la UK-T en el fibrinolítico de elección para la formación de los complejos, puesto que preserva el coágulo hemostático y demuestra actividad profiláctica en los coágulos de nueva formación (fig. 22R).

La circulación y actividad tromboproliférica de los RBCb/SA-UK-T.

Estos complejos no solo deben presentar actividad fibrinolítica *in vitro*, sino que también deben demostrar su viabilidad y actividad una vez inyectados. Basándonos en los resultados obtenidos (figs. 6R a y b) donde buscamos el grado de biotilación más alto que diese complejos RBCb/SA viables, decidimos comprobar la circulación de los conjugados RBCb₃₀/SA-UK-T. Debido a que los RBCb₁₀₀/SA-UK-T no mostraban ni hemólisis reactiva por complemento, ni agregación, y además poseían una unión algo superior a la mostrada por los RBCb₃₀, también los incluimos en la comparación. Así, mientras los RBCb₁₀₀ mostraron una circulación muy pobre, desapareciendo prácticamente durante los primeros 60 minutos, los RBCb₃₀ se mantenían de un modo estable en la circulación (fig. 23R). Sin embargo, aunque los RBCb₃₀/SA-UK-T mostraron una circulación muy estable a partir de los 30 minutos, se ponía de manifiesto una caída más pronunciada durante esos primeros minutos. Esto podía ser reflejo de la eliminación de aquellos eritrocitos que, durante el proceso de modificación y marcaje radioactivo, hubiesen quedado dañados, permaneciendo el resto en circulación de un modo prácticamente constante durante las primeras 3 horas y perdiendo tan sólo un 15% en las siguientes 5 horas. La proteína de fusión se mantiene paralela en cuanto a su circulación y biodistribución al portador eritrocitario, aunque su unión inicial cae sensiblemente una vez que comienza a circular, de este modo la presencia del portador en sangre ronda el 60% durante las primeras horas, mientras que la de la proteína conjugada se estabiliza en el 30% (figs. 24R a-d). Dicha caída pone de manifiesto dos tipos de unión, una muy estable correspondiente al 30% de proteína en circulación, y otra fácilmente desprendible de la superficie eritrocitaria (el otro 50% de diferencia circulatoria con el portador). Esta

idea podría correlacionarse con la pérdida *in vitro* de la unión entre las 24 y las 48 horas, donde cayó aproximadamente en un 35% (fig. 19R b). El rápido desprendimiento observado *in vivo* se pone de manifiesto con tanta celeridad debido a la fuerza de la circulación y los cambios de forma del eritrocito necesarios para atravesar los lechos capilares. No obstante el número de moléculas presentes en circulación sería suficiente para otorgar dosis de 0,075 mg/kg, lo que permitiría proteger al organismo de la formación de coágulos patológicos. De hecho, la extracción de sangre de los animales inyectados tras 8,5 horas de circulación, muestran como la carga fibrinolítica de los RBC en circulación es capaz de degradar espontáneamente los coágulos generados con dicha sangre (fig. 25R), demostrando que I) la droga se mantiene en todo momento en circulación, II) se encuentra suficientemente protegida de inactivación y III) se activa tras la contribución de la trombina endógena necesaria para generar el coágulo.

Explorando nuevas posibilidades. SA:SA-UK-T.

Con la intención de mejorar los resultados tan prometedores logrados con la SA-UK-T quisimos aumentar la carga fibrinolítica sobre los RBC, así como incrementar la estabilidad de la unión. Por tanto, nos propusimos disminuir el número de grupos UK-T en la proteína generada, eliminando de esta manera los grupos voluminosos de la proteína final. Esto debería repercutir produciendo un aumento de la estabilidad de la unión y posiblemente un aumento del número de moléculas de proteína unidas en la superficie del eritrocito biotinilado. Con este fin, desarrollamos la formación de tetrámeros mixtos entre la SA y la SA-UK-T. Para ello, cotransfectamos las células S2 con distintas relaciones molares de los plásmidos que contienen SA y SA-UK-T. En este sentido, el resultado era incierto, ya que no podíamos predecir la tetramerización quimérica entre la SA y la SA-UK-T, por lo que realizamos diferentes transfecciones, modulando la contribución de los distintos plásmidos. Con esta aproximación, obtuvimos finalmente una mezcla de distintas proteínas de fusión, que tras un estudio electroforético, mostraban diferentes pesos moleculares en función del número de residuos de SA (no fusionada a UK-T) incorporada de acuerdo con las predicciones teóricas. Es decir, generamos proteínas de fusión quiméricas que mostraban relaciones SA:SA-UK-T en el tetrámero iguales a 1:3, 2:2, 3:1 y 0:4 (figs. 26R a, b y 27R a). Si bien la presencia de 4:0 también la presuponemos no podemos demostrarla, puesto que utilizamos un Ac anti-UK para revelar el western blot y la purificación la realizamos por afinidad hacia un epítipo presente en la UK-T. En ningún caso se aisló únicamente la proteína de fusión cuya contribución fuese una sola especie,

por lo que para purificar las distintas especies de la mezcla, realizamos una elución controlada por gradientes de pH. De este modo pretendíamos separar a mayores pH aquellas proteínas con un menor número de epítopos reconocibles por la columna de purificación y viceversa. Sin embargo, el resultado fue el contrario, ya que purificamos (aunque nunca por completo) aquellas FP de menor número de residuos SA-UK-T a un pH menor. El compuesto final mayoritario fue el 2:2, y pese a demostrar una unión específica sobre proteína biotinilada fijada a pocillo, la unión de dicha quimera de la 2 SA:2 SA-UK-T no sobrepasaba las 1.700 moléculas de FP/RBCb₃₀₋₄₀. Estos resultados podrían explicarse por una tetramerización inadecuada, una purificación limitada de las especies, la cual produciría bloqueos en la unión de las FP preferidas frente al de otras FP de mayor voluminosidad, o simplemente, la incapacidad de los tetrámeros de reaccionar con la biotina de los eritrocitos.

mFP: un profármaco de unión universal con antídoto.

Debido a estos resultados adversos, decidimos diseñar una nueva proteína de fusión, que siguiera los principios de disminución del tamaño de la misma para evitar los posibles impedimentos estéricos y ganar en la estabilidad de la unión, pero sin dejarlo a la suerte de una tetramerización aleatoria. En este caso, nos propusimos realizar una FP que fusionase la UK-T con una SA monomérica.

Puesto que existe la posibilidad de producir variantes monoméricas de la SA mediante mutagénesis dirigida (sustituyendo tan sólo un aminoácido), nos propusimos comprobar la viabilidad de la molécula de fusión generada (mFP). Un aspecto importante de este tipo de variantes es, que la no tetramerización de los monómeros de SA ocasiona un descenso de la afinidad por la biotina ($K_d=10^{-14}$ M de la SA frente a $8,9 \times 10^{-9}$ M de la variante monomérica [219]). Dicha disminución de la afinidad, podría provocar una pérdida de la estabilidad de los complejos los cuales podrían desprenderse, especialmente en aquellas situaciones forzadas como el flujo sanguíneo. No obstante, la afinidad de la SA monomérica por la biotina se mantendría en niveles comparables a los de la unión de un Ac frente a su antígeno (cuyas K_d varían de 10^{-5} a 10^{-11} M [183]), siendo la K_d de la mayor parte de los Ac utilizados en clínica $<10^{-10}$ M. En este sentido, Ter119-UK-T proporcionaba una circulación estable asociada al eritrocito en el ratón [79]. Por lo tanto, si con la mFP conseguíamos niveles de unión similares a los de Ter119 esperaríamos lograr resultados comparables acordes con nuestro objetivo tromboprolifáctico.

La modificación de la SA radicaba en la mutación de la posición 117, donde sustituíamos un Asp por una Ala (apartado 7.2.2.2 de Materiales y Métodos). Así, la proteína de fusión purificada a partir del medio celular (D117A SA-UK-T o mFP), era una proteína que en su 97% presentaba un PM de 47 kDa coincidente con el núcleo monomérico de la SA-UK-T (fig. 28R b y c). Cabe destacar que la mFP era capaz de unirse con una gran eficiencia a la superficie eritrocitaria viéndose favorecida, al igual que ocurría con la SA-UK-T tetramérica, en el caso de la modificación eritrocitaria con la NHS-LC-LC-biotina, y no con la del brazo espaciador más corto (figs. 19R a y 29R a). De este modo, alcanzamos un máximo de 140.000 moléculas de mFP/RBCb₄₀, incluso los valores de unión sobre los RBCb₃₀ (80.000 moléculas de mFP) o RBCb₁₀ (50.000 moléculas) sobrepasaban a los máximos obtenidos con la SA-UK-T tetramérica, siendo esta una disposición de unión más favorable para el núcleo fibrinolítico y cuyos niveles eran muy similares a los de la unión de la propia SA comercial. En consonancia, estos complejos mostraban una mayor estabilidad de la unión *in vitro* con los RBCb₃₀, manteniéndose un 85% tras 72 horas de su formación (fig. 29R b), frente al 65% que mostraba la SA-UK-T a las 48 horas (fig. 19R b). Tampoco, los complejos RBCb₁₀₋₂₀₀/mFP mostraron agregación eritrocitaria (fig. 29R d), lo que sugería un complejo potencialmente estable en circulación. Como dijimos anteriormente, la utilización de una SA monomérica causaría una disminución de la afinidad del núcleo de SA por la biotina, lo cual pese a parecer una desventaja inicial se convierte en una característica beneficiosa, ya que la unión de la mFP al eritrocito podría ser revertida en presencia de la SA comercial, obteniendo un complejo con una duración controlable. De hecho, un 50% de la unión de mFP a los RBCb₃₀ se elimina en presencia de un exceso de SA (fig. 29R c). Por otro lado, la mFP también mantenía una actividad fibrinolítica latente, la cual era activada en presencia de trombina (fig. 30R a-e). Al igual que ocurría con la SA-UK-T libre, la capacidad fibrinolítica de la mFP es comparable a la de la molécula de tPA (fig. 30R b). Además, el desplazamiento efectivo inducido por la SA producía un descenso de su actividad fibrinolítica (fig. 30R e), generando un complejo trombotrófico para el que tendríamos un potencial antídoto en el momento en que su efecto no fuese necesario [220].

Los RBCb/mFP representan una nueva aproximación trombotrófica.

Los complejos generados demostraron tener una circulación muy estable para los RBCb₅ (figs. 31R y 32R a), los cuales eran capaces de unir 30.000 moléculas de mFP, cantidades comparables a las logradas con la Ter119-UK-T citada con anterioridad [79].

De nuevo, esta unión permitiría alcanzar dosis equiparables a 0,08 mg de tPA/kg. Dicha estabilidad circulatoria del portador, cae en un cierto grado durante los primeros minutos tras la inyección del complejo, probablemente debido a la eliminación de aquellos complejos más lábiles que no aguanten suficientemente el proceso de modificación y marcaje radiactivo eritrocitario, pero que una vez eliminados, se mantienen estables en la circulación durante el tiempo analizado (24 horas). Es importante remarcar que la mFP circula unida a su portador, el RBCb₅, y por tanto, la mFP del complejo presenta una farmacocinética paralela a la del eritrocito (fig. 32R a), mientras que la mFP libre se elimina rápidamente del torrente sanguíneo. Además, la distribución en sangre de la mFP libre se encontraba en la fracción plasmática, mientras que la mFP asociada a los RBCb₅ se encontraba en el sedimento celular, o lo que es lo mismo, unida a su portador (fig. 32R b). La distribución orgánica de la mFP conjugada al eritrocito se presenta fundamentalmente en la sangre, mientras que también puede aparecer en baja cantidad en el hígado y bazo (figs. 32R c y d). No obstante, la distribución de la mFP en estos órganos de eliminación, hígado (órgano detoxificador por excelencia) y bazo (principal órgano de eliminación de eritrocitos senescentes o dañados), se producía de forma paralela para ambas especies, portador y mFP (figs. 32R c y d). Y aunque es más importante durante la primera hora, los valores disminuyen con el tiempo. Estos resultados reflejan la eliminación inicial de los eritrocitos que no aguantaron la modificación o el marcaje radiactivo y cuyo metabolismo requiere un tiempo para que la marca radiactiva desaparezca de ellos. A la vista de estos datos, la mFP circula asociada a su portador de un modo estable y a pesar de la menor afinidad teórica entre la mFP y la biotina, es remarcable, que la circulación de la mFP conjugada y los eritrocitos portadores sea prácticamente idéntica durante las primeras 3 horas. A pesar de que estos niveles decaen ligeramente con el tiempo, la mFP sigue demostrando un perfil paralelo al del portador y tras 15 horas de circulación, aún mantiene un 25% de la carga inicial asociada a los eritrocitos. Estos niveles proporcionarían aún una dosis interesante en circulación, del orden de los 0,5 nmol/kg. De hecho, la dosis presente en circulación a las 20 horas es capaz de producir un efecto tromboprolifáctico similar al observado con la sangre extraída de los ratones tras 3 horas de circulación (fig. 33R), lo que convierte a esta mFP en una aproximación que suscita grandes expectativas en sus posibles aplicaciones.

Los experimentos realizados hasta el momento poseen un gran interés, y la proteína de fusión está siendo generada en el laboratorio con el fin de obtener cantidades suficientes para ampliar los experimentos *in vivo*, en los cuales establecer con mayor

precisión a) la duración de la droga en circulación durante tiempos más prolongados, b) el mantenimiento de la capacidad fibrinolítica tras su circulación y c) su capacidad trombotrófica en modelos tromboticos existentes en ratón, tanto a nivel arterial (generados en zonas de alto flujo sanguíneo como la arteria carótida) como venoso (generados en zonas de bajo flujo sanguíneo como la vena yugular).

Todos estos experimentos propuestos favorecerían la aproximación a la clínica, de este agente terapéutico tan prometedor, con el fin de desarrollar una terapia actualmente muy limitada y altamente necesaria.

CONCLUSIONES

El trabajo realizado en el presente estudio nos permite alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Los análisis presentados sobre los efectos fibrinolíticos de los PA de uso clínico o asociados a los eritrocitos, ponen de manifiesto la necesidad de cuidar muy bien las plataformas experimentales utilizadas. Así, el empleo de coágulos de composición poco controlable puede llevar a consideraciones erróneas en el comportamiento de diversas drogas.
2. Los resultados expuestos sobre los PA libres utilizados presentan a la Ret como la droga más eficiente para la degradación de coágulos en un modelo de embolia pulmonar, donde los trombos existentes tendrán una menor contribución de los inhibidores y la llegada de la droga será inmediata por ser el pulmón el primer órgano de paso. Además la Ret presenta una mayor capacidad de difusión al coágulo favoreciendo su eliminación tanto desde el exterior como desde su interior.
3. La conjugación de los PA a la superficie de los eritrocitos mantendría a la droga en circulación por tiempos prolongados, por tanto la droga más favorable para asociarla a los RBC sería aquella que mostrase una mayor resistencia a su inhibición. Los experimentos iniciales demuestran que la TNK es el PA más resistente a PAI-1, su principal inhibidor, por lo que sería la droga de elección.
4. Podemos formar conjugados covalentes bimoleculares entre la SA y los PA a través de los agentes bifuncionales SATA y SMCC. Modificaciones moderadas de las proteínas con estos agentes mantienen la capacidad de unión de SA y la actividad fibrinolítica de los PA. No obstante, la generación de los complejos finales con los eritrocitos no es controlable y obtenemos bajos rendimientos de producción y purificación que nos limitan para generar los complejos perseguidos.
5. La imposibilidad de generar conjugados químicos adecuados conlleva a diseñar proteínas de fusión que combinan los núcleos de la SA y el PA. Un diseño más específico del agente fibrinolítico descubre que un PA latente es más eficiente que uno que ofrezca cierta resistencia a los inhibidores, ya que mientras no esté activado no es sensible a dicho efecto inhibitorio y solo sería activo en el entorno trombótico.

6. Las SA-UK-T tetraméricas generan complejos RBCb/SA-UK-T fibrinolíticamente activos y relativamente estables en circulación. No obstante, estas proteínas de fusión demuestran un importante desprendimiento de la carga terapéutica lo que limitaría su potencial aplicación en clínica.
7. La SA-UK-T monomérica muestra una elevada afinidad y estabilidad en los complejos. Además, la reversibilidad de unión de la droga al portador hace que su actividad pueda eliminarse de forma controlada. lo que convierte a esta proteína en un sistema altamente prometedor para su uso tromboprolifático.

BIBLIOGRAFÍA

1. C Mathers, DM Fat, JT Boerma, World Health Organization.: **The global burden of disease : 2004 update**. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2008.
2. D Lloyd-Jones, R Adams, M Carnethon, G De Simone, TB Ferguson, K Flegal, E Ford, K Furie, A Go, K Greenlund, et al: **Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee**. *Circulation* 2009, **119**:e21-181.
3. D Lloyd-Jones, RJ Adams, TM Brown, M Carnethon, S Dai, G De Simone, TB Ferguson, E Ford, K Furie, C Gillespie, et al: **Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association**. *Circulation* 2010, **121**:948-54.
4. M Yepes, BD Roussel, C Ali, D Vivien: **Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic**. *Trends Neurosci* 2009, **32**:48-55.
5. MY Chan, F Andreotti, RC Becker: **Hypercoagulable states in cardiovascular disease**. *Circulation* 2008, **118**:2286-97.
6. B Dahlback: **Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders**. *Blood* 2008, **112**:19-27.
7. S Dawson, A Henney: **The status of PAI-1 as a risk factor for arterial and thrombotic disease: a review**. *Atherosclerosis* 1992, **95**:105-17.
8. DT Eitzman, RJ Westrick, Y Shen, PF Bodary, S Gu, SL Manning, SL Dobies, D Ginsburg: **Homozygosity for factor V Leiden leads to enhanced thrombosis and atherosclerosis in mice**. *Circulation* 2005, **111**:1822-5.
9. SZ Goldhaber: **Risk factors for venous thromboembolism**. *J Am Coll Cardiol* 2010, **56**:1-7.
10. A Torbicki, A Perrier, S Konstantinides, G Agnelli, N Galie, P Pruszczyk, F Bengel, AJ Brady, D Ferreira, U Janssens, et al: **Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC)**. *Eur Heart J* 2008, **29**:2276-315.
11. P Prandoni, F Bilora, A Marchiori, E Bernardi, F Petrobelli, AW Lensing, MH Prins, A Girolami: **An association between atherosclerosis and venous thrombosis**. *N Engl J Med* 2003, **348**:1435-41.
12. A Beemath, PD Stein, E Skaf, MR Al Sibae, I Alesh: **Risk of venous thromboembolism in patients hospitalized with heart failure**. *Am J Cardiol* 2006, **98**:793-5.
13. N Levitan, A Dowlati, SC Remick, HI Tahsildar, LD Sivinski, R Beyth, AA Rimm: **Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data**. *Medicine (Baltimore)* 1999, **78**:285-91.
14. F Lapostolle, V Surget, SW Borron, M Desmaizieres, D Sordelet, C Lapandry, M Cupa, F Adnet: **Severe pulmonary embolism associated with air travel**. *N Engl J Med* 2001, **345**:779-83.
15. SJ van Deventer, HR Buller, JW ten Cate, LA Aarden, CE Hack, A Sturk: **Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways**. *Blood* 1990, **76**:2520-6.
16. R Burkman, JJ Schlesselman, M Ziemann: **Safety concerns and health benefits associated with oral contraception**. *Am J Obstet Gynecol* 2004, **190**:S5-22.
17. K Nevasaari, M Heikkinen, PJ Taskinen: **Tamoxifen and thrombosis**. *Lancet* 1978, **2**:946-7.
18. A Leone: **Smoking, haemostatic factors, and cardiovascular risk**. *Curr Pharm Des* 2007, **13**:1661-7.
19. DB Petitti, J Wingerd, F Pellegrin, S Ramcharan: **Risk of vascular disease in women. Smoking, oral contraceptives, noncontraceptive estrogens, and other factors**. *JAMA* 1979, **242**:1150-4.
20. C Demers, JS Ginsberg: **Deep venous thrombosis and pulmonary embolism in pregnancy**. *Clin Chest Med* 1992, **13**:645-56.
21. JA Heit, MD Silverstein, DN Mohr, TM Petterson, CM Lohse, WM O'Fallon, LJ Melton, 3rd: **The epidemiology of venous thromboembolism in the community**. *Thromb Haemost* 2001, **86**:452-63.
22. VV Kakkar, S Sagar, M Lewis: **Treatment of deep-vein thrombosis with intermittent streptokinase and plasminogen infusion**. *Lancet* 1975, **2**:674-6.
23. LR Caplan: **Stroke thrombolysis: slow progress**. *Circulation* 2006, **114**:187-90.
24. M Selim: **Perioperative stroke**. *N Engl J Med* 2007, **356**:706-13.
25. AC Guyton, JE Hall: **Textbook of medical physiology**, 10th ed. edn. London: W. B. Saunders; 2000.
26. DL Kasper, TR Harrison: **Harrison's principles of internal medicine**, 16th edn. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.

27. L Medved, W Nieuwenhuizen: **Molecular mechanisms of initiation of fibrinolysis by fibrin.** *Thromb Haemost* 2003, **89**:409-19.
28. LA Norris: **Blood coagulation.** *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003, **17**:369-83.
29. T Astrup, PM Permin: **Fibrinolysis in the animal organism.** *Nature* 1947, **159**:681.
30. RG Macfarlane, J Pilling: **Fibrinolytic activity of normal urine.** *Nature* 1947, **159**:779.
31. JR Williams: **The fibrinolytic activity of urine.** *Br J Exp Pathol* 1951, **32**:530-7.
32. WR Bell: **The fibrinolytic system in neoplasia.** *Semin Thromb Hemost* 1996, **22**:459-78.
33. JP Melchor, S Strickland: **Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology.** *Thromb Haemost* 2005, **93**:655-60.
34. AP Fletcher: **Intrathecal fibrinolysis with streptokinase in tuberculous meningitis.** *J Clin Invest* 1954, **33**:69-76.
35. WS Tillett, RL Garner: **The Fibrinolytic Activity of Hemolytic Streptococci.** *J Exp Med* 1933, **58**:485-502.
36. CH Lack: **Staphylokinase; an activator of plasma protease.** *Nature* 1948, **161**:559.
37. C Hawkey: **Plasminogen activator in saliva of the vampire bat *Desmodus rotundus*.** *Nature* 1966, **211**:434-5.
38. NB Egen, FE Russell, DW Sammons, RC Humphreys, AL Guan, FS Markland, Jr.: **Isolation by preparative isoelectric focusing of a direct acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix* (southern copperhead).** *Toxicon* 1987, **25**:1189-98.
39. G Jones, M Ronk, F Mori, Z Zhang: **Disulfide structure of alfineprase: a recombinant analog of fibrolase.** *Protein Sci* 2001, **10**:1264-7.
40. D Collen, HR Lijnen: **The tissue-type plasminogen activator story.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**:1151-5.
41. EL Madison, JE Sambrook: **Probing structure-function relationships of tissue-type plasminogen activator by oligonucleotide-mediated site-specific mutagenesis.** *Methods Enzymol* 1993, **223**:249-71.
42. TK Nordt, C Bode: **Thrombolysis: newer thrombolytic agents and their role in clinical medicine.** *Heart* 2003, **89**:1358-62.
43. V Fuster, RW Alexander, RA O'Rourke, JWH Hurst: **Hurst's the heart**, 11th ed. / editors, Valentin Fuster, R. Wayne Alexander, Robert A. O'Rourke ; associate editors Robert Roberts ... [et al.]. edn. New York ; London: McGraw-Hill, Medical Publishing Division; 2004.
44. DC Rijken, HR Lijnen: **New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system.** *J Thromb Haemost* 2009, **7**:4-13.
45. RA Dwek: **Glycobiology: "towards understanding the function of sugars".** *Biochem Soc Trans* 1995, **23**:1-25.
46. DC Rijken, M Hoylaerts, D Collen: **Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator.** *J Biol Chem* 1982, **257**:2920-5.
47. K Tachias, EL Madison: **Converting tissue-type plasminogen activator into a zymogen.** *J Biol Chem* 1996, **271**:28749-52.
48. EL Madison, A Kobe, MJ Gething, JF Sambrook, EJ Goldsmith: **Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: a regulatory triad of Asp-His-Ser.** *Science* 1993, **262**:419-21.
49. DL Higgins, GA Vehar: **Interaction of one-chain and two-chain tissue plasminogen activator with intact and plasmin-degraded fibrin.** *Biochemistry* 1987, **26**:7786-91.
50. GR Larsen, K Henson, Y Blue: **Variants of human tissue-type plasminogen activator. Fibrin binding, fibrinolytic, and fibrinogenolytic characterization of genetic variants lacking the fibronectin finger-like and/or the epidermal growth factor domains.** *J Biol Chem* 1988, **263**:1023-9.
51. M Ranby, N Bergsdorf, T Nilsson: **Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator.** *Thromb Res* 1982, **27**:175-83.
52. R Fears: **Binding of plasminogen activators to fibrin: characterization and pharmacological consequences.** *Biochem J* 1989, **261**:313-24.
53. W Nieuwenhuizen: **Fibrin-mediated plasminogen activation.** *Ann N Y Acad Sci* 2001, **936**:237-46.
54. C Tran-Thang, EK Kruithof, F Bachmann: **The mechanism of in vitro clot lysis induced by vascular plasminogen activator.** *Blood* 1984, **63**:1331-7.
55. B Wiman, D Collen: **On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin.** *Eur J Biochem* 1978, **84**:573-8.
56. P Tanswell, E Seifried, PC Su, W Feuerer, DC Rijken: **Pharmacokinetics and systemic effects of tissue-type plasminogen activator in normal subjects.** *Clin Pharmacol Ther* 1989, **46**:155-62.

57. E Seifried, F Bock, P Tanswell, DC Rijken, C Kluft, H Heimpel: **[Recombinant tissue-type plasminogen activator: pharmacokinetics and effect on the hemostasis system of the human]**. *Klin Wochenschr* 1988, **66 Suppl 12**:40-9.
58. M Otter, MM Barrett-Bergshoeff, DC Rijken: **Binding of tissue-type plasminogen activator by the mannose receptor**. *J Biol Chem* 1991, **266**:13931-5.
59. DK Strickland, S Ranganathan: **Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling**. *J Thromb Haemost* 2003, **1**:1663-70.
60. NB Modi, S Eppler, J Breed, CP Cannon, E Braunwald, TW Love: **Pharmacokinetics of a slower clearing tissue plasminogen activator variant, TNK-tPA, in patients with acute myocardial infarction**. *Thromb Haemost* 1998, **79**:134-9.
61. J Llevadot, RP Giugliano, EM Antman: **Bolus fibrinolytic therapy in acute myocardial infarction**. *JAMA* 2001, **286**:442-9.
62. C Camani, F Bachmann, EK Kruihof: **The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the clearance of tissue-type plasminogen activator by rat hepatoma cells**. *J Biol Chem* 1994, **269**:5770-5.
63. PA Andreasen, L Sottrup-Jensen, L Kjoller, A Nykjaer, SK Moestrup, CM Petersen, J Gliemann: **Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes**. *FEBS Lett* 1994, **338**:239-45.
64. E Grau, LA Moroz: **Fibrinolytic activity of normal human blood monocytes**. *Thromb Res* 1989, **53**:145-62.
65. LI Larsson, L Skriver, LS Nielsen, J Grondahl-Hansen, P Kristensen, K Dano: **Distribution of urokinase-type plasminogen activator immunoreactivity in the mouse**. *J Cell Biol* 1984, **98**:894-903.
66. N Manchanda, BS Schwartz: **Lipopolysaccharide-induced modulation of human monocyte urokinase production and activity**. *J Immunol* 1990, **145**:4174-80.
67. L Camoin, R Pannell, F Anfosso, JP Lefevre, J Sampol, V Gurewich, F Dignat-George: **Evidence for the expression of urokinase-type plasminogen activator by human venous endothelial cells in vivo**. *Thromb Haemost* 1998, **80**:961-7.
68. VW van Hinsbergh, T Kooistra, EA van den Berg, HM Princen, W Fiers, JJ Emeis: **Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells in vitro and in rats in vivo**. *Blood* 1988, **72**:1467-73.
69. K Dano, PA Andreasen, J Grondahl-Hansen, P Kristensen, LS Nielsen, L Skriver: **Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer**. *Adv Cancer Res* 1985, **44**:139-266.
70. MJ Duffy: **The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy**. *Curr Pharm Des* 2004, **10**:39-49.
71. K Bdeir, JC Murciano, J Tomaszewski, L Koniaris, J Martinez, DB Cines, VR Muzykantov, AA Higazi: **Urokinase mediates fibrinolysis in the pulmonary microvasculature**. *Blood* 2000, **96**:1820-6.
72. K Bdeir, A Kuo, BS Sachais, AH Rux, Y Bdeir, A Mazar, AA Higazi, DB Cines: **The kringle stabilizes urokinase binding to the urokinase receptor**. *Blood* 2003, **102**:3600-8.
73. G Spraggon, C Phillips, UK Nowak, CP Ponting, D Saunders, CM Dobson, DI Stuart, EY Jones: **The crystal structure of the catalytic domain of human urokinase-type plasminogen activator**. *Structure* 1995, **3**:681-91.
74. AM Buko, EJ Kentzer, A Petros, G Menon, ER Zuiderweg, VK Sarin: **Characterization of a posttranslational fucosylation in the growth factor domain of urinary plasminogen activator**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:3992-6.
75. P Franco, C Iaccarino, F Chiaradonna, A Brandazza, C Iavarone, MR Mastronicola, ML Nolli, MP Stoppelli: **Phosphorylation of human pro-urokinase on Ser138/303 impairs its receptor-dependent ability to promote myelomonocytic adherence and motility**. *J Cell Biol* 1997, **137**:779-91.
76. WA Gunzler, GJ Steffens, F Otting, G Buse, L Flohe: **Structural relationship between human high and low molecular mass urokinase**. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1982, **363**:133-41.
77. BS Ding, N Hong, JC Murciano, K Ganguly, C Gottstein, M Christofidou-Solomidou, SM Albelda, AB Fisher, DB Cines, VR Muzykantov: **Prophylactic thrombolysis by thrombin-activated latent prourokinase targeted to PECAM-1 in the pulmonary vasculature**. *Blood* 2008, **111**:1999-2006.
78. WP Yang, J Goldstein, R Procyk, GR Matsueda, SY Shaw: **Design and evaluation of a thrombin-activable plasminogen activator**. *Biochemistry* 1994, **33**:p606-12.

79. S Zaitsev, D Spitzer, JC Murciano, BS Ding, S Tliba, MA Kowalska, OA Marcos-Contreras, A Kuo, V Stepanova, JP Atkinson, et al: **Sustained thromboprophylaxis mediated by an RBC-targeted pro-urokinase zymogen activated at the site of clot formation.** *Blood* 2010, **115**:5241-8.
80. A Ichinose, K Fujikawa, T Suyama: **The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin.** *J Biol Chem* 1986, **261**:3486-9.
81. MB Bernik: **Increased plasminogen activator (urokinase) in tissue culture after fibrin deposition.** *J Clin Invest* 1973, **52**:823-34.
82. V Gurewich, R Pannell: **Inactivation of single-chain urokinase (pro-urokinase) by thrombin and thrombin-like enzymes: relevance of the findings to the interpretation of fibrin-binding experiments.** *Blood* 1987, **69**:769-72.
83. EA Braat, M Levi, R Bos, F Haverkate, MR Lassen, MP de Maat, DC Rijken: **Inactivation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by thrombin in human subjects.** *J Lab Clin Med* 1999, **134**:161-7.
84. HR Lijnen, B Van Hoef, D Collen: **Activation with plasmin of two-chain urokinase-type plasminogen activator derived from single-chain urokinase-type plasminogen activator by treatment with thrombin.** *Eur J Biochem* 1987, **169**:359-64.
85. U Nauland, DC Rijken: **Activation of thrombin-inactivated single-chain urokinase-type plasminogen activator by dipeptidyl peptidase I (cathepsin C).** *Eur J Biochem* 1994, **223**:497-501.
86. M Schmitt, N Kanayama, A Henschen, A Hollrieder, R Hafter, D Gulba, F Janicke, H Graeff: **Elastase released from human granulocytes stimulated with N-formyl-chemotactic peptide prevents activation of tumor cell prourokinase (pro-uPA).** *FEBS Lett* 1989, **255**:83-8.
87. V Gurewich, R Pannell: **Recombinant human C1-inhibitor prevents non-specific proteolysis by mutant pro-urokinase during optimal fibrinolysis.** *Thromb Haemost* 2009, **102**:279-86.
88. R Pannell, V Gurewich: **Activation of plasminogen by single-chain urokinase or by two-chain urokinase--a demonstration that single-chain urokinase has a low catalytic activity (pro-urokinase).** *Blood* 1987, **69**:22-6.
89. HR Lijnen, B Van Hoef, F De Cock, D Collen: **The mechanism of plasminogen activation and fibrin dissolution by single chain urokinase-type plasminogen activator in a plasma milieu in vitro.** *Blood* 1989, **73**:1864-72.
90. V Gurewich, R Pannell, S Louie, P Kelley, RL Suddith, R Greenlee: **Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study in vitro and in two animal species.** *J Clin Invest* 1984, **73**:1731-9.
91. V Ellis, MF Scully, VV Kakkar: **Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation. A kinetic study.** *J Biol Chem* 1987, **262**:14998-5003.
92. JN Liu, W Tang, ZY Sun, W Kung, R Pannell, P Sarmientos, V Gurewich: **A site-directed mutagenesis of pro-urokinase which substantially reduces its intrinsic activity.** *Biochemistry* 1996, **35**:14070-6.
93. Z Sun, Y Jiang, Z Ma, H Wu, BF Liu, Y Xue, W Tang, Y Chen, C Li, D Zhu, et al: **Identification of a flexible loop region (297-313) of urokinase-type plasminogen activator, which helps determine its catalytic activity.** *J Biol Chem* 1997, **272**:23818-23.
94. Z Sun, BF Liu, Y Chen, V Gurewich, D Zhu, JN Liu: **Analysis of the forces which stabilize the active conformation of urokinase-type plasminogen activator.** *Biochemistry* 1998, **37**:2935-40.
95. JD Vassalli, D Baccino, D Belin: **A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase.** *J Cell Biol* 1985, **100**:86-92.
96. M Ploug, S Ostergaard, LB Hansen, A Holm, K Danø: **Photoaffinity labeling of the human receptor for urokinase-type plasminogen activator using a decapeptide antagonist. Evidence for a composite ligand-binding site and a short interdomain separation.** *Biochemistry* 1998, **37**:3612-22.
97. Y Suzuki, H Mogami, H Ihara, T Urano: **Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells.** *Blood* 2009, **113**:470-8.
98. H Myohanen, A Vaheri: **Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen.** *Cell Mol Life Sci* 2004, **61**:2840-58.
99. JA Aguirre-Ghiso, D Liu, A Mignatti, K Kovalski, L Ossowski: **Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**:863-79.
100. N Behrendt, ON Jensen, LH Engelholm, E Mortz, M Mann, K Danø: **A urokinase receptor-associated protein with specific collagen binding properties.** *J Biol Chem* 2000, **275**:1993-2002.

101. MZ Kounnas, J Henkin, WS Argraves, DK Strickland: **Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular uptake of pro-urokinase.** *J Biol Chem* 1993, **268**:21862-7.
102. AA Higazi, A Mazar, J Wang, R Reilly, J Henkin, D Kniss, D Cines: **Single-chain urokinase-type plasminogen activator bound to its receptor is relatively resistant to plasminogen activator inhibitor type 1.** *Blood* 1996, **87**:3545-9.
103. JW Sayer, C Gutteridge, D Syndercombe-Court, P Wilkinson, AD Timmis: **Circadian activity of the endogenous fibrinolytic system in stable coronary artery disease: effects of beta-adrenoreceptor blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors.** *J Am Coll Cardiol* 1998, **32**:1962-8.
104. P Chrusciel, A Goch, M Banach, DP Mikhailidis, J Rysz, JH Goch: **Circadian changes in the hemostatic system in healthy men and patients with cardiovascular diseases.** *Med Sci Monit* 2009, **15**:RA203-208.
105. F Andreotti, C Kluft: **Circadian variation of fibrinolytic activity in blood.** *Chronobiol Int* 1991, **8**:336-51.
106. G Dooijewaard, A de Boer, PN Turion, AF Cohen, DD Breimer, C Kluft: **Physical exercise induces enhancement of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) levels in plasma.** *Thromb Haemost* 1991, **65**:82-6.
107. WL Chandler, WC Levy, JR Stratton: **The circulatory regulation of TPA and UPA secretion, clearance, and inhibition during exercise and during the infusion of isoproterenol and phenylephrine.** *Circulation* 1995, **92**:2984-94.
108. B Wiman, G Mellbring, M Ranby: **Plasminogen activator release during venous stasis and exercise as determined by a new specific assay.** *Clin Chim Acta* 1983, **127**:279-88.
109. U Wall, S Jern, L Tengborn, C Jern: **Evidence of a local mechanism for desmopressin-induced tissue-type plasminogen activator release in human forearm.** *Blood* 1998, **91**:529-37.
110. KL Kaplan, T Mather, L DeMarco, S Solomon: **Effect of fibrin on endothelial cell production of prostacyclin and tissue plasminogen activator.** *Arteriosclerosis* 1989, **9**:43-9.
111. EG Levin, U Marzec, J Anderson, LA Harker: **Thrombin stimulates tissue plasminogen activator release from cultured human endothelial cells.** *J Clin Invest* 1984, **74**:1988-95.
112. VJ Marder, V Novokhatny: **Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential.** *J Thromb Haemost* 2010, **8**:433-44.
113. B Vastag: **Alfimeprase to succeed Genentech's alteplase?** *Nat Biotechnol* 2006, **24**:875-6.
114. MA Lucas, LJ Fretto, PA McKee: **The binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen.** *J Biol Chem* 1983, **258**:4249-56.
115. E Suenson, O Lutzen, S Thorsen: **Initial plasmin-degradation of fibrin as the basis of a positive feed-back mechanism in fibrinolysis.** *Eur J Biochem* 1984, **140**:513-22.
116. OF Wagner, C de Vries, C Hohmann, H Veerman, H Pannekoek: **Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA.** *J Clin Invest* 1989, **84**:647-55.
117. MP Bevilacqua, RR Schleaf, MA Gimbrone, Jr., DJ Loskutoff: **Regulation of the fibrinolytic system of cultured human vascular endothelium by interleukin 1.** *J Clin Invest* 1986, **78**:587-91.
118. M Colucci, JA Paramo, D Collen: **Generation in plasma of a fast-acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation.** *J Clin Invest* 1985, **75**:818-24.
119. D Ginsburg, R Zeheb, AY Yang, UM Rafferty, PA Andreasen, L Nielsen, K Dano, RV Lebo, TD Gelehrter: **cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells.** *J Clin Invest* 1986, **78**:1673-80.
120. EG Levin, DJ Loskutoff: **Regulation of plasminogen activator production by cultured endothelial cells.** *Ann N Y Acad Sci* 1982, **401**:184-94.
121. MS Sawdey, DJ Loskutoff: **Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta.** *J Clin Invest* 1991, **88**:1346-53.
122. KM Baeten, MC Richard, SM Kanse, NJ Mutch, JL Degen, NA Booth: **Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by platelet-associated plasminogen: a mechanism for stimulation of fibrinolysis by platelets.** *J Thromb Haemost* 2010, **8**:1313-22.
123. DE Vaughan, ME Mendelsohn, PJ Declerck, E Van Houtte, D Collen, J Loscalzo: **Characterization of the binding of human tissue-type plasminogen activator to platelets.** *J Biol Chem* 1989, **264**:15869-74.

124. EF Plow, D Collen: **The presence and release of alpha 2-antiplasmin from human platelets.** *Blood* 1981, **58**:1069-74.
125. JV Braaten, S Handt, WG Jerome, J Kirkpatrick, JC Lewis, RR Hantgan: **Regulation of fibrinolysis by platelet-released plasminogen activator inhibitor 1: light scattering and ultrastructural examination of lysis of a model platelet-fibrin thrombus.** *Blood* 1993, **81**:1290-9.
126. TJ Rabelink, HC de Boer, AJ van Zonneveld: **Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease.** *Nat Rev Nephrol* 2010, **6**:404-14.
127. **An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. The GUSTO investigators.** *N Engl J Med* 1993, **329**:673-82.
128. SZ Goldhaber, G Agnelli, MN Levine: **Reduced dose bolus alteplase vs conventional alteplase infusion for pulmonary embolism thrombolysis. An international multicenter randomized trial. The Bolus Alteplase Pulmonary Embolism Group.** *Chest* 1994, **106**:718-24.
129. K Ouriel, CK Shortell, JA DeWeese, RM Green, CW Francis, MV Azodo, OH Gutierrez, JV Manzione, C Cox, VJ Marder: **A comparison of thrombolytic therapy with operative revascularization in the initial treatment of acute peripheral arterial ischemia.** *J Vasc Surg* 1994, **19**:1021-30.
130. JM Wardlaw, CP Warlow, C Counsell: **Systematic review of evidence on thrombolytic therapy for acute ischaemic stroke.** *Lancet* 1997, **350**:607-14.
131. GJ del Zoppo, RT Higashida, AJ Furlan, MS Pessin, HA Rowley, M Gent: **PROACT: a phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. PROACT Investigators. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism.** *Stroke* 1998, **29**:4-11.
132. YF Wang, SE Tsirka, S Strickland, PE Stieg, SG Soriano, SA Lipton: **Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice.** *Nat Med* 1998, **4**:228-31.
133. D Collen, EJ Topol, AJ Tiefenbrunn, HK Gold, ML Weisfeldt, BE Sobel, RC Leinbach, JA Brinker, PA Ludbrook, I Yasuda, et al: **Coronary thrombolysis with recombinant human tissue-type plasminogen activator: a prospective, randomized, placebo-controlled trial.** *Circulation* 1984, **70**:1012-7.
134. AK Rao, C Pratt, A Berke, A Jaffe, I Ockene, TL Schreiber, WR Bell, G Knatterud, TL Robertson, ML Terrin: **Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial--phase I: hemorrhagic manifestations and changes in plasma fibrinogen and the fibrinolytic system in patients treated with recombinant tissue plasminogen activator and streptokinase.** *J Am Coll Cardiol* 1988, **11**:1-11.
135. A Haj-Yehia, T Nassar, BS Sachais, A Kuo, K Bdeir, AB Al-Mehdi, A Mazar, DB Cines, AA Higazi: **Urokinase-derived peptides regulate vascular smooth muscle contraction in vitro and in vivo.** *FASEB J* 2000, **14**:1411-22.
136. T Nassar, S Akkawi, A Shina, A Haj-Yehia, K Bdeir, M Tarshis, SN Heyman, AA Higazi: **In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone.** *Blood* 2004, **103**:897-902.
137. CA Molina, J Montaner, JF Arenillas, M Ribo, M Rubiera, J Alvarez-Sabin: **Differential pattern of tissue plasminogen activator-induced proximal middle cerebral artery recanalization among stroke subtypes.** *Stroke* 2004, **35**:486-90.
138. **Randomised double-blind trial of recombinant pro-urokinase against streptokinase in acute myocardial infarction. PRIMI Trial Study Group.** *Lancet* 1989, **1**:863-8.
139. FW Bar, J Meyer, F Vermeer, R Michels, B Charbonnier, K Haerten, M Spiecker, C Macaya, M Hanssen, M Heras, et al: **Comparison of saruplase and alteplase in acute myocardial infarction. SESAM Study Group. The Study in Europe with Saruplase and Alteplase in Myocardial Infarction.** *Am J Cardiol* 1997, **79**:727-32.
140. AJ Furlan, A Abou-Chebl: **The role of recombinant pro-urokinase (r-pro-UK) and intra-arterial thrombolysis in acute ischaemic stroke: the PROACT trials. Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism.** *Curr Med Res Opin* 2002, **18 Suppl 2**:s44-7.
141. WR Bell, TL Simon, JM Stengle, S Sherry: **The urokinase-streptokinase pulmonary embolism trial (phase II) results.** *Circulation* 1974, **50**:1070-1.
142. IP Gladysheva, RB Turner, IY Sazonova, L Liu, GL Reed: **Coevolutionary patterns in plasminogen activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:9168-72.
143. RC Wohl, L Summaria, L Arzadon, KC Robbins: **Steady state kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen.** *J Biol Chem* 1978, **253**:1402-7.

144. AG Ojalvo, L Pozo, V Labarta, I Torrens: **Prevalence of circulating antibodies against a streptokinase C-terminal peptide in normal blood donors.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **263**:454-9.
145. SL Gonias, M Einarsson, SV Pizzo: **Catabolic pathways for streptokinase, plasmin, and streptokinase activator complex in mice. In vivo reaction of plasminogen activator with alpha 2-macroglobulin.** *J Clin Invest* 1982, **70**:412-23.
146. F Van De Werf, J Adgey, D Ardissino, PW Armstrong, P Aylward, G Barbash, A Betriu, AS Binbrek, R Califf, R Diaz, et al: **Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double-blind randomised trial.** *Lancet* 1999, **354**:716-22.
147. **A comparison of continuous infusion of alteplase with double-bolus administration for acute myocardial infarction. The Continuous Infusion versus Double-Bolus Administration of Alteplase (COBALT) Investigators.** *N Engl J Med* 1997, **337**:1124-30.
148. WM Clark, S Wissman, GW Albers, JH Jhamandas, KP Madden, S Hamilton: **Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: a randomized controlled trial. Alteplase Thrombolysis for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke.** *JAMA* 1999, **282**:2019-26.
149. W Hacke, M Kaste, C Fieschi, D Toni, E Lesaffre, R von Kummer, G Boysen, E Bluhmki, G Hoxter, MH Mahagne, et al: **Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS).** *JAMA* 1995, **274**:1017-25.
150. B Magnani: **Plasminogen Activator Italian Multicenter Study (PAIMS): comparison of intravenous recombinant single-chain human tissue-type plasminogen activator (rt-PA) with intravenous streptokinase in acute myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 1989, **13**:19-26.
151. **Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group.** *N Engl J Med* 1995, **333**:1581-7.
152. ZL Chen, S Strickland: **Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin.** *Cell* 1997, **91**:917-25.
153. DA Morrow, EM Antman, A Sayah, KC Schuhwerk, RP Giugliano, JA deLemos, M Waller, SA Cohen, DG Rosenberg, SS Cutler, et al: **Evaluation of the time saved by prehospital initiation of reteplase for ST-elevation myocardial infarction: results of The Early Reteplase-Thrombolysis in Myocardial Infarction (ER-TIMI) 19 trial.** *J Am Coll Cardiol* 2002, **40**:71-7.
154. L Davydov, JW Cheng: **Tenecteplase: a review.** *Clin Ther* 2001, **23**:982-97; discussion 981.
155. D Simpson, MA Siddiqui, LJ Scott, DE Hilleman: **Reteplase: a review of its use in the management of thrombotic occlusive disorders.** *Am J Cardiovasc Drugs* 2006, **6**:265-85.
156. C Longstaff, S Williams, C Thelwell: **Fibrin binding and the regulation of plasminogen activators during thrombolytic therapy.** *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008, **6**:212-23.
157. AH Guimaraes, MM Barrett-Bergshoeff, M Criscuoli, S Evangelista, DC Rijken: **Fibrinolytic efficacy of Amediplase, Tenecteplase and scu-PA in different external plasma clot lysis models: sensitivity to the inhibitory action of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI).** *Thromb Haemost* 2006, **96**:325-30.
158. DC Rijken, MM Barrett-Bergshoeff, AF Jie, M Criscuoli, DV Sakharov: **Clot penetration and fibrin binding of amediplate, a chimeric plasminogen activator (K2 tu-PA).** *Thromb Haemost* 2004, **91**:52-60.
159. R Fears: **Development of anisoylated plasminogen-streptokinase activator complex from the acyl enzyme concept.** *Semin Thromb Hemost* 1989, **15**:129-39.
160. J Kratzschmar, B Haendler, G Langer, W Boidol, P Bringmann, A Alagon, P Donner, WD Schleuning: **The plasminogen activator family from the salivary gland of the vampire bat *Desmodus rotundus*: cloning and expression.** *Gene* 1991, **105**:229-37.
161. WD Schleuning, A Alagon, W Boidol, P Bringmann, T Petri, J Kratzschmar, B Haendler, G Langer, B Baldus, W Witt, et al: **Plasminogen activators from the saliva of *Desmodus rotundus* (common vampire bat): unique fibrin specificity.** *Ann N Y Acad Sci* 1992, **667**:395-403.
162. GT Liberatore, A Samson, C Bladin, WD Schleuning, RL Medcalf: **Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration.** *Stroke* 2003, **34**:537-43.
163. JP Lopez-Atalaya, BD Roussel, C Ali, E Maubert, KU Petersen, V Berezowski, R Cecchelli, C Orset, D Vivien: **Recombinant *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator crosses the blood-brain barrier through a low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects.** *Stroke* 2007, **38**:1036-43.

164. JP Lopez-Atalaya, BD Roussel, D Levrat, J Parcq, O Nicole, Y Hommet, K Benchenane, H Castel, J Leprince, D To Van, et al: **Toward safer thrombolytic agents in stroke: molecular requirements for NMDA receptor-mediated neurotoxicity.** *J Cereb Blood Flow Metab* 2008, **28**:1212-21.
165. C Reddrop, RX Moldrich, PM Beart, M Farso, GT Liberatore, DW Howells, KU Petersen, WD Schleuning, RL Medcalf: **Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase) inhibits tissue-type plasminogen activator-induced potentiation of excitotoxic injury.** *Stroke* 2005, **36**:1241-6.
166. AJ Furlan, D Eydin, GW Albers, Y Al-Rawi, KR Lees, HA Rowley, C Sachara, M Soehngen, S Warach, W Hacke: **Dose Escalation of Desmoteplase for Acute Ischemic Stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset.** *Stroke* 2006, **37**:1227-31.
167. NK Mishra, GW Albers, SM Davis, GA Donnan, AJ Furlan, W Hacke, KR Lees: **Mismatch-based delayed thrombolysis: a meta-analysis.** *Stroke* 2010, **41**:e25-33.
168. U Kohnert, R Rudolph, JH Verheijen, EJ Weening-Verhoeff, A Stern, U Opitz, U Martin, H Lill, H Prinz, M Lechner, et al: **Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t-PA deletion variant BM 06.022.** *Protein Eng* 1992, **5**:93-100.
169. WD Weaver: **Results of the RAPID 1 and RAPID 2 thrombolytic trials in acute myocardial infarction.** *Eur Heart J* 1996, **17 Suppl E**:14-20.
170. **A comparison of reteplase with alteplase for acute myocardial infarction. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO III) Investigators.** *N Engl J Med* 1997, **337**:1118-23.
171. EM Antman, CM Gibson, JA de Lemos, RP Giugliano, CH McCabe, P Coussement, I Menown, CA Nienaber, TC Rehders, MJ Frey, et al: **Combination reperfusion therapy with abciximab and reduced dose reteplase: results from TIMI 14. The Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 14 Investigators.** *Eur Heart J* 2000, **21**:1944-53.
172. BK Nallamothu, ER Bates, JS Hochman, CB Granger, V Guetta, RG Wilcox, HD White, PW Armstrong, S Savonitto, G Jia, et al: **Prognostic implication of activated partial thromboplastin time after reteplase or half-dose reteplase plus abciximab: results from the GUSTO-V trial.** *Eur Heart J* 2005, **26**:1506-12.
173. **Trial of abciximab with and without low-dose reteplase for acute myocardial infarction. Strategies for Patency Enhancement in the Emergency Department (SPEED) Group.** *Circulation* 2000, **101**:2788-94.
174. **Randomised, double-blind comparison of reteplase double-bolus administration with streptokinase in acute myocardial infarction (INJECT): trial to investigate equivalence. International Joint Efficacy Comparison of Thrombolytics.** *Lancet* 1995, **346**:329-36.
175. K Ouriel, F Castaneda, T McNamara, J Swischuk, G Tepe, JJ Smith, J Clark, S Duda: **Reteplase monotherapy and reteplase/abciximab combination therapy in peripheral arterial occlusive disease: results from the RELAX trial.** *J Vasc Interv Radiol* 2004, **15**:229-38.
176. RM Sugg, EA Noser, HM Shaltoni, NR Gonzales, MS Campbell, R Weir, ED Cacayorin, JC Grotta: **Intra-arterial reteplase compared to urokinase for thrombolytic recanalization in acute ischemic stroke.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2006, **27**:769-73.
177. BA Keyt, NF Paoni, CJ Refino, L Berleau, H Nguyen, A Chow, J Lai, L Pena, C Pater, J Ogez, et al: **A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:3670-4.
178. CP Cannon, CM Gibson, CH McCabe, AA Adgey, MJ Schweiger, RF Sequeira, G Grollier, RP Giugliano, M Frey, HS Mueller, et al: **TNK-tissue plasminogen activator compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: results of the TIMI 10B trial. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10B Investigators.** *Circulation* 1998, **98**:2805-14.
179. PK Gupta, CT Hung: **Albumin microspheres. II: Applications in drug delivery.** *J Microencapsul* 1989, **6**:463-72.
180. KK Jain: **Drug delivery systems - an overview.** *Methods Mol Biol* 2008, **437**:1-50.
181. BS Ding, T Dziubla, VV Shuvaev, S Muro, VR Muzykantov: **Advanced drug delivery systems that target the vascular endothelium.** *Mol Interv* 2006, **6**:98-112.
182. BY Kim, JT Rutka, WC Chan: **Nanomedicine.** *N Engl J Med* 2010, **363**:2434-43.
183. S Dübel: **Handbook of therapeutic antibodies.** Weinheim: Wiley-VCH ; [Chichester : John Wiley, distributor]; 2007.
184. S Zaitsev, K Danielyan, JC Murciano, K Ganguly, T Krasik, RP Taylor, S Pincus, S Jones, DB Cines, VR Muzykantov: **Human complement receptor type 1-directed loading of tissue plasminogen activator on circulating erythrocytes for prophylactic fibrinolysis.** *Blood* 2006, **108**:1895-902.

185. BS Ding, C Gottstein, A Grunow, A Kuo, K Ganguly, SM Albelda, DB Cines, VR Muzykantov: **Endothelial targeting of a recombinant construct fusing a PECAM-1 single-chain variable antibody fragment (scFv) with prourokinase facilitates prophylactic thrombolysis in the pulmonary vasculature.** *Blood* 2005, **106**:4191-8.
186. J Krauss, MA Arndt, S Dubel, SM Rybak: **Antibody-targeted RNase fusion proteins (immunoRNases) for cancer therapy.** *Curr Pharm Biotechnol* 2008, **9**:231-4.
187. JY Li, K Sugimura, RJ Boado, HJ Lee, C Zhang, S Duebel, WM Pardridge: **Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein.** *Protein Eng* 1999, **12**:787-96.
188. A Kader, PJ Davis, M Kara, H Liu: **Drug targeting using low density lipoprotein (LDL): physicochemical factors affecting drug loading into LDL particles.** *J Control Release* 1998, **55**:231-43.
189. JC Murciano, AA Higazi, DB Cines, VR Muzykantov: **Soluble urokinase receptor conjugated to carrier red blood cells binds latent pro-urokinase and alters its functional profile.** *J Control Release* 2009, **139**:190-6.
190. A Talavera Díaz (ed.). **Terapia génica**; 2004.
191. V Saini, VP Zharov, CS Brazel, DE Nikles, DT Johnson, M Everts: **Combination of viral biology and nanotechnology: new applications in nanomedicine.** *Nanomedicine* 2006, **2**:200-6.
192. F Pierige, S Serafini, L Rossi, M Magnani: **Cell-based drug delivery.** *Adv Drug Deliv Rev* 2008, **60**:286-95.
193. M Hamidi, H Tajerzadeh: **Carrier erythrocytes: an overview.** *Drug Deliv* 2003, **10**:9-20.
194. M Hamidi, A Zarrin, M Foroozesh, S Mohammadi-Samani: **Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals.** *J Control Release* 2007, **118**:145-60.
195. CG Millan, ML Marinero, AZ Castaneda, JM Lanao: **Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers.** *J Control Release* 2004, **95**:27-49.
196. VR Muzykantov: **Drug delivery by red blood cells: vascular carriers designed by mother nature.** *Expert Opin Drug Deliv* 2010, **7**:403-27.
197. PD Patel, N Dand, RS Hirlekar, VJ Kadam: **Drug loaded erythrocytes: as novel drug delivery system.** *Curr Pharm Des* 2008, **14**:63-70.
198. SR Goodman, A Kurdia, L Ammann, D Kakhniashvili, O Daescu: **The human red blood cell proteome and interactome.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2007, **232**:1391-408.
199. EM Pasini, M Kirkegaard, P Mortensen, HU Lutz, AW Thomas, M Mann: **In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells.** *Blood* 2006, **108**:791-801.
200. N Doshi, AS Zahr, S Bhaskar, J Lahann, S Mitragotri: **Red blood cell-mimicking synthetic biomaterial particles.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:21495-9.
201. TJ Merkel, SW Jones, KP Herlihy, FR Kersey, AR Shields, M Napier, JC Luft, H Wu, WC Zamboni, AZ Wang, et al: **Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:586-91.
202. E Beutler, GL Dale, DE Guinto, W Kuhl: **Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: preliminary clinical trial of a new enzyme preparation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:4620-3.
203. GM Ihler, RH Glew, FW Schnure: **Enzyme loading of erythrocytes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973, **70**:2663-6.
204. WE Lynch, GP Sartiano, A Ghaffar: **Erythrocytes as carriers of chemotherapeutic agents for targeting the reticuloendothelial system.** *Am J Hematol* 1980, **9**:249-59.
205. PR Mishra, NK Jain: **Biotinylated methotrexate loaded erythrocytes for enhanced liver uptake. 'A study on the rat'.** *Int J Pharm* 2002, **231**:145-53.
206. M Tonetti, C Polvani, E Zocchi, L Guida, U Benatti, P Biassoni, F Romei, A Guglielmi, C Aschele, A Sobrero, et al: **Liver targeting of autologous erythrocytes loaded with doxorubicin.** *Eur J Cancer* 1991, **27**:947-8.
207. N Talwar, NK Jain: **Erythrocyte based delivery system of primaquine: in vitro characterization.** *J Microencapsul* 1992, **9**:357-64.
208. HG Eichler, H Rameis, K Bauer, A Korn, S Bacher, S Gasic: **Survival of gentamicin-loaded carrier erythrocytes in healthy human volunteers.** *Eur J Clin Invest* 1986, **16**:39-42.
209. M Magnani, M Bianchi, L Rossi, V Stocchi: **Human red blood cells as bioreactors for the release of 2',3'-dideoxycytidine, an inhibitor of HIV infectivity.** *Biochem Biophys Res Commun* 1989, **164**:446-52.

210. K Hayashi, K Ono, H Suzuki, M Sawada, M Moriya, W Sakamoto, T Yogo: **Electrosprayed Synthesis of Red-Blood-Cell-Like Particles with Dual Modality for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging.** *Small* 2010.
211. L Rossi, S Serafini, L Cenerini, F Picardi, L Bigi, I Panzani, M Magnani: **Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Biotechnol Appl Biochem* 2001, **33**:85-9.
212. H Tajerzadeh, M Hamidi: **Evaluation of hypotonic preswelling method for encapsulation of enalaprilat in intact human erythrocytes.** *Drug Dev Ind Pharm* 2000, **26**:1247-57.
213. M Hamidi, H Tajerzadeh, AR Dehpour, S Ejtemaee-Mehr: **Inhibition of serum angiotensin-converting enzyme in rabbits after intravenous administration of enalaprilat-loaded intact erythrocytes.** *J Pharm Pharmacol* 2001, **53**:1281-6.
214. JC Murciano, S Medinilla, D Eslin, E Atochina, DB Cines, VR Muzykantov: **Prophylactic fibrinolysis through selective dissolution of nascent clots by tPA-carrying erythrocytes.** *Nat Biotechnol* 2003, **21**:891-6.
215. PR Moreno, KR Purushothaman, E Zias, J Sanz, V Fuster: **Neovascularization in human atherosclerosis.** *Curr Mol Med* 2006, **6**:457-77.
216. T Kitao, K Hattori, M Takeshita: **Agglutination of leukemic cells and daunomycin entrapped erythrocytes with lectin in vitro and in vivo.** *Experientia* 1978, **34**:94-5.
217. OH Laitinen, VP Hytonen, HR Nordlund, MS Kulomaa: **Genetically engineered avidins and streptavidins.** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**:2992-3017.
218. M Howarth, DJ Chinnapan, K Gerrow, PC Dorresteijn, MR Grandy, NL Kelleher, A El-Husseini, AY Ting: **A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site.** *Nat Methods* 2006, **3**:267-73.
219. MH Qureshi, JC Yeung, SC Wu, SL Wong: **Development and characterization of a series of soluble tetrameric and monomeric streptavidin muteins with differential biotin binding affinities.** *J Biol Chem* 2001, **276**:46422-8.
220. SC Wu, SL Wong: **Engineering soluble monomeric streptavidin with reversible biotin binding capability.** *J Biol Chem* 2005, **280**:23225-31.
221. G Hoffmann-Fezer, J Mysliwicz, W Mortlbauer, HJ Zeitler, E Eberle, U Honle, S Thierfelder: **Biotin labeling as an alternative nonradioactive approach to determination of red cell survival.** *Ann Hematol* 1993, **67**:81-7.
222. G Hoffmann-Fezer, H Maschke, HJ Zeitler, P Gais, W Heger, J Ellwart, S Thierfelder: **Direct in vivo biotinylation of erythrocytes as an assay for red cell survival studies.** *Ann Hematol* 1991, **63**:214-7.
223. VR Muzykantov, RP Taylor: **Attachment of biotinylated antibody to red blood cells: antigen-binding capacity of immunoerythrocytes and their susceptibility to lysis by complement.** *Anal Biochem* 1994, **223**:142-8.
224. K Danielyan, K Ganguly, BS Ding, D Atochin, S Zaitsev, JC Murciano, PL Huang, SE Kasner, DB Cines, VR Muzykantov: **Cerebrovascular thromboprophylaxis in mice by erythrocyte-coupled tissue-type plasminogen activator.** *Circulation* 2008, **118**:1442-9.
225. JC Murciano, VR Muzykantov: **Coupling of anti-thrombotic agents to red blood cells offers safer and more effective management of thrombosis.** *Discov Med* 2003, **3**:28-9.
226. MA Lindorfer, A Nardin, PL Foley, MD Solga, AJ Bankovich, EN Martin, AL Henderson, CW Price, E Gyimesi, CP Wozencraft, et al: **Targeting of *Pseudomonas aeruginosa* in the bloodstream with bispecific monoclonal antibodies.** *J Immunol* 2001, **167**:2240-9.
227. D Gray, S Subramanian: **Choice of cellular protein expression system.** *Curr Protoc Protein Sci* 2001, **Chapter 5**:Unit5 16.
228. S Zaitsev, D Spitzer, JC Murciano, BS Ding, S Tliba, MA Kowalska, K Bdeir, A Kuo, V Stepanova, JP Atkinson, et al: **Targeting of a mutant plasminogen activator to circulating red blood cells for prophylactic fibrinolysis.** *J Pharmacol Exp Ther* 2010, **332**:1022-31.
229. BS Ding, YJ Zhou, XY Chen, J Zhang, PX Zhang, ZY Sun, XY Tan, JN Liu: **Lung endothelium targeting for pulmonary embolism thrombolysis.** *Circulation* 2003, **108**:2892-8.
230. K Masuda, M Richter, X Song, A Berezov, R Murali, MI Greene, H Zhang: **AHNP-streptavidin: a tetrameric bacterially produced antibody surrogate fusion protein against p185her2/neu.** *Oncogene* 2006, **25**:7740-6.
231. RJ Stewart, JC Fredenburgh, BA Leslie, BA Keyt, JA Rischke, JI Weitz: **Identification of the mechanism responsible for the increased fibrin specificity of TNK-tissue plasminogen activator relative to tissue plasminogen activator.** *J Biol Chem* 2000, **275**:10112-20.

232. E Haber, C Bode, GR Matsueda, GL Reed, MS Runge: **Antibody targeting as a thrombolytic strategy.** *Ann N Y Acad Sci* 1992, **667**:365-81.
233. DJ Hayzer, IM Lubin, MS Runge: **Conjugation of plasminogen activators and fibrin-specific antibodies to improve thrombolytic therapeutic agents.** *Bioconjug Chem* 1991, **2**:301-8.
234. ML Dustin, R Rothlein, AK Bhan, CA Dinarello, TA Springer: **Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).** *J Immunol* 1986, **137**:245-54.
235. T Kumasaka, WM Quinlan, NA Doyle, TP Condon, J Sligh, F Takei, A Beaudet, CF Bennett, CM Doerschuk: **Role of the intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice.** *J Clin Invest* 1996, **97**:2362-9.
236. G Kaplanski, V Marin, M Fabrigoule, V Boulay, AM Benoliel, P Bongrand, S Kaplanski, C Farnarier: **Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106).** *Blood* 1998, **92**:1259-67.
237. GJ Shaw, JM Meunier, SL Huang, CJ Lindsell, DD McPherson, CK Holland: **Ultrasound-enhanced thrombolysis with tPA-loaded echogenic liposomes.** *Thromb Res* 2009, **124**:306-10.
238. DW Kang, LL Latour, JA Chalela, JA Dambrosia, S Warach: **Early and late recurrence of ischemic lesion on MRI: evidence for a prolonged stroke-prone state?** *Neurology* 2004, **63**:2261-5.
239. TF Imperiale, T Speroff: **A meta-analysis of methods to prevent venous thromboembolism following total hip replacement.** *JAMA* 1994, **271**:1780-5.
240. K Ganguly, JC Murciano, R Westrick, J Leferovich, DB Cines, VR Muzykantov: **The glycocalyx protects erythrocyte-bound tissue-type plasminogen activator from enzymatic inhibition.** *J Pharmacol Exp Ther* 2007, **321**:158-64.
241. S Zaitsev, D Spitzer, JC Murciano, BS Ding, S Tliba, MA Kowalska, OA Marcos-Contreras, A Kuo, V Stepanova, JP Atkinson, et al: **Sustained thromboprophylaxis mediated by an RBC-targeted pro-urokinase zymogen activated at the site of clot formation.** *Blood* 2010.
242. PR Salacinski, C McLean, JE Sykes, VV Clement-Jones, PJ Lowry: **Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha,6 alpha-diphenyl glycoluril (Iodogen).** *Anal Biochem* 1981, **117**:136-46.
243. TN Schumacher, TJ Tsomides: **In vitro radiolabeling of peptides and proteins.** *Curr Protoc Protein Sci* 2001, **Chapter 3**:Unit 3 3.
244. LE Samelson: **Iodination of soluble and membrane-bound proteins.** *Curr Protoc Immunol* 2001, **Chapter 8**:Unit 8 11.
245. K Ganguly, T Krasik, S Medinilla, K Bdeir, DB Cines, VR Muzykantov, JC Murciano: **Blood clearance and activity of erythrocyte-coupled fibrinolytics.** *J Pharmacol Exp Ther* 2005, **312**:1106-13.
246. VR Muzykantov, JC Murciano: **Attachment of antibody to biotinylated red blood cells: immuno-red blood cells display high affinity to immobilized antigen and normal biodistribution in rats.** *Biotechnol Appl Biochem* 1996, **24 (Pt 1)**:41-5.
247. L Bajzar, ME Nesheim, PB Tracy: **The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent.** *Blood* 1996, **88**:2093-100.
248. JP Collet, G Montalescot, C Lesty, JW Weisel: **A structural and dynamic investigation of the facilitating effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in dissolving platelet-rich clots.** *Circ Res* 2002, **90**:428-34.
249. KC Gersh, S Zaitsev, V Muzykantov, DB Cines, JW Weisel: **The spatial dynamics of fibrin clot dissolution catalyzed by erythrocyte-bound versus free fibrinolytics.** *J Thromb Haemost* 2010.
250. GL Ellman: **Tissue sulfhydryl groups.** *Arch Biochem Biophys* 1959, **82**:70-7.
251. RJ Duncan, PD Weston, R Wrigglesworth: **A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins, and its use in the preparation of conjugates for immunoassay.** *Anal Biochem* 1983, **132**:68-73.
252. S Hashida, M Imagawa, S Inoue, KH Ruan, E Ishikawa: **More useful maleimide compounds for the conjugation of Fab' to horseradish peroxidase through thiol groups in the hinge.** *J Appl Biochem* 1984, **6**:56-63.
253. EA Raleigh, K Elbing, R Brent: **Selected topics from classical bacterial genetics.** *Curr Protoc Mol Biol* 2002, **Chapter 1**:Unit 1 4.
254. HC Birnboim, J Doly: **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res* 1979, **7**:1513-23.

255. JA Schetz, EP Shankar: **Protein expression in the Drosophila Schneider 2 cell system.** *Curr Protoc Neurosci* 2004, **Chapter 4**:Unit 4 16.
256. UK Laemmli: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-5.
257. D Suckau, A Resemann, M Schuereberg, P Hufnagel, J Franzen, A Holle: **A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics.** *Anal Bioanal Chem* 2003, **376**:952-65.
258. VR Muzykantov, JC Murciano, RP Taylor, EN Atochina, A Herraes: **Regulation of the complement-mediated elimination of red blood cells modified with biotin and streptavidin.** *Anal Biochem* 1996, **241**:109-19.
259. K Ganguly, MS Goel, T Krasik, K Bdeir, SL Diamond, DB Cines, VR Muzykantov, JC Murciano: **Fibrin affinity of erythrocyte-coupled tissue-type plasminogen activators endures hemodynamic forces and enhances fibrinolysis in vivo.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **316**:1130-6.
260. DJ Loskutoff, M Sawdey, J Mimuro: **Type 1 plasminogen activator inhibitor.** *Prog Hemost Thromb* 1989, **9**:87-115.
261. DJ Loskutoff, JA van Mourik, LA Erickson, D Lawrence: **Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**:2956-60.
262. G Maresca, A Di Blasio, R Marchioli, G Di Minno: **Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, **19**:1368-77.
263. S Fischer, Kohnert, U.: **Major mechanistic differences explain the higher clot lysis potency of reteplase over alteplase: lack of fibrin binding is an advantage for bolus application of fibrin-specific thrombolytics.** *Fibrinolysis and proteolysis* 1997, **11**:129-135.
264. KR Machlus, JC Cardenas, FC Church, AS Wolberg: **Causal relationship between hyperfibrinogenemia, thrombosis, and resistance to thrombolysis in mice.** *Blood* 2011.
265. PW Kamphuisen, JC Eikenboom, HL Vos, R Pablo, A Sturk, RM Bertina, FR Rosendaal: **Increased levels of factor VIII and fibrinogen in patients with venous thrombosis are not caused by acute phase reactions.** *Thromb Haemost* 1999, **81**:680-3.
266. L Bajzar, M Kalafatis, P Simioni, PB Tracy: **An antifibrinolytic mechanism describing the prothrombotic effect associated with factor VLeiden.** *J Biol Chem* 1996, **271**:22949-52.
267. LO Mosnier, JC Meijers, BN Bouma: **Regulation of fibrinolysis in plasma by TAFI and protein C is dependent on the concentration of thrombomodulin.** *Thromb Haemost* 2001, **85**:5-11.
268. C Vadseth, JM Souza, L Thomson, A Seagraves, C Nagaswami, T Scheiner, J Torbet, G Vilaire, JS Bennett, JC Murciano, et al: **Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species.** *J Biol Chem* 2004, **279**:8820-6.
269. M Toba, T Nagaoka, Y Morio, K Sato, K Uchida, N Homma, K Takahashi: **Involvement of Rho kinase in the pathogenesis of acute pulmonary embolism-induced polystyrene microspheres in rats.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010, **298**:L297-303.
270. P Gresele, S Momi, M Berrettini, GG Nenci, HP Schwarz, N Semeraro, M Colucci: **Activated human protein C prevents thrombin-induced thromboembolism in mice. Evidence that activated protein c reduces intravascular fibrin accumulation through the inhibition of additional thrombin generation.** *J Clin Invest* 1998, **101**:667-76.
271. RJ Westrick, ME Winn, DT Eitzman: **Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series).** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**:2079-93.
272. OAM-C Juan-Carlos Murciano, Alicia Bueno, Jose L. Izquierdo, Luis Ramudo, Fatima Esquivel, Manuel Desco, and Jesus Ruiz-Cabello: **New Murine Sub-massive Pulmonary Embolism Model, Sensitive To Both Clinical Treatments And Diagnostic Techniques.** In: *Book New Murine Sub-massive Pulmonary Embolism Model, Sensitive To Both Clinical Treatments And Diagnostic Techniques* (Editor ed.^eds.), vol. Am. J. Respir. Crit. Care Med., May 2010; 181: A6798. . City: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine; 2010.
273. JC Murciano, D Harshaw, DG Neschis, L Koniaris, K Bdeir, S Medinilla, AB Fisher, MA Golden, DB Cines, MT Nakada, et al: **Platelets inhibit the lysis of pulmonary microemboli.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **282**:L529-39.
274. JC Murciano, S Muro, L Koniaris, M Christofidou-Solomidou, DW Harshaw, SM Albelda, DN Granger, DB Cines, VR Muzykantov: **ICAM-directed vascular immunotargeting of antithrombotic agents to the endothelial luminal surface.** *Blood* 2003, **101**:3977-84.
275. D Kufryn, DE Eslin, K Bdeir, JC Murciano, A Kuo, MA Kowalska, JL Degen, BS Sachais, DB Cines, M Poncz: **Antithrombotic thrombocytes: ectopic expression of urokinase-type plasminogen activator in platelets.** *Blood* 2003, **102**:926-33.

276. U Martin, S Fischer, U Kohnert, H Lill, R Rudolph, G Sponer, A Stern, K Strein: **Properties of a novel plasminogen activator (BM 06.022) produced in Escherichia coli.** *Zeitschrift fur Kardiologie* 1990, **79 Suppl 3**:167-70.
277. D Vivien, M Gauberti, P Guedin, E Angles-Cano: **[Cerebral ischemia (2), How to neutralize the neurotoxic effects of tPA].** *Med Sci (Paris)* 2009, **25**:855-7.
278. CJ Siao, SE Tsirka: **Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II.** *J Neurosci* 2002, **22**:3352-8.
279. JE Dalen: **Thrombolysis in submassive pulmonary embolism? No.** *J Thromb Haemost* 2003, **1**:1130-2.
280. SZ Goldhaber: **Thrombolysis in submassive pulmonary embolism.** *J Thromb Haemost* 2004, **2**:1473-4; discussion 1474-8.
281. S Konstantinides: **Thrombolysis in submassive pulmonary embolism? Yes.** *J Thromb Haemost* 2003, **1**:1127-9.
282. RS Franco: **The measurement and importance of red cell survival.** *Am J Hematol* 2009, **84**:109-14.
283. JA Jordan, JC Murciano, A Lotero, A Herraiez, JC Diez: **In vitro properties and organ uptake of rat band 3 cross-linked erythrocytes.** *Biochimie* 1997, **79**:53-61.
284. K Benchenane, V Berezowski, C Ali, M Fernandez-Monreal, JP Lopez-Atalaya, J Brillault, J Chuquet, A Nouvelot, ET MacKenzie, G Bu, et al: **Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis.** *Circulation* 2005, **111**:2241-9.