

Estreptoquinasa: a propósito de un agente trombolítico patentado en Cuba

✉ Luciano Hernández¹, María A Marrero²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, AP 6162, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba

²Centro Nacional de Ensayos Clínicos
Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: luciano.hernandez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Las alteraciones de la hemostasis del organismo pueden provocar la formación de coágulos en el sistema circulatorio, que ocasionan desórdenes que llevan a procesos tales como el infarto cerebral o del miocardio. El tratamiento de estas afecciones puede requerir la aplicación de agentes fibrinolíticos como la uroquinasa (Uk), el activador tisular del plasminógeno (tPA) o la estreptoquinasa (Sk). Este trabajo trata, específicamente, la posición de la Sk como un agente clínicamente importante y con una buena relación costo-efectividad en el tratamiento de los procesos trombolíticos. Los aspectos que se discuten incluyen: modo de acción, estructura y relación estructura-función, modificaciones estructurales que pueden mejorar su función, fuentes de obtención, estreptoquinasa recombinante, producción y purificación de esta proteína, así como su posición actual en el mercado.

Palabras clave: estreptoquinasa, uroquinasa, activador tisular del plasminógeno, agentes trombolíticos

Biotecnología Aplicada 2005;22:182-190

ABSTRACT

Streptokinase: about of a thrombolytic patented in Cuba. A failure of hemostasis of the organism could cause the formation of clots inside the circulatory system, causing disorders of the system that lead to such processes like the stroke or myocardial infarction. The treatment of these pathologies could require the application of thrombolytic agents like the urokinase (Uk), the tissue type plasminogen activator (tPA) or the streptokinase (Sk). This review approaches the position of the Sk as clinically important and with a good relationship cost-effectiveness in the treatment of the thrombolytic processes. The aspects discussed include: mode of action, structure and relationship structure-function, structural modifications that could improve their function, sources of obtaining, recombinant streptokinase, production and purification of this protein and their current position in the market.

Key words: streptokinase, urokinase, tissue type plasminogen activator, thrombolytic agents

Introducción

La formación de coágulos de sangre puede provocar el bloqueo de arterias o venas, con consecuencias graves que pueden llevar a la muerte. La hemostasis de un individuo sano desarrolla coágulos para prevenir la pérdida de sangre del organismo, pero las fallas del equilibrio hemostático pueden ocasionar eventos como el infarto cerebral, el embolismo pulmonar, la trombosis venosa profunda y el infarto agudo del miocardio. Las afecciones que provocan estas fallas y el desarrollo de coágulos, necesitan la administración de agentes trombolíticos [1-3]. Este tipo de medicamento se ha utilizado también en el tratamiento de coágulos que se forman en los catéteres para la administración de medicamentos por largos periodos en pacientes con tratamiento de hemodiálisis. La estreptoquinasa (Sk) es uno de estos agentes. Otros agentes trombolíticos o fibrinolíticos que se pueden encontrar en el mercado actualmente incluyen la uroquinasa (Uk) y los productos derivados del activador tisular del plasminógeno (tPA).

Varios estudios clínicos han comparado la eficacia del tPA recombinante y la Sk, pero no revelan una preferencia clara por uno de ellos. La Sk es tan efectiva como el tPA recombinante en el tratamiento del infarto agudo del miocardio [4], y tiene una mejor relación costo-efectividad [5]; sin embargo, su uso no está exento

de riesgos. Las investigaciones con la Sk continúan, se mantiene con fuerza el propósito de mejorar las limitaciones de este producto como agente trombolítico. Es el más ampliamente prescrito en los casos de infarto agudo del miocardio y mantiene su permanencia en el mercado de los sistemas de salud de los países más pobres.

Trombólisis

La fisiología para la formación de los coágulos de fibrina se describe en varios estudios [6, 7]. Un trombo o coágulo se forma cuando células de la sangre quedan encerradas en una matriz de la proteína fibrina, una enzima que puede actuar en la disolución de los coágulos. Este proceso se conoce como trombólisis o fibrinólisis. En la circulación sanguínea de los mamíferos, la enzima responsable de este proceso es la plasmina, una proteasa sérica similar a la tripsina [8].

La plasmina es la forma fibrinolíticamente activa que se produce a partir del zimógeno inactivo, denominado plasminógeno, el cual está presente en la circulación de la sangre. La conversión del plasminógeno en plasmina es mediado por un corte proteolítico del enlace Arg 561-Val 562, el cual es mediado por varios activadores del plasminógeno [9]. Los activadores del plasminógeno presentes en la sangre son el tPA y la uPA. La actividad

1. Collen D, Stump DC, Gold HK. Thrombolytic therapy. *Annu Rev Med* 1988; 39:405-23.

2. Collen D. Coronary Thrombolysis: streptokinase or recombinant tissue plasminogen activator? *Ann Intern Med* 1990;112:529-38.

3. Francis CW, Marder VJ. Fibrinolytic therapy for venous thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1991;34(3):193-204.

4. Sherry S, Marder VJ. Streptokinase and recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) are equally effective in treating acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 1991;114:417-23.

5. Early thrombolysis for the treatment of acute myocardial infarction: a systemic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment* 2003;7:15.

6. Paoletti R, Sherry S, editors. *Proceedings of the serono symposia. Thrombosis and Urokinase*, vol. 9. London: Academic Publisher, 1977. p. 257.

7. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med* 1996;47:315-31.

8. Castellino FJ. Recent advances in the chemistry of the fibrinolytic system. *Chem Rev* 1981;81:431-46.

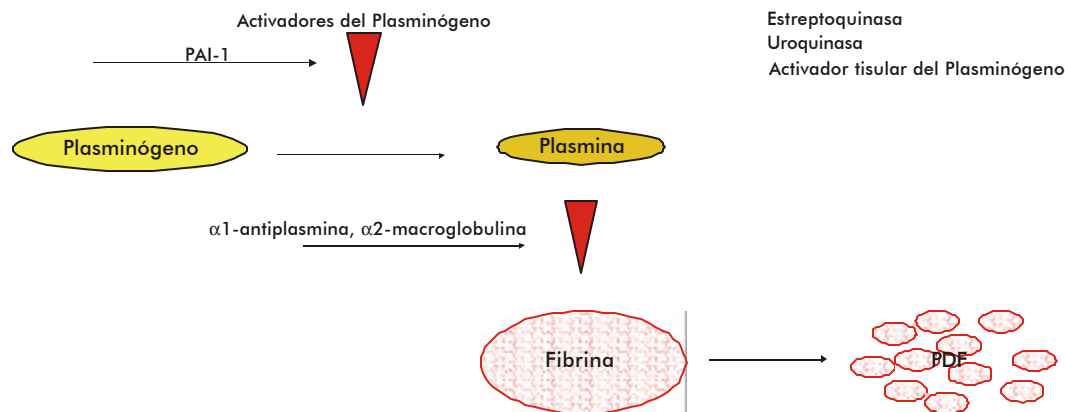


Figura 1. Cascada de reacciones involucradas en la disolución de los coágulos de fibrina.

fibrinolítica en la circulación es modulada por los inhibidores de los activadores del plasminógeno (entre ellos, el inhibidor 1 del activador del plasminógeno, PAI-1) y de la plasmina (α1-antiplasmina, α2-macroglobulina) (Figura 1) [10].

La plasmina actúa sobre la red de fibrina y la convierte en productos de degradación (PDF).

En el tratamiento clínico aparecen las formas recombinantes de los activadores humanos del plasminógeno (tPA y uPA) y también la Sk, una proteína aislada de la bacteria estreptococos, que no se encuentra de forma natural en la circulación humana. La Sk, el tPA y la uPA no tienen una actividad fibrinolítica directa, su acción terapéutica se ejerce mediante la activación del plasminógeno presente en la sangre y su conversión a plasmina.

La Sk, a diferencia del tPA y la uPA que son proteasas, no posee actividad enzimática propia [8]. Esta proteína adquiere su capacidad activadora por medio de la formación de un complejo con el plasminógeno o la plasmina presentes en la circulación sanguínea. Este es un complejo estequiométrico (1:1) altamente afín, que asume una función de proteasa sumamente específica, al activar otras moléculas de plasminógeno en su conversión a plasmina [8, 11].

Activadores del plasminógeno

En la tabla 1 que aparece a continuación se relacionan los principales activadores del plasminógeno incorporados a la terapia fibrinolítica.

Los fármacos no fibrinoespecíficos como la Sk y la Uk convierten en plasmina tanto al plasminógeno circulante como al que está unido al coágulo, lo que provoca no solo la lisis de la fibrina en el coágulo, sino también una importante fibrinogenólisis sistémica, fibrinogenemia y elevación de los productos circulantes de la degradación de la fibrina (PDF).

Debido a la relativa selectividad del complejo binario plasminógeno-fibrina, los activadores fibrinoespecíficos dan lugar, fundamentalmente, a la lisis de fibrina en la superficie del coágulo sin afectar teóricamente el fibrinógeno circulante [15].

De las proteínas identificadas como activadores del plasminógeno, se han derivado moléculas del activador tisular del plasminógeno modificadas estructuralmente y de la Sk que se encuentran en el mercado para la

terapia trombolítica. Los fármacos trombolíticos se han clasificado también como de primera, segunda y tercera generación, según se han incorporado al uso clínico en las enfermedades tromboembólicas. En la tabla 2 aparece la clasificación de estos.

Uroquinasa

La Uk se utilizó por primera vez en el tratamiento del infarto agudo del miocardio en los años 60 y actualmente es el agente trombolítico más empleado en Japón. Su actividad trombolítica es similar a la de la Sk, pero su aplicación clínica se limita por sus elevados costos y por la inexistencia de estudios aleatorios que prueben su eficacia.

La Uk es una proteína sérica similar a la tripsina, compuesta por dos cadenas polipeptídicas (A y B) de 20 000 y 34 000 daltons, respectivamente, que se encuentran unidas por un puente disulfuro siendo esta su estructura nativa. La aparición de la Uk es precedida por la de una proenzima inactiva: la pro-uroquinasa (pro-Uk), de cadena única y 54 000 daltons de peso molecular. Su activación ocurre por la acción de la plasmina que hidroliza el enlace peptídico lis158-159isol y da lugar a la Uk de doble cadena [16].

Tabla 1. Principales activadores del plasminógeno incorporados a la terapia fibrinolítica.

tPA	uPA	Sk
Proteasa sérica	Proteasa sérica	No es una enzima
Activador fibrinoespecífico	Activador no fibrinoespecífico	Activador no fibrinoespecífico
Peso molecular: 70 kDa	Peso molecular: 55 kDa	Peso molecular: 47 kDa
Producida por las células del endotelio vascular [12]	Producida en el riñon y secretada en la orina [13]	Producida en el cultivo de estreptococos beta hemolíticos del grupo C [14]

Tabla 2. Clasificación generacional de los fármacos trombolíticos.

Primera generación	Segunda generación	Tercera generación
Uroquinasa	Activador histórico del plasminógeno	Retepase (r-PA) TNK
Estreptoquinasa	Complejo activador Sk-plasminógeno (APSAC)	
	Pro-uroquinasa (scu-PA)	

9. Castellino FJ. Biochemistry of human-plasminogen. *Semin Thromb Hemost* 1984;10:18-23.

10. Francis CW, Marder VJ. Fibrinolytic therapy for venous thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis* 1991;34(3):193-204.

11. Bajaj AP, Castellino FJ. Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase. *J Biol Chem* 1977;252:492-8.

12. Camiolo SM, Thorsen S, Astrup T. Fibrinogenolysis and fibrinolysis with tissue plasminogen activator, urokinase, streptokinase-activated human globulin, and plasmin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971;138:277-80.

13. Barlow GH. Urinary and kidney cell plasminogen activator (urokinase). *Methods Enzymol* 1976;45:239-44.

14. Tillet WS, Garner RL. Fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 1933;58:485-502.

15. Collen D, Bounameaux H, De Cook F, Lijnen HR, Verstraete M. Analysis of coagulation and fibrinolysis during intravenous infusion of recombinant human tissue-type plasminogen activator in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1986;73:511-7.

La Uk activa al Glu-plasminógeno por un corte del enlace peptídico Arg 561-Val 562 a Glu-plasmina. Al igual que la Sk, es un activador no fibrinoespecífico por lo que provoca un estado lítico sistémico. Durante el tratamiento con Uk, además de la fibrinólisis, se pueden suceder alteraciones de la coagulación al reducir los niveles plasmáticos de fibrinógeno y de los factores V y VIII de la coagulación.

La cinética plasmática de la Uk es biexponencial con una fase inicial de 4 minutos y una vida media final que puede durar entre 10 y 20 minutos [17].

Existe una correlación lineal entre la actividad trombolítica plasmática y la dosis de Uk, la cual puede estar dada por su mecanismo de acción y la ausencia de anticuerpos neutralizantes. Su principal efecto secundario es la hemorragia, y carece de propiedades antigénicas en humanos.

Activador tisular del plasminógeno

En 1983 se obtuvo la prueba definitiva de que el tPA se sintetizaba en las células endoteliales [18].

En 1980 se identificó el tPA en células de melanoma y un año después se purificó la enzima. El gen que codifica la proteína se aisló del cromosoma 8 y se introdujo en un vector que se utilizó en la transformación de células de ovario de hámster (CHO) para su expresión, lo cual facilitó la producción de este fármaco a gran escala.

El tPA es una glicoproteína de 68 000 daltons, formada por 530 aminoácidos. Es sintetizado y secretado inicialmente como una molécula de cadena única (sc-tPA, Alteplase), que posteriormente se divide en una doble cadena (tc-tPA, Duteplase), unida por un único puente disulfuro, debido al corte del enlace Arg278-Ile279, por la acción de una serie de proteínas endógenas como la plasmina, la kalikreína tisular y el factor X activado.

Estructuralmente, la región amino-terminal se compone de varios dominios que tienen homología con otras proteínas:

- Los residuos del 1-43 son homólogos a los de la fibronectina, denominados dominio *finger*.

- Los residuos comprendidos entre los aminoácidos 44 y 91 son homólogos a los del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

- Los residuos del 92 al 173 y del 180 al 261 son homólogos a las regiones *kringle* del plasminógeno.

La región *kringle 2* junto con el dominio *finger* son esenciales para la unión con la fibrina. La región carboxilo-terminal (279-530) es homóloga a la de otras proteasas séricas y contiene la región responsable de la actividad catalítica, compuesta por los siguientes aminoácidos: His322, Asp371 y Ser478 [19].

En ausencia de la fibrina, el tPA activa pobremente al plasminógeno por tratarse de un agente fibrinoespecífico. Sin embargo, al formarse la fibrina, el tPA y el plasminógeno se unen al coágulo y, de forma ordenada y secuencial, se produce la activación del plasminógeno.

La especificidad del tPA por la fibrina favorece el incremento de la actividad enzimática de este, como resultado de los cambios conformacionales del tPA y del plasminógeno formado posterior a la unión a la fibrina. El tPA y el plasminógeno se unen a la fibrina gracias a la presencia de los dominios *kringle*, una elevada afinidad por la fibrina posee el primero de ellos.

La relativa especificidad del tPA sobre la fibrina parece aumentar la velocidad con la que este agente consigue la recanalización coronaria con respecto a otros agentes no fibrinoespecíficos, además de aumentar la capacidad para lisar coágulos relativamente antiguos [20]. Por el contrario, esta temprana tasa de recanalización se ha acompañado de una mayor incidencia de reoclusiones: el 13% frente al 8% con respecto a agentes no fibrinoespecíficos [21].

La vida media inicial del tPA recombinante en sujetos sanos es de 5 a 6 minutos, y la vida media final, de aproximadamente 64 minutos [22].

El efecto adverso más común, al igual que sucede con otros agentes trombolíticos, es el riesgo de hemorragia, prácticamente el mismo que para la Sk o la Uk, a pesar de la afinidad del tPA por la fibrina. La incidencia de hemorragia es menor cuando se utiliza en el tratamiento del infarto agudo del miocardio, comparado con otras enfermedades como la trombosis venosa profunda, ya que la duración del tratamiento en este último caso es mayor. No se han descrito reacciones inmunológicas ni alérgicas graves, aunque sí se han observado algunas reacciones de hipersensibilidad leve, como prurito o urticaria.

Agentes trombolíticos de tercera generación

El grupo de los agentes trombolíticos de tercera generación está compuesto por los agentes trombolíticos que combaten mejor las características de sus predecesores de primera y segunda generación. Son pocos los productos de este grupo que han llegado a utilizarse en los seres humanos, después de extensos estudios de experimentación *in vitro* y con animales. El producto más avanzado es el Reteplase (r-PA), cuyo diseño se basó en el activador natural del plasminógeno de tipo tisular y es elaborado por técnicas genéticas de recombinación en *E. coli* [23]. Consiste en una molécula de cadena única que contiene 355 aminoácidos correspondientes a las secuencias de codificación del 1 al 3 y del 176 al 527 aminoácidos del tPA nativo. Su expresión en la *E. coli* produce una proteína no glicosilada que se acumula dentro de las células en forma de cuerpos de inclusión inactivos y que se purifican para restaurar la estructura nativa activa.

Este producto mantiene en su estructura los dominios *kringle 2* y proteasa sérica en forma funcional, pero no tiene los dominios *finger*, EGF y *kringle 1* que se encuentran en el tPA nativo [24].

Reteplase es un activador del plasminógeno no glicosilado, y sus diferencias estructurales con Alteplase le confieren una vida media más larga (18 minutos; mientras en el tPA es de 3 a 6 minutos) con dos consecuencias derivadas: para administrar el primero, se necesita menos dosis del fármaco para mantener elevados niveles terapéuticos, y el segundo, puede administrarse en forma de *bolus* intravenoso, lo cual inicia más rápidamente la trombólisis y con lo que se consigue, por tanto, una reperusión precoz.

Comparada con el tPA, el Reteplase tiene menos afinidad por la fibrina porque carece del dominio *finger*.

Este producto, como el tPA, es inhibido por el PAI-1 y es menos efectivo que Alteplase en la lisis de coágulos plasmáticos ricos en plaquetas y trombos antiguos [24].

16. Walker JE, Ogstron D. The inhibition of tissue activator and urokinase by human plasma. *Thromb Haemost* 1982;47:265.

17. Schreider P, Bachmann F, Sausser D. Urokinase: a short review of its properties and of its metabolism. In: D'Angelo A, Urokinase: basic and clinical aspects. London: Academic Press 1982:1-15.

18. Levin EG. Latent tissue plasminogen activator produced by human endothelial cells in culture: evidence for an enzyme inhibitor complex. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 1983;80:6804-8.

19. Dodd I, Nunn B, Robinson JH. Isolation, identification and pharmacokinetic properties of human tissue-type plasminogen activator species: possible localisation of a clearance recognition site. *Thromb Haemost* 1988;59:523-8.

20. Chesebro JH, Knatterud G, Roberts R, et al. Thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) Trial, phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. *Circulation* 1987;76:142-54.

21. Granger CB, Califf RM, Topol EJ. Thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. A review. *For Adis. Drug* 44: 293-325;1992.

22. Bugelski PJ, Fong KL, et al. Uptake of human recombinant tissue type plasminogen activator by rat hepatocytes *in vivo*: an electron microscope autoradiographic study. *Tromb Res* 1989; 53:287-303.

23. Kohnert U, Rudolph R, Verheijen JH, et al. Biochemical properties of the *kringle 2* and protease domains are maintained in the refolded tPA deletion variant BM 06.022. *Protein Eng* 1992;6:569-74.

24. Martin U, Bader R, Böhm E, et al. BM 06.022: a novel recombinant plasminogen activator. *Cardiovasc Drug Rev* 1993;11:299-311.

25. International Joint Efficacy Comparison of Thrombolytics. Randomised, double-blind comparison of reteplase double-bolus administration with streptokinase in acute myocardial infarction (INJECT): trial to investigate equivalence. *Lancet* 1995; 346:329-36.

26. Smalling RW, Bode C, Kalbfleisch J, et al. More rapid, complete, and stable coronary thrombolysis with bolus administration of reteplase compared with alteplase infusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995;91:2725-32.

27. Bode C, Smalling RW, Berg G, Burnett C, Lorch G, Kalbfleisch J, et al. Randomized comparison of coronary thrombolysis achieved with double bolus reteplase and front-loaded, «accelerated» alteplase in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1996;94(5):891-8.

28. GUSTO III Investigators. A comparison of Reteplase with Alteplase for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1997; 337(16):1118-23.

Los efectos adversos y la seguridad del r-PA se han evaluado ampliamente en diversos ensayos clínicos INJECT [25], RAPID-1 [26], RAPID-2 [27] y GUSTO III [28]. La hemorragia interna puede ser intracraneal, retroperitoneal, gastrointestinal, genitourinaria o respiratoria.

Las diferencias entre Reteplase y Alteplase observadas en los estudios RAPID-1 y RAPID-2 no fueron significativas para ninguno de los efectos cardiovasculares. La incidencia de las complicaciones alérgicas en el estudio INJECT fue menor para el grupo de r-PA (1.1%) que para el de la Sk (2%).

El producto Tecnetepase (TNKase) es el más reciente medicamento trombolítico aprobado por la FDA para la aplicación como un *bolus* en el tratamiento del infarto agudo del miocardio. Es una glicoproteína de 517 aminoácidos que se obtuvo por modificaciones del ADN complementario del tPA natural humano.

La molécula tiene sustituciones de la treonina 103 por asparagina, sustitución de la asparagina 117 por glutamina dentro del dominio *kringle 1* y cuatro sustituciones de alanina en las posiciones 296 a 299 en dominio proteasa.

Las modificaciones realizadas superan las propiedades farmacológicas del activador tisular del plasminógeno recombinante (Alteplase), con incremento de la vida media de 5 a 7 veces, la especificidad se incrementa 14 veces *in vitro*, disminuye la depleción sistémica del fibrinógeno y del plasminógeno y aumenta cerca de 80 veces su resistencia al PAI-1 [29-31]. La eficacia de TNKase fue comparada con la aplicación de una dosis única de Alteplase en el estudio ASSENT [32].

Al menos tres nuevas modificaciones del tPA podrían encontrarse dentro del grupo de medicamentos trombolíticos de tercera generación, en estudio para su salida al mercado: Montepase [33], Pamiteplase [34] y Lanoteplase [35].

Estreptoquinasa

La estreptoquinasa es una proteína extracelular no enzimática, formada por una cadena polipeptídica compuesta por 414 aminoácidos sin puentes disulfuro [36]. Esta proteína tiene su actividad máxima a pH 7.5 y su punto isoeléctrico es 4.7 [37-39]. En su estructura no contiene cistina, cisteína, fósforo, carbohidratos conjugados ni lípidos. Las estreptoquinasas producidas por diferentes grupos de estreptococos difieren en la estructura [40, 41].

La activación del plasminógeno por la Sk es especie específica [42]. Está formada por varios dominios estructurales (α , β y γ) con diferentes propiedades funcionales: el análisis por *Scanning* calorimétrico sugiere que la proteína está formada por dos dominios estructurales [43]. Eston son: dominio amino-terminal que comprende los residuos del 1 al 59 y que tiene una baja afinidad por el plasminógeno, y los residuos de la proteína del 60 al 414 que están relacionados con la formación del complejo con el plasminógeno [44]. El dominio carboxilo-terminal de la Sk está involucrado en el reconocimiento del sustrato: plasminógeno y en su activación [46, 47] y específicamente la región Asp 41-His 48 de la molécula interviene en la unión al plasminógeno [48], mientras que la función

de la región adyacente de los residuos 48 al 59 ha sido muy discutida [49].

La región enrollada del dominio γ se considera esencial para la activación del plasminógeno [50] y, de forma similar el dominio β , está involucrado en la formación del complejo Sk-plasminógeno, que es el responsable de activar el plasminógeno [51].

La Sk se une al plasminógeno mediante los sitios de unión a la lisina, para lograr la estructura conformacional adecuada para la activación del plasminógeno [52, 53].

Los primeros 59 residuos de aminoácidos de la molécula tienen más de una función en el proceso de formación del complejo y de la activación del plasminógeno [54, 55]. Sin estos residuos amino-terminal (1-59), la Sk tiene una estructura secundaria inestable y reducen significativamente la del fragmento restante de la Sk (60-414) [55]. Se han realizado varios estudios con fragmentos de la Sk, los cuales han aportado información sobre la actividad fibrinolítica de estos cuando se combinan y forman el complejo activo con el plasminógeno [45, 55-60].

La Sk por sí misma carece de actividad proteolítica. Es la unión de esta con el plasminógeno en proporción 1:1, la que forma el complejo activador, que hidroliza el enlace Arg 561-Val 562 del resto del plasminógeno circulante y lo transforma en plasmina [61].

Como ya se ha señalado, la Sk es un fibrinolítico no específico porque no solo activa el plasminógeno unido a la fibrina sino también el plasmático, lo que puede provocar hiperplasminemia, depleción de fibrinógeno circulante (hasta el 20%) y de los factores V y VIII de la coagulación, con el aumento concomitante de los productos de la degradación del plasminógeno en plasma. A pesar del estado lítico sistémico que puede inducir una dosis de 1 500 000 UI, se ha observado casi la misma incidencia de complicaciones hemorrágicas que con otros agentes trombolíticos que presentan mayor afinidad por la fibrina [62].

Por otra parte, la plasmina estimula la conversión de kalikreinógeno en kalikreína, por lo que la infusión de Sk produce la liberación de quininas. A esto se ha atribuido, en parte, el efecto hipotensor que se advierte en la mayoría de los pacientes que reciben Sk.

La cinética de este fármaco no se conoce bien, su concentración en el plasma y su vida media depende de su afinidad por el sustrato y de las concentraciones plasmáticas de anticuerpos anti-Sk. Su diferencia con los activadores fibrinoespecíficos es que su efecto fibrinolítico no es directamente proporcional a la dosis administrada, lo cual puede variar de un paciente a otro por las razones que hemos señalado.

La Sk se elimina de la circulación sanguínea de forma bifásica: la fase más rápida es la inactivación de la Sk por los anticuerpos específicos (4 minutos aproximadamente); en la segunda fase y una vez formado el complejo, la Sk se elimina con una vida media de 30 minutos [63].

Los títulos de anticuerpos anti-Sk aumentan después de los 5 a 6 días de su administración, y alcanzan concentraciones máximas varias semanas después. Se normalizan entre 4 y 6 meses después, por lo que es muy controvertida su administración en este periodo [62].

Como con otros medicamentos trombolíticos, la principal complicación del tratamiento con Sk es

29. Cannon CP, Gibson CM, McCabe CH, et al. TNK-tissue plasminogen compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: results of the TIMI 10B trial. *Circulation* 1998;98:2805-14.

30. Keyt BA, Paoni NF, Refino CJ et al. A faster-acting and more potent form of tissue plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994;91:3670-4.

31. Modi NB, Fox NL, Clow F-W, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tenecteplase: results from a phase II study in patients with acute myocardial infarction. *J Clin Pharmacol* 2000;40:508-15.

32. Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double-blind randomised trial. Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic (ASSENT-2) Investigators. *Lancet* 1999 Aug 28;354(9180):716-22.

33. Inoue T, Yaguchi I, Takayanagi K, Hayashi T, Morooka S, Eguchi Y. A new thrombolytic agent, montepase, is independent of the plasminogen activator inhibitor in patients with acute myocardial infarction: initial results of the Combining Montepase with Angioplasty (COMA) trial. *Am Heart J* 2002;144(4):E5.

34. Suzuki Y, Kano T, Katayama Y, Tejima E, Harada T. Reduction of infarction volume by bolus injection of pamiteplase, a modified tissue plasminogen activator with a longer half-life. *Neurological Research* July 2003;25(5):477-80(4).

35. InTIME-II Investigators. Intravenous NPA for the treatment of infarcting myocardium early; InTIME-II, a double-blind comparison of single-bolus lanoteplase vs accelerated alteplase for the treatment of patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000;21(24):2005-13.

36. Malke H, Ferretti JJ. Streptokinase: cloning, expression and excretion by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1984;81:3557-61.

37. De Renzo EC, Siiteri PK, Hutchings BL, Bell PH. Preparation and certain properties of highly purified streptokinase. *J Biol Chem* 1967;242:533-42.

38. Taylor FB, Botts J. Purification and characterization of streptokinase with studies of streptokinase activation of plasminogen. *Biochemistry* 1968;7:232-42.

39. Brockway WJ, Castellino FJ. A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. *Biochemistry* 1974;13:2063-70.

40. Huang TT, Malke H, Ferretti JJ. Heterogeneity of the streptokinase gene in group A *Streptococci*. *Infect Immun* 1989;57:502-6.

41. Malke H. Polymorphism of the streptokinase gene-implications for the pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis. *Zentralbl Bakteriol* 1993; 278:246-57.

42. McCoy HE, Broder CC, Lottenberg R. Streptokinases produced by pathogenic group C *Streptococci* demonstrate species-specific plasminogen activation. *J Infect Dis* 1991;164:515-21.

43. Welfle K, Pfeil W, Misselwitz R, Welfle H, Gerlach D. Conformational properties of streptokinase-differential scanning calorimetric investigations. *Int J Biol Macromol* 1992;14:19-22.

la hemorragia, la cual se relaciona con la dosis y la duración de la infusión intravenosa.

Debido a su origen bacteriano, la Sk es antigénica y, por tanto, puede producir reacciones alérgicas. El 4% de los pacientes del Second Internacional Study of Infarct Survival-ISIS-2 [64] que recibieron Sk tuvieron reacciones alérgicas además de fiebre, escalofríos, urticaria o *rash*. El choque anafiláctico, afortunadamente es muy raro (entre 0.1 y 0.5%); sin embargo, la hipotensión arterial precisó resucitación con fluidoterapia entre el 7 y el 10% de los pacientes.

Modificaciones de la molécula de Sk

Las posibilidades terapéuticas de la Sk quedan limitadas por su inmunogenicidad y su corta vida media en la sangre. En la circulación sanguínea es degradada por la plasmina.

Los trabajos de modificación estructural de la molécula tratan de extender su vida media y/o reducir su inmunogenicidad, al mejorar la activación del plasminógeno. La primera de estas modificaciones y única presente en el mercado de los productos trombolíticos fue el complejo activador equimolar no covalente formado por la Sk y el lis-plasminógeno humano, cuyo centro catalítico ha sido acilado de forma reversible por un derivado p-anisol (APSAC), el cual incrementa la vida media de la molécula en relación con la Sk [65]. También se ha señalado que la hipotensión es menos frecuente que cuando el paciente es tratado con Sk [66].

Se han realizado varios trabajos en busca de nuevas modificaciones de la molécula, basados en la relación estructura-función y sus dominios [46-48, 60, 67-75].

Las variantes estructurales de la Sk se han logrado por mutación genética, técnicas de ADN recombinante y por modificaciones químicas o enzimáticas. Se han obtenido mutantes que mejoran su estabilidad [76], variantes que modifican los sitios de mayor acción proteolítica Lis 59 y Lis 38, y que han permitido obtener mutantes resistentes a la plasmina [63] que mejoran su vida media. Estas formas con resistencia a la acción de la plasmina son tan activas como la molécula nativa.

La Sk recombinante producida en la levadura *Pichia pastoris* es glicosilada y esto le confiere determinada resistencia a la proteólisis [77]. Con el propósito de incrementar su vida media, se han realizado complejos de la Sk con polímeros como el polietilenglicol (PEG) [78, 79].

La inmunogenicidad de los dominios de la Sk es diferente [80], y varias investigaciones reportan los resultados en la identificación de las regiones más antigénicas [81-83]. Se han obtenido mutantes de Sk recombinante con inmunogenicidad reducida [84]. Un mutante carente de la región de 42 aminoácidos de la región carboxilo terminal es menos inmunógeno que la molécula nativa [72].

Producción de la estreptoquinasa

La producción de la Sk por estreptococos fue descubierta en 1874, por Billroth, en exudados de heridas infectadas. Posteriormente, en la sangre de pacientes con escarlatina se detectaron bacterias similares, y en 1919, los streptococos sp. se clasificaron en las varian-

tes α , β y γ basados en las reacciones hemolíticas de estos sobre placas de agar sangre.

En 1933, Lancefield logró una diferenciación de las cepas β hemolíticas en grupos del A al O a partir de análisis serológicos [85]. La Sk se aisló de los grupos A, C y G, y la produce preferentemente el grupo C, el cual carece de algunas toxinas que son excretadas por los otros dos grupos.

La cepa H46A (ATCC 12449) del grupo C de *Streptococcus equisimilis* aislada de una fuente humana en 1945, se ha utilizado con frecuencia para la producción. Esta se aisló entre cientos de cepas fibrinolíticas porque la Sk obtenida era más activa.

La cepa H46A crece en un medio semisintético y excreta grandes cantidades de Sk [86, 87]. También se ha utilizado con frecuencia en el aislamiento del gen de la Sk para su expresión en otros microorganismos [88-90].

Estreptoquinasa recombinante

Existe suficiente información sobre el gen, su control transcripcional y su promotor, que han permitido la clonación y la expresión segura de la estreptoquinasa recombinante en bacterias no patógenicas al hombre. Malke secuenció el gen de la Sk [88]. El control transcripcional de este se ha estudiado bastante [91], así como el análisis funcional de su promotor [92].

El aislamiento del gen y los estudios al respecto sugieren que sea un gen polimórfico [41]. El gen aislado de la cepa H46A se ha clonado en varias cepas de bacterias Gram negativas, entre las cuales se incluye el *Bacillus subtilis* [63, 90] y la *Escherichia coli* [36, 93-98]. También se ha logrado la expresión de Sk en la levadura *Pichia pastoris*.

La inserción de una construcción genética con el gen de la Sk y la eritromicina como marcador de selección se introdujo en la cepa de *S. equisimilis* H46A, con el objetivo de seleccionar clones sobreproductores de la proteína [99].

El aislamiento de *S. equisimilis* de la secuencia nucleotídica del gen que codifica la Sk y su expresión en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris* se patentó en 1992 y se demostró que la proteína obtenida se podía utilizar para el tratamiento de diferentes tipos de trombosis [100].

Fermentación

Los estreptococos del grupo A, frecuentemente necesitan de medios ricos y complejos suplementados con factores nutricionales para su crecimiento [101].

Un medio que comúnmente se utiliza para la producción de Sk es la infusión cerebro-corazón [36], en el cual se ha obtenido un crecimiento satisfactorio del *S. equisimilis* H46A. La máxima concentración se detectó en la fase exponencial de crecimiento. Este es un medio químicamente definido para el crecimiento satisfactorio de estreptococos del grupo A [42]. La velocidad de crecimiento en este medio fue comparable al obtenido en medios más complejos.

La influencia de la temperatura en el cultivo de *S. equisimilis* H46A desempeña una función significativa en el crecimiento y la producción de la Sk; el valor óptimo es 28 °C y la cantidad de Sk producida por unidad de biomasa depende de esta [102].

44. Nihalani D, Kumar R, Rajagopal K, Sahni G. Role of the amino-terminal region of streptokinase in the generation of a fully functional plasminogen activator complex probed with synthetic peptides. *Protein Sci* 1998;7:637-48.

45. Kim IC, Kim JS, Lee SH, Byun SM. C-terminal peptide of streptokinase, Met369-Pro373, is important in plasminogen activation. *Biotechnol Mol Biol Int* 1996;40:939-45.

46. Kim DM, Lee SJ, Yoon SK, Byun SM. Specificity role of the streptokinase C-terminal domain in plasminogen activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:585-8.

47. Zhai P, Wakeham N, Loy JA, Zhang XC. Functional roles of streptokinase C-terminal flexible peptide in active site formation and substrate recognition in plasminogen activation. *Biochemistry* 2003;42:114-20.

48. Kim DM, Lee SJ, Kim IC, Kim ST, Byun SM. Asp4-His48 region of streptokinase is important in binding to a substrate plasminogen. *Thromb Res* 2000;99:93-8.

49. Wakeham N, Terzyan S, Zhai PZ, Loy JA, Tang J, Zhang XC. Effects of deletion of streptokinase residues 48-59 on plasminogen activation. *Protein Eng* 2002;15:753-61.

50. Wu DH, Shi GY, Chuang WJ, Hsu JM, Young KC, Chang CW et al. Coiled coil region of streptokinase gammadomain is essential for plasminogen activation. *J Biol Chem* 2001;276:15025-33.

51. Robinson BR, Liu L, Houng AK, Sazanov IV, Reed GL. The streptokinase beta domain plays a critical role in activator complex formation and substrate docking. *Circulation* 2000;102:490.

52. Boxrud PD, Bock PE. Streptokinase binds preferentially to the extended conformation of plasminogen through lysine binding site and catalytic domain interactions. *Biochemistry (USA)* 2000;39:13974-81.

53. Boxrud PD, Verhamme IMA, Fay WP, Bock PE. Streptokinase triggers conformational activation of plasminogen through specific interactions of the amino-terminal sequence and stabilizes the active zymogen conformation. *J Biol Chem* 2001;276:26084-9.

54. Shi GY, Chang BI, Chen SM, Wu DH, Wu HL. Function of streptokinase fragments in plasminogen activation. *Biochem J* 1994;304:235-41.

55. Young KC, Shi GY, Chang YF, Chang BI, Chang LC, Lai MD et al. Interaction of streptokinase and plasminogen - studied with truncated streptokinase peptides. *J Biol Chem* 1995;270:29601-6.

56. Brockway WJ, Castellino FJ. A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. *Biochemistry* 1974;13:2063-70.

57. Markus G, Evers JL, Hobika GH. Activator activities of the transient forms of the human plasminogen streptokinase complex during its proteolytic conversion to the stable activator complex. *J Biol Chem* 1976;251:6495-504.

En numerosos trabajos se analizan las condiciones óptimas de fermentación para mutantes de la cepa salvaje de estreptococo y para otros microorganismos genéticamente manipulados. A partir del gen de la Sk del *S. equisimilis* expresado en *E. coli* se han obtenido concentraciones de Sk mayores que las logradas en cultivos de estreptococo del grupo C con el empleo de un medio compuesto por hidrolizado de caseína, extracto de levadura y sales [93]. También se ha obtenido Sk recombinante en *E. coli* en un medio LB [69].

Actividad biológica

Los ensayos que se utilizan en la determinación de la actividad Sk se basan en la activación del plasminógeno a plasmina, y se mide su actividad: por la acción proteolítica de la plasmina sobre algún sustrato indicador, entre ellos coágulos de fibrina, caseína, otras proteínas y varios ésteres sintéticos (lisina metil éster, lisina etil éster, p-sulfoniltolueno-L-arginina metil éster).

En 1949, Chirstensen estableció el primer método cuantitativo para medir la actividad de esta proteína, el cual determinaba la cantidad de Sk necesaria para provocar la lisis de un coágulo de fibrina estándar en 10 minutos a 37 °C y pH 7.4. Varias modificaciones de este procedimiento se han utilizado en la cuantificación de la Sk [103-107].

La digestión de la caseína para la cuantificación de Sk fue establecida en 1947, y el método de caseinólisis radial en gel de agarosa con el ejemplo de caseína y plasminógeno humano es comúnmente utilizado [108].

El método de placa de fibrina, en inicio utilizado para medir la actividad proteolítica en la sangre [109], ha sido ampliamente usado para medir la fibrinólisis. De este método se han realizado varias modificaciones [110].

En los estudios de lisis de coágulos de fibrina por Sk se han identificado el pH, la concentración de sales en la solución tampón y la concentración de plasminógeno como las variables que más pueden influir en la determinación. La concentración de fibrinógeno también afecta el ensayo [111].

En los últimos años, los ésteres sintéticos de aminoácidos se han empleado como sustratos sensibles en el ensayo de actividad proteolítica [112] adaptados para la determinación de plasmina [113-116].

Se reportó un ensayo con un sustrato cromogénico en placas [117]; la plasmina que se genera hidroliza un tripéptido específico, H-D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide. Varias modificaciones de este ensayo se han establecido para la determinación de la actividad fibrinolítica de la Sk, con estudio del efecto de la concentración de sales y de fibrinógeno en la generación de la actividad proteolítica de la plasmina [118].

La cuantificación de la Sk como producto farmacéutico para uso clínico se describe en la farmacopea británica. El método se basa en la formación de un coágulo *in vitro* y la lisis de este por la Sk que se cuantifica contra una curva patrón. Es un método laborioso, caro y depende de la observación permanente del analista. En los últimos años, el Instituto Nacional de Control y Estándar de biológicos de Inglaterra (NIBSC), ha realizado estudios con vistas a la aprobación de un método cuantitativo para la

determinación de Sk, basados en el uso de un sustrato cromogénico para la plasmina. Los resultados indican que su aprobación pudiera estar lista para el año próximo cuando concluya el estudio colaborativo en el cual participan varios laboratorios de diferentes países. El estudio incluye la evaluación del método y el empleo de estreptoquinasa de diferentes orígenes y productores.

Purificación

Se han descrito varios esquemas para la purificación de la Sk, incluyendo las preparaciones comerciales que se obtienen del cultivo de varias cepas de estreptococos [37, 119-121].

Uno de los primeros sistemas de purificación descritos fue la combinación de intercambio iónico sobre un gel de DEAE-celulosa y la electroforesis en columna sobre un gradiente de sucrosa para obtener un incremento de pureza en 5 o 6 veces [37]. Para lograr niveles de pureza superiores, se requirió repetir varias veces el mismo procedimiento.

Al combinar el intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-50 con gel filtración sobre Sephadex G-100 se obtuvieron mejores resultados.

En 1968, Tomar [122] purificó Sk partiendo de una preparación de Varidasa con el empleo de un procedimiento diferente, al fraccionar esta mediante una cromatografía sobre hidroxapatita o precipitación con sulfato de amonio. La precipitación entre el 40 y el 50% de sulfato de amonio incrementa entre dos y tres veces la actividad específica de la preparación. El precipitado se recuperó por centrifugación y fue dializado con cloruro de sodio. El producto se aplicó en DEAE-celulosa y se eluyó mediante un gradiente.

La cromatografía de afinidad se ha utilizado mucho para la purificación de Sk. Uno de los primeros procedimientos utilizó la plasmina tratada con diisopropilfluorofosfato (DIP) inmovilizada sobre sefarosa [123]. La obtención del ligando se realizó por el tratamiento del plasminógeno con Uk para obtener la plasmina y luego se inhibió la actividad proteolítica de esta con el DIP. Este proceso provocó la pérdida del 30% de la actividad, por la incompleta inhibición de la plasmina inmovilizada.

En la literatura también se ha descrito el uso de la inmunoafinidad para la purificación de la Sk [124].

Otro esquema de purificación fue el empleo de plasminógeno humano o plasmina acilada inmovilizada en soporte de sefarosa [125]. La acilación del plasminógeno o la plasmina se realizó con p-nitrofenil p-guanidinobenzoato (NPGb). Esta permitió el uso de este ligando en la afinidad sin requerir una activación previa del plasminógeno a plasmina, lo cual redujo considerablemente la proteólisis de la Sk por la plasmina inmovilizada. La combinación de plasminógeno sefarosa con un sistema de afinidad y el empleo de anticuerpo monoclonal como ligando, se utilizó para la purificación de Sk, obteniéndose un producto con el 93% de pureza [59].

El uso de NPGb como agente acilante del plasminógeno para la purificación de Sk se utilizó con un tampón con urea como eluyente [126], con un factor de purificación de 9 veces y un recobrado mayor del 90%. La actividad específica del material purificado fue de 74 000 UI/mg.

58. Siefring GE, Castellino FJ. Interaction of streptokinase with plasminogen: isolation and characterization of a streptokinase degradation product. *J Biol Chem* 1976;251:3913-20.

59. Rodríguez P, Fuentes D, Muñoz E, Rivero D, Orta D, Albuquerque S *et al.* The streptokinase domain responsible for plasminogen binding. *Fibrinolysis* 1994; 8:276-85.

60. Reed GL, Lin LF, Parhami-Seren B, Kussie P. Identification of a plasminogen binding region in streptokinase that is necessary of the creation of a functional streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry* 1995;34:10266-71.

61. Chibber BAK, Castellino FJ. Regulation of the streptokinase-mediated activation of human plasminogen by fibrinogen and chloride ions. *J Biol Chem* 1986;261:5289-95.

62. Marder VJ, Sherry S. Thrombolytic therapy. Current status. *N Engl J Med*, 1988;318:1512-20,1585-95.

63. Wu XC, Ye RQ, Duan YJ, Wong SL. Engineering of plasmin-resistant forms of streptokinase and their production in *Bacillus subtilis*: streptokinase with longer functional half-life. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:824-9.

64. ISIS-2(Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group: Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction; ISIS-2. *Lancet* 1988;ii:349-60.

65. Smith RAG, Dupe RJ, English PD, Green J. Fibrinolysis with acyl-enzymes: a new approach to thrombolytic therapy. *Nature* 1981;290:505-8.

66. Monk JP, Heal RC. Anisoylated plasminogen streptokinase activator complex (APSAC). A review of its mechanism of action, clinical pharmacology and therapeutic use in acute myocardial infarction. *Drugs* 1987;34:25-49.

67. Fay WP, Bokka LV. Functional analysis of the amino- and carboxyl-termini of streptokinase. *Thromb Hemost* 1998; 79:985-91.

68. Medved LV, Solovjov DA, Ingham KC. Domain structure, stability and interactions in streptokinase. *Eur J Biochem* 1996; 239:333-9.

69. Lee SH, Kim IC, Bae KH, Byun SM. Enhanced production and secretion of streptokinase into extracellular medium in *Escherichia coli* by removal of 13 N-terminal amino acids. *Biotechnol Lett* 1997;19:151-4.

70. Wang SG, Reed GL, Hedstrom L. The deletion of Ile1 changes the mechanism of streptokinase. *FASEB J* 1999;13:A1535.

71. Torrens I, Ojalvo AG, Seralena A, de la Fuente J. Study of antigenic regions of streptokinase. *Thromb Hemost* 1999; 2288:Suppl S.

72. Torrens I, Ojalvo AG, Seralena A, Hayes O, de la Fuente J. A mutant streptokinase lacking the C-terminal 42 amino acids is less immunogenic. *Immunol Lett* 1999b;70:213-8.

La Sk ha sido purificada también del filtrado del cultivo de estreptococos con el uso de soportes de hidrofobicidad, como fenil sefarosa y octil sefarosa, con elusión por medio de un gradiente de sulfato de amonio y la combinación de esta con pasos de intercambio iónico y gel de filtración.

La purificación de Sk recombinante expresada de forma intracelular e insoluble en *E. coli*, se realizó a partir de la ruptura celular mecánica, solubilización con urea, y posterior a la renaturalización de la proteína en gel filtración se realizó un paso de hidrofobicidad (TSK-butilo) y un intercambio iónico que permitieron obtener un producto con una pureza mayor al 99%, una actividad específica superior a 70 000 UI/mg y un recobrado de proceso del 49% [121]. Al purificar Sk recombinante producida en cuerpos de inclusión de *E. coli* se obtuvo un rendimiento similar (45%) y una pureza del 97% [97].

Estreptoquinasa: posición actual en el mercado

La Sk natural como producto para uso clínico apareció en el mercado hace varios años. Las compañías líderes de este producto fueron la Hoescht Marion Roussel y la Kabivitrum (Pharmacia and Upjohn) que registraron el producto como Streptase® y Kabikinase®, que actualmente cubren una parte significativa del mercado. Otros productores farmacéuticos han obtenido la licencia para su producción. El producto genérico puede encontrarse bajo los nombres de Propinase® (Emcure Pharmaceuticals Ltd), Ekinase® (Dabur Pharmaceuticals Ltd), Stapase® (Cadila Pharmaceuticals Ltd), Ickinase® (ICI India Limited), Thrombosolv® (VHB Life Sciences), Fibrokinase® (Otsira Genetica), Solustrep® (DONG KOOK PHARM Co. Ltd), Zikinase® (Indon).

A las preparaciones naturales de Sk, se suman las recombinantes: Heberkinasa®, comercializada por HEBER BIOTEC. Fue la primera Sk recombinante que apareció en el mercado. Se evaluó clínicamente por los estudios TERIMA [127] que incluyó 224 pacientes y comparó una preparación natural con la recombinante. Se demostró que no existen diferencias entre ambos productos y que los beneficios que se obtienen con la preparación natural pueden ser esperados para la Sk recombinante. TERIMA-2 [128], fue la extensión del uso de Heberkinasa® en 52 hospitales y 2 923 pacientes. De esta forma se amplió el empleo del producto y probó su potencialidad para disminuir la mortalidad (28% de reducción de la mortalidad intrahospitalaria) en pacientes con infarto agudo del miocardio. El nivel de anticuerpos y la actividad neutralizante en pacientes tratados con Heberkinasa® y Streptase® se evaluó en el estudio TERIMA, en el que se demostró que para ambas preparaciones el nivel de anticuerpos, un año después de la infusión del producto, fue baja, lo cual puede permitir la readministración del medicamento [129].

Heberkinasa® se ha utilizado también en pacientes con trombosis de válvulas cardíacas y en la trombosis venosa profunda. En el primer caso se realizó un ensayo clínico en 15 pacientes con trombosis en prótesis de válvulas cardíacas. Entre el 30 y el 50% de estos casos, la obstrucción se presenta independiente de la anticoagulación a que se mantienen estos pacientes. La administración se realizó con una dosis de ataque

de 250 000 UI durante 30 minutos y una dosis de mantenimiento de 100 000 UI por hora durante 72 horas o menos. Los resultados se monitorearon por la evaluación imagenológica de la lisis del trombo. La terapia trombolítica en estos pacientes es una alternativa segura para las trombosis de las prótesis. Aun cuando sea incompletamente efectiva, puede dar tiempo adicional para preparar al paciente para la cirugía y protegerlo de embolias distales durante la intervención quirúrgica.

En la trombosis venosa profunda, Heberkinasa® se utilizó en un grupo de pacientes que recibieron una dosis inicial de 250 000 UI, aplicada por vía intravenosa en un plazo de 30 minutos, seguido de una dosis de mantenimiento de 100 000 UI por hora en infusión continua durante 24 a 72 horas, en dependencia del momento de disolución del trombo. Hubo una disolución del trombo en el 100% de los pacientes. Esta respuesta se clasificó como total o parcial. La incidencia de sospecha de reacciones adversas en la población estudiada fue elevada, pero estas fueron controlables y no pusieron en riesgo la vida de los pacientes.

Estos resultados aumentan el soporte científico del uso de este producto por el bajo grado de severidad de las reacciones adversas y por la tolerancia del medicamento.

El tratamiento del derrame pleural tabicado paraneumónico complicado (DBTPC) y los empiemas pleurales (EP) también se trataron con este producto en un ensayo piloto en 4 pacientes (3 casos con DBTPC y 1 caso de EP). Las dosis, como en los casos anteriores, son elevadas y en ocasiones llevan la administración del producto durante 2 a 4 días. Se obtuvo una resolución completa del cuadro con reexpansión del pulmón afectado en 3 pacientes. La mejoría fue evidente tras el examen radiológico. Estos resultados sugieren que el tratamiento de estas afecciones con Heberkinasa® puede ser eficaz y seguro.

Recientemente apareció en el mercado la Shankinase® de Shantchi Biotechnics de origen recombinante.

Dentro del mercado de los medicamentos trombolíticos, la Sk ocupa un segmento importante, sobre todo en el mercado de los países menos desarrollados. El costo de una dosis de un medicamento trombolítico de segunda o tercera generación puede superar los \$ 2 196.00* para Alteplase o Reteplase, y los \$ 2 750.00* en el caso de Tecnetepase, el costo de la Sk puede ser 10 veces menor.

Un análisis de la trombólisis temprana en el infarto agudo del miocardio y su evaluación económica se realizó por Boland *et al.* (2003). Este trabajo incluyó los análisis realizados desde 1980 hasta el año 2001 y el criterio fundamental para su inclusión fue la comparación entre las drogas (Alteplase, Reteplase, Sk y Tecnetepase) en el tratamiento temprano del infarto agudo del miocardio.

Finalmente, se consideraron los resultados de 20 trabajos reportados en 50 artículos, 14 de estos correspondían a estudios comparativos y la suma de los pacientes que recibieron algún tratamiento trombolítico fue de 142 907. Los resultados pretendían llegar a conclusiones que esclarecieran la incógnita de: ¿Cuál es el trombolítico más adecuado para el tratamiento del infarto agudo del miocardio?

Las conclusiones de este trabajo se basaron en la eficacia del tratamiento trombolítico (mortalidad entre

73. Robinson BR, Liu L, Houg AK, Sazanava IV, Reed GL. The streptokinase beta domain plays a critical role in activator complex formation and substrate docking. *Circulation* 2000;102:490.

74. Wakeham N, Terzyan S, Zhai PZ, Loy JA, Tang J, Zhang XC. Effects of deletion of streptokinase residues 48-59 on plasminogen activation. *Protein Eng* 2002;15:753-61.

75. Sundram V, Nanda JS, Rajagopal K, Dhar J, Chaudhary A, Sahni G. Domain truncation studies reveal that the streptokinase-plasmin activator complex utilizes long range protein-protein interactions with macromolecular substrate to maximize catalytic turnover. *J Biol Chem* 2003;278:30569-77.

76. Shi GY, Chang BI, Su SW, Young KC, Wu DH, Chang LC *et al.* Preparation of a novel streptokinase mutant with improved stability. *Thromb Hemost* 1998;79:992-7.

77. Pratap J, Rajamohan G, Dikshit KL. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*: differential resistance of SK to proteolysis by glycosylation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:469-75.

78. Koide A, Suzuki S, Kobayashi S. Preparation of polyethylene glycol-modified streptokinase with disappearance of binding ability towards antiserum and retention of activity. *FEBS Lett* 1982;143:73-6.

79. Rajagopalan S, Gonias SL, Pizzo SV. A non-antigenic covalent streptokinase polyethylene glycol complex with plasminogen activator function. *J Clin Invest* 1985;75:413-9.

80. Reed GL, Kussie P, Parhamiseren B. A functional analysis of the antigenicity of streptokinase using monoclonal antibody mapping and recombinant streptokinase fragments. *J Immunol* 1993;150:4407-15.

81. Parhamiseren B, Keel T, Reed GL. Structural characterization of immunodominant regions of streptokinase recognized by murine monoclonal antibodies. *Hybridoma* 1996;15:169-76.

82. Parhamiseren B, Keel T, Reed GL. Sequences of antigenic epitopes of streptokinase identified via random peptide libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1997;271:333-41.

83. Coffey JA, Jennings KR, Dalton H. New antigenic regions of streptokinase are identified by affinity-directed mass spectrometry. *Eur J Biochem* 2001;268:5215-21.

84. Ojalvo AG, Pozo L, Labarta V, Torrens I. Prevalence of circulating antibodies against a streptokinase C-terminal peptide in normal blood donors. *Biochem Biophys Res Commun* 1999a;263:454-9.

85. Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. *J Exp Med* 1933;57:571-95.

86. Christensen LR. Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction due to serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. *J Gen Physiol* 1945;28:363-83.

87. Feldman LJ. Streptokinase manufacture. In German. German patent DE 2354019 (1974).

los 30 y 35 días). La Sk es tan efectiva como la infusión de Alteplase. El Tecnetepase es tan efectivo como la aplicación de un bolo de Alteplase y Reteplase es tan efectivo como la Sk.

Nuevas preguntas pudieran generar estos resultados: ¿Es Tecnetepase superior a la Sk o no?

¿Puede Reteplase ser tan efectivo como Tecnetepase?

Responder estas preguntas puede requerir la realización de nuevos estudios clínicos; un análisis estadístico por sí solo no ofrece la respuesta adecuada.

Lo que sí queda claro del análisis realizado es que luego del tratamiento trombolítico con cualquiera de las drogas analizadas, la mortalidad es baja.

Las complicaciones por enfermedades cerebrovasculares fueron significativas tras el empleo de estas drogas, con una velocidad menor para la Sk, que sin embargo ocasionó el mayor porcentaje de reacciones alérgicas.

La evaluación económica de la terapia trombolítica y la similitud de los resultados clínicos, evidencia que

la relación costo-beneficio puede estar determinada por el costo de adquisición de la droga, lo cual, sin duda, desplaza ampliamente la balanza de costo-efectividad hacia la Sk.

Conclusiones

La Sk es el medicamento trombolítico más antiguo. Sin dudas uno de los mejores caracterizados y evaluados clínicamente. El más prescrito aun para el tratamiento del infarto agudo del miocardio, con un costo de producción atractivo si se compara con sus homólogos. Sus reacciones adversas están muy bien definidas y pueden ser clínicamente tratadas.

La comprensión de su estructura-función pudiera permitir, en un futuro cercano, la obtención de modificaciones de la molécula que ayuden a reducir las reacciones alérgicas que provocan y que le permitan permanecer en un mercado que por el momento comparte satisfactoriamente con las nuevas generaciones de medicamentos trombolíticos.

*Costo/dosis. Tomado de la American Heart Association

88. Malke H, Roe B, Ferretti J. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene* 1985; 34:357-62.
89. Hagenson MJ, Holden KA, Parker KA, Wood PJ, Cruze JA, Fuke Met al. Expression of streptokinase in *Pichia pastoris* yeast. *Enzyme Microb Technol* 1989;11:650-6.
90. Wong SL, Ye RQ, Nathoo S. Engineering and production of streptokinase in *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:517-23.
91. Gase K, Ellinger T, Malke H. Complex transcriptional control of the streptokinase gene of *Streptococcus equisimilis* H46A. *Mol Gen Genet* 1995;247:749-58.
92. Grafe S, Ellinger T, Malke H. Structural dissection and functional analysis of the complex promoter of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Med Microbiol Immun* 1996;185:11-7.
93. Estrada MP, Hernández L, Pérez A, Rodríguez P, Serrano R, Rubiera R et al. High-level expression of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1992;10:1138-42.
94. Ko JH, Park DK, Kim IC, Lee SH, Byun SM. High-level expression and secretion of streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 1995;17:1019-24.
95. Lee Sh, Kim IC, Bae KH, Byun SM. Enhanced production and secretion of streptokinase into extracellular medium in *Escherichia coli* by removal of 13 N-terminal amino acids. *Biotechnol Lett* 1997;19:151-4.
96. Yazdani SS, Mukherjee KJ. Overexpression of streptokinase using a fed-batch strategy. *Biotechnol Lett* 1998;20:923-7.
97. Zhang XW, Sun T, Huang XN, Liu X, Gu DX, Tang ZQ. Recombinant streptokinase production by fed-batch cultivation of *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 1999;24:647-50.
98. Yazdani SS, Mukherjee KJ. Continuous culture studies on the stability and expression of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst Eng* 2002;24:341-6.
99. Muller J, Malke H. Duplication of the streptokinase gene in the chromosome of *Streptococcus equisimilis* H46A. *FEMS Microbiol Lett* 1990;72:75-8.
100. Estrada MP, Felipe AP, Chaple RR, Serrano R, Hernández L, Rodríguez P, et al., inventors; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba, assignee. Method for the isolation of a gene which codes for streptokinase, nucleotide sequence obtained, recombinant DNA and transformed microorganisms. US patent 5,296,366. 1994 Mar 22.
101. Bernheimer AW, Gillman W, Hottle GA, Pappenheimer AM. An improved medium for the cultivation of hemolytic streptococcus. *J Bacteriol* 1942;43:495-8.
102. Ozegowski JH, Gerlach D, Kohler W. Influence of physical parameters on the production of streptococcal extracellular proteins in cultures with stabilized pH: 2. Temperature dependence of extracellular protein production. *Zentralbl Bakteriol, Microbiol Hyg* 1983;254:361-9.
103. Remmert LMF, Cohen PP. Partial purification and properties of a proteolytic enzyme of human serum. *J Biol Chem* 1949;181:431-48.
104. Mullertz S. Formation and properties of the activator of plasminogen and of human and bovine plasmin. *Biochem J* 1955;61:424-34.
105. Derechin M. Hydrolysis of some casein fractions with lasmin. *Biochem J* 1962; 82:42-7.
106. Wallen P. Purification of human plasminogen: I. The purification of a partially purified human plasminogen with a low spontaneous proteolytic activity. *Ark Kemi* 1962;19:451-68.
107. Tomar RH. Streptokinase: preparation, comparison with streptococcal proteinase, and behavior as a trypsin substrate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;127:239-44.
108. Saksela O. Radial caseinolysis in agarose: a simple method for detection of plasminogen activators in the presence of inhibitory substances and serum. *Anal Biochem* 1981;111:276-82.
109. Permin PM. Properties of the fibrinokinase-fibrinolysin system. *Nature* 1947; 160:571-2.
110. Marsh NA, Gaffney PJ. The rapid fibrin plate-a method for plasminogen activator assay. *Thromb Hemost* 1977;38:545-51.
111. Westlund LE, Andersson LO. Variables influencing the clot lysis assay of streptokinase. *Thromb Res* 1991;64:713-21.
112. Mullertz S. Effect of carboxylic and amino acids on fibrinolysis produced by plasmin, plasminogen activator, and proteinases. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954;85:326-9.
113. Troll W, Sherry S, Wachman J. The action of plasmin on synthetic substrates. *J Biol Chem* 1954;208:85-93.
114. Klüne DL, Fishman JB. A simplified procedure for the isolation of purified human plasmin. *Proc Intern Symp, Anticoagulants Fibrinolysins, Toronto; 1961*. p. 360-4.
115. Kline DL, Fishman JB. Improved procedure for the isolation of human plasminogen. *J Biol Chem* 1961;236:3232-4.
116. Sherry S, Alkjaersig N, Fletcher AP. Assay of urokinase preparations with the synthetic substrate acetyl-L-lysine methyl ester. *J Lab Clin Med* 1964;64:145-53.
117. Kulisek ES, Holm SE, Johnston KH. A chromogenic assay for the detection of plasmin generated by plasminogen activator immobilized on nitrocellulose using a para-nitroanilide synthetic peptide substrate. *Med Anal Biochem* 1989;177:78-84.
118. Hernández L, Rodríguez P, Castro A, Serrano R, Rodríguez MP, Rubiera R. Determinación de actividad Sk utilizando un ensayo cuantitativo. *Biotecnología Aplicada* 1990;7(2): 153-60.
119. Taylor FB, Botts J. Purification and characterization of streptokinase with studies of streptokinase activation of plasminogen. *Biochemistry* 1968;7:232-42.
120. Einarsson M, Skoog B, Forsberg B, Einarsson R. Characterization of highly purified native streptokinase and altered streptokinase after alkaline treatment. *Biochim Biophys Acta* 1979;568:19-29.

121. Pérez N, Urrutia E, Camino J, Orta DR, Torres Y, Martínez Y, *et al.* Hydrophobic interaction chromatography applied to purification of recombinant streptokinase. *Minerva Biotecnologica* 1998;10:174-7.
122. Tomar RH. Streptokinase: preparation, comparison with streptococcal proteinase, and behavior as a trypsin substrate. *Proc Soc Exp Biol Med* 1968;127:239-44.
123. Castellino FJ, Sodetz JM, Brockway WJ, Siefring GE. Streptokinase. *Methods Enzymol* 1976;45:244-57.
124. Andreas EM. Affinity chromatographic purification of streptokinase with monoclonal antibodies. *Allerg Immunol (Leipzig)* 1990;36:277-85.
125. Rodríguez P, Hernández L, Muñoz E, Castro A, Fuente JDL, Herrera L. Purification of streptokinase by affinity chromatography on immobilized acylated human plasminogen. *BioTechniques* 1992;12:424.
126. Liu L, Houng A, Tsai J, Chowdhry S, Sazonova I, Reed GL. The fibronectin motif in the NH2-terminus of streptokinase plays a critical role in fibrin-independent plasminogen activation. *Circulation* 1999;100(Suppl S):1.
127. The TERIMA Group Investigators. Multi-center, Randomized, Comparative Study of Recombinant vs Natural Streptokinases in Acute Myocardial Infarct (TERIMA). *Thromb Haemost* 1999;82:1605-9.
128. The TERIMA Group Investigators. TERIMA-2: National Extension of Thrombolytic Treatment with Recombinant Streptokinase in Acute Myocardial Infarct in Cuba. *Thrombosis and Haemostasis* 2000;84:949-54.
129. Mainet D, del Rosario M, Toruncha A, Prats P, Valenzuela C, López Saura P. Similar more than 6 months persisted, antibody and neutralizing with acute myocardial infarction treated with recombinant or natural streptokinase. *Fibrinolysis and Proteolysis* 1998;12(5):301-9.

Recibido en octubre de 2004. Aprobado en mayo de 2005.