



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021014068-9 A2



(22) Data do Depósito: 24/01/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 21/09/2021

(54) Título: PLASMINOGÊNIO PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE MICROTROMBOSE

(51) Int. Cl.: A61K 38/48; A61P 7/02.

(30) Prioridade Unionista: 24/01/2019 EP 19153572.3.

(71) Depositante(es): PREVIPHARMA CONSULTING GMBH.

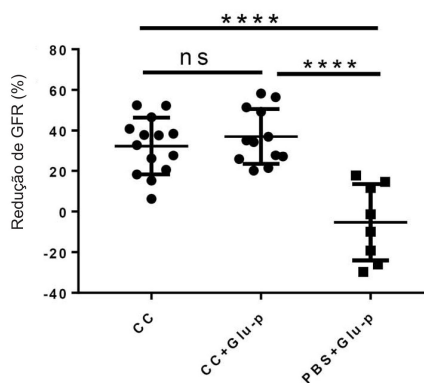
(72) Inventor(es): STEPHAN T. KIESSIG; RICARDA WELZ; HANNE RIEKE GERDING; MARC MAZUR; HANS-JOACHIM ANDERS; CHONGXU SHI; CHRISTOPH SCHIMMELPFENNIG; SATISH KUMAR DEVARAPU.

(86) Pedido PCT: PCT EP2020051733 de 24/01/2020

(87) Publicação PCT: WO 2020/152322 de 30/07/2020

(85) Data da Fase Nacional: 16/07/2021

(57) Resumo: PLASMINOGÊNIO PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE MICROTROMBOSE . A presente invenção refere-se a plasminogênio para uso em um método de prevenção ou tratamento de um evento trombótico em um paciente, em que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**“PLASMINOGÊNIO PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE
MICROTROMBOSE”.**

[001] A presente invenção refere-se ao plasminogênio (PLG) para uso em um método de prevenção ou tratamento de um evento trombótico em um paciente, em que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos. A presente invenção também se refere ao plasminogênio (PLG) para uso em um método para a lise de microtrombos e na profilaxia de microtrombos em um paciente com uma deficiência de plasminogênio (PLG) congênita ou adquirida.

[002] Eventos trombóticos, em particular microtrombos, podem causar sérios problemas de saúde. Por exemplo, infartos coronarianos, AVC e embolias pulmonares são algumas das principais causas de morte no mundo desenvolvido. Portanto, há uma grande necessidade de tratar e prevenir eventos trombóticos. Em particular, os microtrombos, ou seja, eventos trombóticos de pequeno porte, em particular de ocorrência no sistema capilar, não são facilmente tratáveis em um paciente.

[003] A formação de um evento microtrombótico pode ter várias razões, como, por exemplo, intervenções cirúrgicas, como uma cirurgia vascular (por exemplo, cirurgia de revascularização miocárdica), a presença de uma endoprótese (ou seja, a inserção de corpos estranhos / implantes ou transplantes, por exemplo, endoprótese de vaso sanguíneo / vascular) ou uma lesão traumática por estenose. Várias outras causas são conhecidas.

[004] O tratamento de trombozes geralmente é feito por administração de medicamentos. Para evitar que o trombo se amplie, busca-se uma inibição da anticoagulação. São utilizados preparados de heparina ou inibidores do fator Xa. Quando o crescimento do coágulo para, o corpo pode começar a limpar os danos. O corpo normalmente

desintegra o coágulo e tenta liberar as veias (revascularizadas) novamente. Isso geralmente leva vários dias, semanas ou até meses, quanto mais regiões do sistema venoso forem afetadas, mais tempo. Na desintegração do coágulo e na regeneração das veias, substâncias são liberadas, o que aumenta a capacidade de coagulação do sangue.

[005] Durante esse tempo, o risco de um evento trombótico repetido/renovado é particularmente alto. Por isso, muitas vezes são evitados outros medicamentos anticoagulantes. 4-Hidroxycumarinas, como femprocumona, varfarina ou etilbiscoumacetato, são usadas por cerca de três a seis meses. O uso de cumarinas geralmente requer exames de sangue regulares e atenção especial, porque os fármacos impedem a trombose, mas também aumentam a pré-disposição ao sangramento. Acima de tudo, esse risco de sangramento devido à terapia anticoagulante ainda é um problema não resolvido na prática clínica diária. Apesar da terapia antitrombótica, ainda é necessária uma quantidade residual de coagulação nas doenças mencionadas acima. Em primeiro lugar, após todas as cirurgias, a cicatrização da ferida requer que a coagulação interrompa o sangramento dentro das feridas. O coágulo em si é a base para a invasão de células que são necessárias para o reparo do tecido (fibroblastos). Eles usam a rede de fibrina para prender a ferida, para construir novas fibras de colágeno, para re(construir) o novo tecido. A cicatrização de feridas geralmente tem quatro fases:

[006] Fase I - Fase de Hemostasia: é o processo de fechamento da ferida por coagulação. A hemostasia começa quando o sangue vaza para fora do corpo. O primeiro passo da hemostasia é quando os vasos sanguíneos se contraem para restringir o fluxo sanguíneo. Em seguida, as plaquetas se unem para vedar a ruptura na parede do vaso sanguíneo. Por fim, a coagulação ocorre e reforça o tampão plaquetário com fios de fibrina que são como um agente de ligação molecular. O

estágio de hemostasia da cicatrização de feridas acontece muito rapidamente. As plaquetas aderem à superfície do subendotélio em segundos após a ruptura da parede epitelial de um vaso sanguíneo. Depois disso, os primeiros fios de fibrina começam a aderir em cerca de sessenta segundos. À medida que a malha de fibrina começa, o sangue é transformado de líquido em gel por meio de pró-coagulantes e da liberação de protrombina. A formação de um trombo ou coágulo mantém as plaquetas e as células sanguíneas presas na área da ferida. O trombo é geralmente importante nas fases da cicatrização de feridas, mas se torna um problema se ele se desprende da parede do vaso e passa pelo sistema circulatório, podendo causar um acidente vascular cerebral, embolia pulmonar ou ataque cardíaco. Sabe-se que a degradação mais rápida do coágulo de fibrina caracteriza os pacientes com embolia pulmonar central com baixo risco de embolia periférica recorrente (cf. Kupis *et al*, *Scientific Reports*, 2019, 9:72).

[007] Fase II - Fase Inflamatória: A inflamação é a segunda fase da cicatrização de feridas e começa logo após a lesão, quando os vasos sanguíneos lesionados vazam transudato (feito de água, sal e proteína), causando inchaço localizado. A inflamação controla o sangramento e impede a infecção. O ingurgitamento de fluidos permite que as células de cura e reparo se movam para o local da ferida.

[008] Durante a fase inflamatória, células danificadas, agentes patogênicos e bactérias são removidos da área da ferida. Esses glóbulos brancos, fatores de crescimento, nutrientes e enzimas criam inchaço, calor, dor e vermelhidão, comumente vistos durante este estágio de cicatrização de feridas. A inflamação é uma parte natural do processo de cicatrização de feridas e só é problemática se prolongada ou excessiva.

[009] Fase III - Fase Proliferativa: a fase proliferativa da cicatrização de feridas ocorre quando a ferida é reconstruída com novo

tecido composto de colágeno e matriz extracelular. Na fase proliferativa, a ferida se contrai à medida que novos tecidos são construídos. Além disso, uma nova rede de vasos sanguíneos deve ser construída para que o tecido de granulação possa ser saudável e receber oxigênio e nutrientes suficientes. Os miofibroblastos fazem com que a ferida contraia, agarrando as bordas da ferida e puxando-as juntas usando um mecanismo semelhante ao das células musculares lisas. Em estágios saudáveis da cicatrização de feridas, o tecido de granulação é rosa ou vermelho e de textura irregular. Além disso, o tecido de granulação saudável não sangra facilmente. Tecido de granulação escuro pode ser um sinal de infecção, isquemia ou perfusão deficiente. Na fase final do estágio proliferativo da cicatrização de feridas, as células epiteliais recobrem a lesão. É importante lembrar que a epitelização acontece mais rapidamente quando as feridas são mantidas úmidas e hidratadas. Geralmente, quando curativos oclusivos ou semioclusivos são aplicados dentro de 48 horas após a lesão, eles manterão a umidade correta do tecido para otimizar a epitelização.

[0010] Fase IV - Fase de Maturação: também chamada de estágio de remodelação da cicatrização de feridas, a fase de maturação é quando o colágeno é remodelado do tipo III para o tipo I e a ferida se fecha totalmente. As células que foram usadas para reparar a lesão, mas que não são mais necessárias, são removidas por apoptose ou morte celular programada. Quando o colágeno é disposto durante a fase proliferativa, ele é desorganizado e a ferida é espessa. Durante a fase de maturação, o colágeno é alinhado ao longo das linhas de tensão e a água é reabsorvida, para que as fibras de colágeno possam ficar mais próximas umas das outras e se reticularem. A reticulação do colágeno reduz a espessura da cicatriz e também torna a área da pele da ferida mais forte. Geralmente, a remodelação começa aproximadamente 21 dias após uma lesão e pode continuar por um ano ou mais. Mesmo com

a reticulação, as áreas cicatrizadas da ferida continuam a ser mais fracas do que a pele não lesionada, geralmente tendo apenas 80% da força de tração da pele não ferida.

[0011] Os estágios da cicatrização de feridas são um processo complexo e frágil. A falha no progresso nos estágios de cicatrização de feridas pode levar a lesões crônicas. Fatores que levam a lesões crônicas são doença venosa, infecção, diabetes e deficiências metabólicas dos idosos. Apesar das terapias anticoagulantes, é necessária uma atividade de coagulação residual para o processo de cicatrização de feridas, bem como a fibrinólise, que ocorre paralelamente à fase proliferativa e de maturação.

[0012] A maioria dos fármacos anticoagulantes conhecidos na arte tem sérias desvantagens e frequentemente causam riscos significativos à saúde. Problemas relacionados à coagulação podem ser causados, por exemplo, por insuficiência hepática desconhecida ou por uma dosagem excessiva dos fármacos anticoagulantes. O local fibrinolítico não está atualmente em foco. Uma observação de ambos os lados pode ajudar a melhorar os resultados dos tratamentos. Um tratamento aprimorado é desejado.

[0013] O tPA (ativador de plasminogênio tecidual ou uPA (uroquinase)) atualmente usado é aplicado como uma terapia indireta que requer pelo menos um nível normal de plasminogênio (PLG). O tPA normalmente ativa o plasminogênio (PLG) em plasmina. Isso é usado para dissolver um trombo já formado que pode causar danos consecutivos adicionais ao tecido. As terapias podem falhar se houver quantidade insuficiente de plasminogênio (PLG) disponível. Isso foi verificado em cerca de um terço de todos os pacientes sob “terapia de lise” (Stubblefield WB, Alves NJ, Rondina MT, Kline JA: *Variable Resistance to Plasminogen (PLG) Activator Initiated Fibrinolysis for Intermediate-Risk Pulmonary Embolism*. PLoS One. 11 De fevereiro de

2016; 11(2):e0148747. doi: 10.1371/journal.pone.0148747. eCollection 2016.; Cullis JO, Chisholm M, Ackery DM: *Unresolved pulmonary embolism: the role of fibrinolysis. Nucl Med Commun.* Janeiro de 1993;14(1):4-7).

[0014] Misturas de diferentes tipos de plasminogênio (PLG) também apresentam desvantagens significativas quando administradas ao paciente.

[0015] O Documento WO 2018/162754 ensina que Glu-plasminogênio pode ser obtido a partir do plasma sanguíneo e frações do plasma, em particular, plasma pobre em crioprecipitado (*cryo-poor plasma*), plasma pobre em crioprecipitado reduzido por uma ou duas etapas de absorção (F IX/PCC ou Inibidor da C1-Esterase), Pasta I-II-III ou pasta de ácido octanoico, e pode servir como um agente farmacêutico eficaz para tratar um paciente que sofre ou que corre o risco de desenvolver infartos de órgãos.

[0016] O Documento US 5,597,800 ensina o tratamento do edema cerebral por meio de Lys-plasminogênio. Além disso, são descritas as terapias gerais de substituição da administração de plasminogênio (PLG) (cf. Shapiro *et al.*, Blood, 2018, 131:1301-1310; Schott *et al.*, *The New England Journal of Medicine*, 1998, 339:1679-1686).

[0017] O Documento WO 2017/077380 ensina uma terapia de suplementação de plasmin(ogênio). Este documento não ensina a prevenir ou tratar microtrombos com diâmetros inferiores a 1 mm. Além disso, o documento WO 2017/077380 não parece se referir ao Glu-plasminogênio no sentido da presente invenção, pois o plasmin(ogênio) como usado no contexto do documento WO 2017/077380 apresenta atividade proteolítica significativa. Neste contexto, o documento WO 2017/077380 ensina que o plasminogênio, tal como nele utilizado, degrada a fibrina (cf. WO 2017/077380, página 25, linhas 24 e 25 e página 30, linha 24). Em contraste, Glu-plasminogênio no sentido da

presente invenção, ao contrário de plasmina e Lys-plasminogênio, não tem (essencialmente) atividade proteolítica.

[0018] O Documento EP A 3395359 ensina um método para prevenir e/ou eliminar uma trombose arterial e venosa em um indivíduo. Além disso, este documento não ensina a prevenção ou tratamento de microtrombos com diâmetros inferiores a 1 mm. Além disso, o documento EP A 3395359 não se refere ao Glu-plasminogênio. Por outro lado, o plasminogênio (PLG), como ensinado no documento EP A 3395359, tem atividade proteolítica, enquanto o Glu-plasminogênio no sentido da presente invenção não tem (essencialmente) atividade proteolítica. O documento EP A 3395359 concentra-se em proteínas de 810 aminoácidos de comprimento como plasminogênio (PLG), portanto, uma proteína diferente do Glu-plasminogênio.

[0019] No entanto, ainda é particularmente difícil tratar e prevenir microtrombos, ou seja, eventos trombóticos de pequeno tamanho de um diâmetro inferior a 1 mm. Os meios para o tratamento de trombos concentram-se principalmente no tratamento de trombos de grande porte, após a ocorrência desses trombos. Entretanto, há também o desejo de profilaxia de eventos trombóticos, bem como de tratamento e prevenção de eventos microtrombóticos em um paciente.

[0020] Surpreendentemente, verificou-se experimentalmente que o plasminogênio (PLG), em particular o Glu-plasminogênio, pode ser muito efetivamente utilizado como método para prevenir ou tratar eventos trombóticos, em particular a formação de microtrombos, em um paciente.

[0021] A presente invenção se refere ao plasminogênio (PLG), em particular Glu-plasminogênio, para uso em um método de prevenção ou tratamento de evento trombótico em um paciente. Mais particularmente, a presente invenção se refere ao plasminogênio (PLG) para uso em um método para prevenir ou tratar um evento trombótico em um paciente,

em que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos.

[0022] Em outras palavras, a presente invenção se refere a um método para prevenir ou tratar um evento trombótico em um paciente, em que o referido paciente é administrado com uma quantidade suficiente de plasminogênio (PLG), em particular Glu-plasminogênio. Mais especificamente, a presente invenção se refere a um método de prevenção ou tratamento de um evento trombótico em um paciente, em que o referido paciente é administrado com uma quantidade suficiente de plasminogênio (PLG) e em que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos com diâmetros inferiores a 1 mm.

[0023] Um aspecto da presente invenção se refere ao plasminogênio (PLG) para uso em um método para prevenir ou tratar um evento microtrombótico em um paciente, em que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos.

[0024] Outro aspecto da presente invenção se refere ao plasminogênio (PLG) para uso em um método para tratar um evento trombótico em um paciente, em que o paciente sofre de microtrombos com diâmetros inferiores a 1 mm.

[0025] Normalmente, o paciente sofre ou corre o risco de desenvolver uma infinidade de microtrombos. O paciente sofre ou corre o risco de desenvolver pelo menos 10, pelo menos 50, pelo menos 100 microtrombos, o que é um evento trombótico.

[0026] De acordo com a presente invenção, o evento trombótico é um microtrombo. Conforme aqui utilizado, o termo “microtrombo” (plural “microtrombos”) pode ser entendido no sentido mais amplo como qualquer trombo tendo um diâmetro máximo em uma das direções espaciais inferior a 1 mm (milímetro), preferencialmente inferior a 0,9 mm, inferior a 0,8 mm, inferior a 0,7 mm, inferior a 0,6 mm, inferior a 0,5 mm, inferior a 0,4 mm, inferior a 0,3 mm, inferior a 0,2 mm ou inferior a

0,1 mm. Será entendido que o diâmetro das direções espaciais restantes pode, opcionalmente, ser maior ou menor, independentemente entre si. Será geralmente entendido que um diâmetro máximo é um comprimento de corte teórico ao cortar teoricamente o microtrombo, onde ele tem sua maior extensão espacial nesta direção. Um microtrombo também pode ser um distúrbio de microcoagulação.

[0027] Assim, em uma modalidade preferida, a presente invenção também se refere ao plasminogênio (PLG) para uso em um método de prevenção ou tratamento de microtrombose em um paciente.

[0028] De preferência, um microtrombo tem diâmetros máximos em duas das três direções espaciais inferiores a 1 mm, de preferência inferiores a 0,9 mm, inferiores a 0,8 mm, inferiores a 0,7 mm, inferiores a 0,6 mm, inferiores a 0,5 mm, inferiores a 0,4 mm, inferiores a 0,3 mm, menos de 0,2 mm ou menos de 0,1 mm. Será entendido que o diâmetro da direção espacial restante pode, opcionalmente, ser maior ou menor.

[0029] De preferência, um microtrombo tem diâmetros máximos nas três direções espaciais inferiores a 3 mm, de preferência inferiores a 2,5 mm, inferiores a 2 mm, inferiores a 1,5 mm, inferiores a 1 mm ou inferiores a 0,5 mm,

[0030] Em especial, quando simultaneamente tendo diâmetros máximos em duas das três direções espaciais inferiores a 1 mm, de preferência inferiores a 0,9 mm, inferiores a 0,8 mm, inferiores a 0,7 mm, inferiores a 0,6 mm, inferiores a 0,5 mm, inferiores a 0,4 mm, inferiores a 0,3 mm, inferiores a 0,2 mm ou inferiores a 0,1 mm.

[0031] Preferencialmente, um microtrombo tem um plano de corte máximo inferior a 2 mm² (milímetros quadrados), preferencialmente inferior a 1,5 mm², inferior a 1 mm², inferior a 0,9 mm², inferior a 0,8 mm², inferior a 0,7 mm², inferior a 0,6 mm², inferior a 0,5 mm², inferior a 0,4 mm², inferior a 0,3 mm², inferior a 0,2 mm² ou inferior a 0,1 mm².

Será entendido em geral que um plano de corte máximo é uma área de superfície de corte teórica ao cortar teoricamente o microtrombo onde ele tem sua extensão espacial mais ampla.

[0032] Em vista do exposto acima, em uma modalidade preferida, o evento trombótico é um trombo de um vaso sanguíneo com diâmetro inferior a 1 mm. Em uma modalidade preferida, o evento trombótico é um trombo de um vaso sanguíneo com diâmetro inferior a 0,9 mm, inferior a 0,8 mm, inferior a 0,7 mm, inferior a 0,6 mm, inferior a 0,5 mm, inferior a 0,4 mm, inferior a 0,3 mm, inferior a 0,2 mm ou inferior a 0,1 mm.

[0033] Em uma modalidade preferida, o evento trombótico é um trombo de um capilar. Em uma modalidade preferida, os microtrombos são microtrombos de capilares.

[0034] Em termos gerais, a presente invenção se refere a um plasminogênio (PLG) e seus derivados ou combinações (Glu-plasminogênio, Lys-plasminogênio e/ou plasmina). A estrutura e a função do sistema plasminogênio (PLG) / plasmina são geralmente conhecidas (cf. Aisina e Mukhametova, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2014, 40:590-605).

[0035] Em uma modalidade particularmente preferida, o plasminogênio (PLG) como usado no contexto da presente invenção é o Glu-plasminogênio. Portanto, ao longo da presente invenção, o plasminogênio (PLG) pode ser especificado como sendo Glu-plasminogênio. Em uma modalidade preferida alternativa, o plasminogênio (PLG) é o Lys-plasminogênio. Em uma modalidade preferida alternativa, o plasminogênio (PLG) é uma combinação de Glu-plasminogênio e Lys-plasminogênio. Neste documento, Lys-plasminogênio e Glu-plasminogênio podem ser combinados em qualquer variação. Em uma modalidade preferida alternativa, o plasminogênio (PLG) é uma combinação de Glu-plasminogênio e Lys-

plasminogênio e um ou mais outros derivados do plasminogênio (PLG). Neste documento, o Lys-plasminogênio e o Glu-plasminogênio e o um ou mais outros derivados do plasminogênio (PLG) podem ser combinados em qualquer variação.

[0036] O Glu-plasminogênio é uma pró-enzima derivada do plasma. Sabe-se que o Glu-plasminogênio não tem (essencialmente) atividade proteolítica.

[0037] Preferencialmente, a composição de plasminogênio (preferencialmente contendo Glu-plasminogênio) administrada ao paciente não tem (essencialmente) atividade proteolítica.

[0038] Esta ausência (essencial) na atividade proteolítica pode ser entendida no sentido mais amplo como geralmente entendido por uma pessoa com habilidade na técnica. De preferência, a atividade enzimática de Glu-plasminogênio e/ou a composição de plasminogênio (preferencialmente contendo Glu-plasminogênio) administrada ao paciente está abaixo de 70 unidades (U, ou seja, $\mu\text{mol}/\text{min}$) por 1,0 g/L de teor total de proteína, ou abaixo de 10, abaixo de 9, abaixo de 8, abaixo de 7, abaixo de 6, abaixo de 5, abaixo de 2, abaixo de 1, abaixo de 0,5, abaixo de 0,1 ou abaixo de 0,01 U por 1,0 g/L do teor total de proteína. Neste contexto, a atividade proteolítica pode ser determinada por qualquer meio. Por exemplo, ela pode ser a atividade determinada por um ensaio da atividade proteolítica de S 2288 (Chromogenix). Alternativamente, também pode ser determinada como a degradação da fibrina em dímeros D. A atividade enzimática específica da plasmina pode ser determinada como degradação da fibrina em dímeros D. Preferencialmente, a atividade proteolítica do Glu-plasminogênio e/ou a composição de plasminogênio (preferencialmente contendo Glu-plasminogênio) administrada ao paciente está abaixo do limite de detecção do ensaio.

[0039] Em uma modalidade preferida, a composição de

plasminogênio administrada ao paciente contém Glu-plasminogênio em uma pureza de pelo menos 90% (p/p), pelo menos 95% (p/p), pelo menos 97% (p/p), pelo menos 98% (p/p), pelo menos 99% (p/p), pelo menos 99,5% (p/p), pelo menos 99,7% (p/p), pelo menos 99,8%) ou pelo menos 99,9% (w/w), com base no teor total de proteína.

[0040] Em uma modalidade preferida, a composição de plasminogênio (preferencialmente contendo Glu-plasminogênio) administrada ao paciente não contém ou contém apenas um teor muito baixo de endotoxina inferior a 1 EU/mL, inferior a 0,5 EU/mL, inferior a 0,1 EU/mL, inferior a 0,05 EU/mL ou inferior a 0,01 EU/mL (conforme determinado em um ensaio do endocromo Endosafe com Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL), de acordo com a Farmacopeia Europeia (versão 5.0) capítulo 2.6.14).

[0041] Em uma modalidade preferida, a composição de plasminogênio (preferencialmente contendo Glu-plasminogênio) administrada ao paciente não contém ou contém apenas um teor muito baixo de imunoglobulina inferior a 5 g/L, inferior a 2 g/L, inferior a 1 g/L, inferior a 0,5 g/L ou inferior a 0,1 g/L de imunoglobulinas (determinado em um ensaio nefelométrico).

[0042] Em uma modalidade preferida, a composição de plasminogênio (preferencialmente contendo Glu-plasminogênio) administrada ao paciente não contém ou contém apenas um teor muito baixo de Lys-plasminogênio. Em uma modalidade preferida, a composição de plasminogênio (preferencialmente contendo Glu-plasminogênio) administrada ao paciente não contém ou contém apenas um teor muito baixo de albumina.

[0043] Em uma modalidade preferida, o paciente apresenta deficiência adquirida de plasminogênio (PLG) causada pelo aumento do consumo de plasminogênio (PLG), diminuição da biossíntese de Glu-plasminogênio ou uma combinação de ambos. Em uma modalidade

preferida, o paciente apresenta deficiência adquirida de Glu-plasminogênio causada pelo aumento do consumo de Glu-plasminogênio, diminuição da biossíntese de Glu-plasminogênio ou uma combinação de ambos.

[0044] Em uma modalidade preferida, o paciente apresenta uma deficiência adquirida de plasminogênio (PLG). Em uma modalidade preferida, o paciente apresenta uma deficiência adquirida de plasminogênio (PLG) causada pelo aumento do consumo de plasminogênio (PLG) (hipofibrinólise de consumo). O consumo de plasminogênio (PLG) pode ser devido à transformação do plasminogênio (PLG) em plasmina. Isso pode ter qualquer motivo, por exemplo, por uma ativação em longo prazo do sistema fibrinolítico, como, por exemplo, devido à formação de coágulos e/ou danos de um ou mais vasos sanguíneos dentro da íntima.

[0045] Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG) é o Glu-plasminogênio, e o paciente apresenta uma deficiência adquirida de Glu-plasminogênio. Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG) é o Glu-plasminogênio e o paciente apresenta uma deficiência adquirida de Glu-plasminogênio causada pelo aumento do consumo de Glu-plasminogênio.

[0046] Em uma modalidade preferida, o paciente apresenta uma diminuição na biossíntese do plasminogênio (PLG). Em uma modalidade preferida, o paciente apresenta uma diminuição na biossíntese do Glu-plasminogênio. Por exemplo, essa diminuição da biossíntese pode ser causada por diminuição da expressão do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) que codifica para o plasminogênio (PLG), em particular Glu-plasminogênio, emenda errônea desse mRNA, redução da tradução do mRNA para o respectivo polipeptídeo, degradação intracelular acelerada do mRNA e/ou do respectivo polipeptídeo, ou uma combinação de dois ou mais desses.

[0047] Conforme aqui utilizado, os termos “aumento” e “diminuição” se referem a uma comparação com a média de uma população saudável. De preferência, o “aumento” pode ser um valor que seja pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 25%, pelo menos 50% ou pelo menos 2 vezes maior do que a média em uma população saudável. Preferencialmente, “diminuição” pode ser um valor que seja pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 25% ou pelo menos 50% menor do que a média em uma população saudável.

[0048] Tal como se usa neste documento, uma deficiência adquirida de (Glu-)plasminogênio pode ser entendida no sentido mais amplo como uma escassez de (Glu-)plasminogênio como, por exemplo, adquirida durante o tempo de vida do paciente. Dessa forma, essa deficiência de (Glu-)plasminogênio difere de uma deficiência inata de (Glu-)plasminogênio. Preferencialmente, uma deficiência adquirida de (Glu-)plasminogênio é causada pelo aumento do consumo de plasminogênio (PLG). Esse consumo de plasminogênio (PLG) pode ser causado por eventos no corpo do paciente, conforme descrito neste documento.

[0049] Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG), como usado no contexto da presente invenção, tem menor atividade proteolítica do que a plasmina. Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG), como usado no contexto da presente invenção, tem baixa ou nenhuma atividade proteolítica. Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG), como usado no contexto da presente invenção, não tem (essencialmente) atividade proteolítica. Uma alta atividade proteolítica pode ser desencadeada por enzimas ativas, como tPA, plasmina ou outras proteases ativas, que são preferencialmente capturadas durante o processo de purificação. Em outras palavras, o plasminogênio (PLG), como usado no contexto da presente invenção, preferencialmente não contém (essencialmente) um ingrediente proteolítico. O plasminogênio (PLG), como usado no contexto da

presente invenção, preferencialmente não contém (essencialmente) tPA, plasmina ou outras proteases ativas.

[0050] O uso seletivo do Glu-plasminogênio é particularmente benéfico no contexto da presente invenção. A coagulação sanguínea é balanceada por dois inibidores, antitrombina III e cofator II da heparina. Coágulos de fibrina formados são removidos somente por ativação do sistema fibrinolítico. A ativação do sistema fibrinolítico depende da ativação da plasmina. O plasma humano contém plasminogênio (PLG) em várias formas de ativação, começando com Glu-plasminogênio (nativo), Lys-plasminogênio (levemente ativado) e plasmina, em sua forma ativada. A ativação do glu-plasminogênio nativo via uPA, tPA em Glu-plasmina em um indivíduo saudável é um mecanismo essencial (Stricker, R. B.; Wong, *Activation of plasminogen (PLG) by tissue plasminogen (PLG) activator on normal and thrombasthenic platelets: effects on surface proteins and platelet aggregation. Blood* 1986, S. 275–280).

[0051] A estreptoquinase ou uroquinase é usada em ambiente terapêutico para atingir uma trombólise em diferentes eventos trombogênicos (Kunamneni, A.; Durvasula, R. *Streptokinase-A Drug for Thrombolytic Therapy: A Patent Review. Recent advances in cardiovascular drug discovery* 2014, S. 106–121; Takada, Akikazu; Takada, Yumiko, *Activation pathway of Glu-plasminogen to Lys-plasmin by urokinase. Thrombosis research* 1982, S. 671–677). A fibrinólise é iniciada devido à ativação do plasminogênio (PLG), levando à clivagem do plasminogênio (PLG) em plasmina [Wohl, R. C.; *Kinetics of activation of human plasminogen (PLG) by different activator species at pH 7.4 and 37 degrees C, The Journal of Biological Chemistry* 1980, S. 2005–2013]. Assim, são conhecidos três mecanismos de ativação diferentes [Fredenburgh, J. C.; Nesheim, M. E. *Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in*

vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 1992, S. 26150–26156]. O plasminogênio (PLG) tem alta afinidade de ligação a células endoteliais e coágulos de fibrina. A ligação adicional do ativador do plasminogênio tecidual (PLG) (tPA) leva a uma ativação e formação de plasmina. O último mecanismo é ilustrado por uma ligação do plasminogênio (PLG) na superfície celular, que é ativado pelo tPA em plasmina [Stricker, R. B.; Wong, *Activation of plasminogen (PLG) by tissue plasminogen (PLG) activator on normal and thrombasthenic platelets: effects on surface proteins and platelet aggregation*. *Blood* 1986, S. 275–280]. Essa terapia só pode ser bem-sucedida se o plasminogênio-alvo do fármaco (PLG) estiver disponível o suficiente na circulação sanguínea e no local do trombo em uma quantidade suficiente.

[0052] O plasminogênio (PLG) é um zimógeno, que, após a clivagem parcial por ativadores de plasminogênio (PLG), como o ativador de plasminogênio (PLG) do tipo tecidual [tPA] ou o ativador de uroquinase plasminogênio (PLG) [uPA], é convertido na forma proteoliticamente ativa, plasmina [PM]. A PM é uma proteína-chave do sistema fibrinolítico, pois pode degradar a fibrina presente nos coágulos de fibrina, o produto da coagulação, em produtos/fragmentos solúveis de degradação da fibrina, levando à dissolução do coágulo. A geração de plasmina ocorre preferencialmente na superfície da fibrina, que oferece sítios de ligação para plasminogênio (PLG) e tPA. Essa ligação estimula a ativação do plasminogênio (PLG), mas também localiza a ação da plasmina em sítios de formação de fibrina, o que promove uma lise eficiente do coágulo. A plasmina ativada é uma enzima-chave no sistema fibrinolítico. Assim, desde que a plasmina esteja ligada à matriz do coágulo de fibrina, ela não é inibida pelo inibidor de controle alfa-2-antiplasmina (A2AP), mas a plasmina liberada é instantaneamente inibida. A plasmina livre tem um período de meia-vida muito curto no plasma de 0,1 segundo. Os períodos de meia-vida de Glu-

plasminogênio e alfa-2-antiplasmina (A2AP) são de 50 horas. Em contraste, o Lys78-plasminogênio (PLG) tem um período de meia-vida de apenas 20 horas [Fredenburgh, J. C.; Nesheim, M. E. *Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro. The Journal of Biological Chemistry* 1992, S. 26150–26156]. A plasmina apresenta clivagem preferencial no lado carboxila dos resíduos Lisina e Arginina com maior seletividade do que a tripsina. Ela converte a fibrina polimerizada em produtos solúveis [Castellino, Francis J.; Ploplis, Victoria A. *Structure and function of the plasminogen (PLG)/plasmin system. Thrombosis and Haemostasis* 2005, S. 647–654].

[0053] Tal como utilizado no contexto da presente invenção, o termo “paciente” pode ser entendido no sentido mais amplo como qualquer ser vivo, que seja de preferência qualquer animal, de preferência um mamífero, incluindo o ser humano, em especial um ser humano. Será entendido que o plasminogênio (PLG) é comumente da mesma espécie que o paciente a ser tratado, a fim de evitar reações colaterais imunogênicas indesejáveis. Opcionalmente, o paciente também pode sofrer ou correr o risco de desenvolver um distúrbio selecionado do grupo que consiste em falência de órgãos (por exemplo, falência de órgãos renais (por exemplo, lesão / insuficiência renal aguda (AKI), coração, pulmão, cérebro e veias), doença arterial obstrutiva, distúrbios na microcirculação, coagulação intravascular disseminada (DIC) e uma combinação de dois ou mais destes na consequência final de uma falha de órgãos específica.

[0054] Conforme utilizado ao longo da presente invenção, a coagulação intravascular disseminada (CID) pode ser a microcirculação. Então, ela também pode ser designada como microcoagulação intravascular disseminada.

[0055] O paciente pode ou não estar sofrendo de uma doença

sistêmica. Ao longo da presente invenção, o termo “sofrendo de”, como aqui utilizado, pode ser entendido no sentido mais amplo, de uma forma que o paciente desenvolveu uma condição patológica associada ao distúrbio associado a um evento trombótico. Este paciente é tratado preferencialmente com plasminogênio (PLG). Opcionalmente, o paciente pode estar sofrendo de uma condição selecionada do grupo que consiste em falência de órgãos, um evento trombótico, doença obstrutiva arterial, microcirculação, coagulação intravascular disseminada (DIC) e uma combinação de dois ou mais destes, em particular a falência de órgãos, ou seja, que este distúrbio está presente no paciente. Em uma modalidade preferida, o termo “sofrendo de”, como aqui utilizado, pode ser entendido no sentido mais amplo, de uma forma que o paciente desenvolveu uma condição patológica associada a um evento trombótico. O paciente que sofre de um distúrbio pode opcionalmente, mas não necessariamente, apresentar sintomas medicinais como, por exemplo, um ou mais dos sintomas selecionados do grupo que consiste em distúrbios ácido-base (por exemplo, alcalose respiratória ou acidose láctica), oligúria (mesmo anúria), hiperglicemia, aumento das necessidades de insulina, taquipneia, hipocapnia, hipoxemia, disfunção hepática, anormalidades hematológicas, azotemia, anormalidades de coagulação e colite isquêmica.

[0056] Como indicado acima, a presente invenção também se refere à profilaxia de um evento trombótico. De forma que o risco do paciente de desenvolver um (micro)trombo é preferencialmente reduzido com plasminogênio (PLG). O termo “correr o risco de desenvolver” significa que o paciente tem uma maior probabilidade de obter um evento trombótico em comparação com a probabilidade média em toda a população da mesma espécie. De preferência, o risco é pelo menos 5 vezes maior, ainda mais preferencialmente o risco é pelo menos 10 vezes maior, ainda mais preferencialmente o risco é pelo

menos 100 vezes maior, ainda mais preferencialmente o risco é pelo menos 1000 vezes maior.

[0057] Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere ao plasminogênio (PLG) para uso em um método de prevenção ou tratamento de um evento trombótico em um paciente, em que o referido paciente sofre de um distúrbio selecionado do grupo que consiste em falência de órgãos, um evento trombótico, doença obstrutiva arterial, microcirculação, coagulação intravascular disseminada (DIC) e uma combinação de dois ou mais destes, em particular a falência de órgãos.

[0058] Conforme aqui usado, um evento trombótico pode ser qualquer formação de coágulo sanguíneo dentro de um vaso sanguíneo. Este evento trombótico pode obstruir o fluxo de sangue através do sistema circulatório. Isto pode levar à necrose do tecido alimentado por este vaso sanguíneo (também designada como infarto). Em uma modalidade preferida, um evento trombótico pode ser selecionado do grupo que consiste em trombose venosa profunda (DVT, por exemplo, nas pernas, trombose da veia pélvica), trombose em uma embolia (por exemplo, uma embolia crônica ou aguda de órgãos (por exemplo, embolia pulmonar/dos pulmões)), trombose em infartos (por exemplo, infartos do miocárdio, rins, acidentes vasculares cerebrais, oclusões da veia retiniana), trombose em uma coagulação intravascular disseminada (DIC) e púrpura trombocitopênica trombótica (TTP).

[0059] Em uma modalidade preferida, um evento trombótico é um evento trombótico adquirido. Em uma modalidade preferida, o evento trombótico está associado a uma deficiência de plasminogênio (PLG) (por exemplo, uma deficiência de plasminogênio (PLG) adquirida, uma deficiência temporária de plasminogênio (PLG) ou uma deficiência crônica de plasminogênio (PLG)). Esta deficiência de plasminogênio (PLG) pode, opcionalmente, ser causada devido a um consumo permanente de plasminogênio (PLG) nas placas ateroscleróticas

(parcialmente) fechadas do fluxo sanguíneo ou fechadas para estenose de artérias ou outros vasos sanguíneos. Esta deficiência de plasminogênio (PLG) pode ser simplesmente observada medindo-se a atividade da plasmina (após ativação com, por exemplo, uroquinase) ou pela detecção imunométrica do plasminogênio (PLG).

[0060] O plasminogênio (PLG) pode ser usado como uma oportunidade de tratamento direto. O tPA (ativador de plasminogênio (PLG) tecidual ou uPA (Uroquinase)) atualmente usado é aplicado como uma terapia indireta que requer pelo menos um nível normal de plasminogênio (PLG). O tPA pode ativar o plasminogênio (PLG) em plasmina. Isso pode ser usado para dissolver um trombo já formado que pode causar danos consecutivos adicionais ao tecido. Os baixos níveis de plasminogênio (PLG) nesses casos podem ser causados pelo consumo da proteína plasminogênio (PLG), em particular da proteína Glu-plasminogênio, in vivo. Verificou-se que o paciente com eventos microtrombóticos frequentemente apresenta uma baixa concentração de plasminogênio (PLG) no plasma nas primeiras 48 horas críticas após o evento (micro)trombótico. Após a injeção de plasminogênio (PLG), o nível total de plasminogênio (PLG) aumentou durante um período de tempo em uma configuração experimental de murinos. É plausível que ele se comporte de forma comparável em outros mamíferos, incluindo o ser humano. Além disso, não apenas a medição do plasminogênio (PLG) pode ser decisiva, mas também a quantidade de alfa-2-antiplasmina. Uma quantidade maior de alfa-2-antiplasmina pode inibir as moléculas de plasminogênio (PLG) disponíveis. Além disso, nesse caso, a injeção de plasminogênio (PLG) pode equilibrar a alta concentração de alfa-2-antiplasmina e pode levar a uma melhora na condição crítica dentro das primeiras 48 horas.

[0061] Em uma modalidade preferida, o evento trombótico é um trombo de um vaso sanguíneo renal com um diâmetro inferior a 1 mm.

Em uma modalidade preferida, o evento trombótico é um trombo de um vaso sanguíneo com um diâmetro inferior a 1 mm, que é um capilar renal. Assim, em uma modalidade preferida, a presente invenção também se refere ao plasminogênio (PLG) para uso em um método de prevenção ou tratamento de microtrombose no rim de um paciente.

[0062] Em uma modalidade preferida, o paciente corre o risco de desenvolver microtrombos. Em uma modalidade preferida, o paciente corre o risco de desenvolver microtrombos, resultando em uma trombose. Em uma modalidade preferida, o paciente corre o risco de desenvolver microtrombos, resultando em uma trombose dos grandes vasos sanguíneos. Em uma modalidade preferida, o paciente corre o risco de desenvolver microtrombos, resultando em embolização. Em uma modalidade preferida, o paciente corre o risco de desenvolver microtrombos, resultando em embolização dos grandes vasos sanguíneos. Em uma modalidade preferida, o paciente corre o risco de desenvolver microtrombos, resultando em uma trombose ou embolização dos grandes vasos sanguíneos.

[0063] Em uma modalidade preferida, o paciente corre risco de desenvolver ou sofre de um estado patológico selecionado do grupo composto por estenose de artérias, veias, arteríolas, vênulas, capilares ou espasmos em artérias, veias, arteríolas, vênulas, capilares, resultando em doenças como lipoproteína(a)-anemia, deficiência de ferro, deficiência de vitamina D, deficiência de vitamina K, deficiência de vitamina H, anemia, homocisteinemia, deficiência de proteína Z, embolia, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, epistaxe, hipermenorreia, Síndrome de Von Willebrand, Morgus Meulengracht, uma disfunção hepática, síndrome antifosfolipídica, enxaqueca, disfunção tireoidiana, aborto, falhas terapêuticas na terapia de lise usando ativadores para plasminogênio (PLG) e uma combinação de dois ou mais destes.

[0064] Em uma modalidade preferida, o paciente apresenta um nível sanguíneo de plasminogênio (PLG) inferior, em particular Glu-plasminogênio, ao nível sanguíneo de plasminogênio (PLG), em particular Glu-plasminogênio, encontrado em toda a população da mesma espécie.

[0065] Este nível sanguíneo inferior de plasminogênio (PLG), em particular Glu-plasminogênio, pode ser causado por qualquer motivo. Em uma modalidade preferida, o nível sanguíneo inferior de plasminogênio (PLG), em particular o Glu-plasminogênio, é causado por uma ou mais razões selecionadas do grupo que consiste no alto consumo fisiológico ou patológico de plasminogênio (PLG), em particular o Glu-plasminogênio, uma alta taxa de eliminação de plasminogênio (PLG), uma baixa taxa de expressão de plasminogênio (PLG) e a presença de altos níveis de um ou mais inibidores de plasminogênio (PLG), em particular Glu-plasminogênio.

[0066] Opcionalmente, a formação de microtrombos pode ser causada por um estado de hipercoagulabilidade presente por um tempo que resulta em consumo de plasminogênio (PLG) (em particular, plasminogênio (PLG)) ou pode ser causado por um estado hipofibrinolítico causado pelo desenvolvimento contínuo de microtrombos e/ou macrotrombos ou o presente para ambos, resultando opcionalmente em um consumo de plasminogênio (PLG).

[0067] Um inibidor de plasmin(ogênio) pode ser qualquer entidade química que iniba a atividade do plasmin(ogênio) e/ou diminua o nível sanguíneo do plasminogênio (PLG). Por exemplo, um inibidor de plasminogênio (PLG) pode ser a alfa-2-antiplasmina. Isso é ainda descrito no documento WO 2018/162754. Em uma modalidade preferida, o paciente é caracterizado por:

[0068] (a) a razão de alfa-2-antiplasmina versus plasminogênio (PLG) (preferencialmente plasminogênio (PLG)) encontrada no sangue

do paciente é pelo menos 1,1 vezes maior em comparação com a razão média encontrada em toda uma população da mesma espécie; e/ou

[0069] (b) o nível de plasminogênio (PLG) (preferencialmente plasminogênio (PLG)) no sangue do paciente é pelo menos 1% (mol/mol) inferior em comparação com o nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie.

[0070] Preferencialmente, a razão de alfa-2-antiplasmina versus plasminogênio (PLG) (preferencialmente plasminogênio (PLG)) encontrada no sangue do paciente é pelo menos 1,15 vezes maior, preferencialmente pelo menos 1,2 vezes maior, em particular pelo menos 1,25 vezes maior, em comparação com a razão média encontrada em toda a população da mesma espécie.

[0071] Preferencialmente, o nível de plasminogênio (PLG) (preferencialmente plasminogênio (PLG)) no sangue do paciente é pelo menos 2% (mol/mol) menor, preferencialmente pelo menos 5% (mol/mol) mais baixo, em particular pelo menos 10% (mol/mol), pelo menos 20% (mol/mol), pelo menos 30% (mol/mol), pelo menos 40% (mol/mol) ou pelo menos 50% (mol/mol) mais baixo, em comparação ao nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie.

[0072] Em uma modalidade preferida, determina-se o nível de plasminogênio (PLG) no sangue do paciente e, no caso de o nível determinado de plasminogênio (PLG) ser pelo menos 10% (mol/mol) , pelo menos 20% (mol/mol), pelo menos 30% (mol/mol), pelo menos 40% (mol/mol), ou pelo menos 50% (mol/mol) mais baixo em comparação ao nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie, o paciente é administrado com uma quantidade suficiente de plasminogênio (PLG) para prevenir ou tratar um evento trombótico.

[0073] O paciente pode ou não apresentar sintoma clínico. O paciente pode ou não ter regiões isquêmicas. Em uma modalidade preferida, o paciente sofre de pelo menos uma região isquêmica. Em

uma modalidade preferida, o paciente sofre de pelo menos uma região isquêmica que leva à necrose de pelo menos uma parte de um tecido sem administração de plasminogênio (PLG) ao paciente em questão.

[0074] Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG) é Glu-plasminogênio e o paciente sofre de pelo menos uma região isquêmica que leva à necrose de pelo menos uma parte de um tecido sem a administração de Glu-plasminogênio a este paciente.

[0075] Neste caso, de preferência, a administração de plasminogênio (PLG) de acordo com a presente invenção pode, pelo menos em parte, prevenir ou dissolver o coágulo trombótico. Neste caso, de preferência, a administração do plasminogênio (PLG) de acordo com a presente invenção pode prevenir pelo menos parcialmente a necrose. Essa necrose devido ao suprimento inadequado de sangue para a área afetada também pode ser designada como infarto.

[0076] Um infarto pode ser entendido no sentido mais amplo como morte tecidual (necrose) devido ao suprimento inadequado de sangue para a área afetada.

[0077] O evento trombótico pode ser causado por qualquer razão. Em uma modalidade preferida, o evento trombótico é causado por infarto, hipercolesterolemia ou ambos.

[0078] Além disso, a oclusão da via arterial por trombos pode resultar em um infarto na via de fluxo sucessional nos órgãos dependentes (cérebro, coração, rim, trato gastrointestinal etc.). Em uma modalidade preferida, o evento trombótico é causado por infarto, causado por qualquer razão típica na patogênese dos infartos, pela ruptura de uma placa aterosclerótica contendo cristais de colesterol causados por hipercolesterolemia, ou ambos.

[0079] Um infarto pode ser entendido no sentido mais amplo como morte tecidual (necrose) devido ao fornecimento de sangue inadequado

e, portanto, de oxigênio para a área afetada. Um infarto pode ser qualquer infarto, como, por exemplo, infarto do miocárdio, infarto do rim, acidente vascular cerebral, etc.

[0080] Em uma modalidade preferida alternativa, o evento trombótico é causado por pelo menos um dos seguintes: intervenção cirúrgica, como uma cirurgia vascular (por exemplo, a cirurgia de revascularização do miocárdio), por uma endoprótese (ou seja, a inserção de corpos estranhos, por exemplo, endoprótese vascular/vaso sanguíneo), por aneurisma e por lesão traumática por estenose. Em uma modalidade preferida alternativa, o evento trombótico está associado ao câncer, trauma, falta de movimento, obesidade, tabagismo, controle hormonal de natalidade, gravidez e o período após o nascimento, síndrome antifosfolipídica e determinadas condições genéticas. Os fatores de risco genéticos podem incluir deficiências de antitrombina, proteína C e proteína S, e a mutação do fator V Leiden, e a administração de um contraceptivo sistêmico, especialmente em combinação com tabagismo, inatividade física, especialmente o repouso prolongado na doença, obesidade, desidratação (exsicose), câncer, trombose passada, gravidez.

[0081] O paciente pode sofrer de um evento trombótico único ou de mais de um evento trombótico. Em uma modalidade preferida, o paciente sofre de mais de um evento trombótico. Em uma modalidade preferida alternativa, o paciente sofre de um único evento trombótico.

[0082] O plasminogênio (PLG) pode ser obtido de qualquer fonte. Ele pode ser obtido de uma fonte comercial ou pode ser preparado por qualquer meio. Por exemplo, ele pode ser preparado conforme descrito no documento WO 2018/162754. Ele pode ser isolado do plasma sanguíneo e frações plasmáticas, em particular o plasma pobre em crioprecipitado, plasma pobre em crioprecipitado reduzido por uma ou duas etapas de absorção (F IX/PCC ou Inibidor da C1-Esterase), Pasta

I-II-III ou pasta de ácido octanoico do mesmo, conforme descrito no Documento WO 2018/162754.

[0083] O plasminogênio (PLG) pode ser administrado ao paciente por qualquer meio. Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG) é administrado sistemicamente ao paciente. Em uma modalidade preferida, o plasminogênio (PLG) é administrado ao paciente por uma via de administração selecionada do grupo que consiste em intravenosa (i.v.), intra-arterial (i.a.), intracraniana (i.c.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) e injeção subcutânea (s.c.)), em particular por uma via de administração selecionada do grupo que consiste em injeção intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.) e subcutânea (s.c.). Alternativamente ou adicionalmente, a composição farmacêutica também pode ser adequada para outras vias de administração, como, por exemplo, a administração nasal ou transdérmica.

[0084] Para administração, o plasminogênio (PLG) pode estar contido em uma composição farmacêutica, ou seja, é combinado com pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável. Os termos “composição farmacêutica” e “formulação farmacêutica” podem ser compreendidos de forma alternada. Como aqui utilizado, os termos “veículo farmaceuticamente aceitável”, “excipiente farmaceuticamente aceitável”, “veículo” e “excipiente” podem ser compreendidos de forma alternada, no sentido mais amplo, como qualquer substância que possa suportar a aceitação farmacológica do plasminogênio (PLG). Esta composição farmacêutica pode ser pronta para uso e pode, de preferência, ser uma formulação líquida, em especial uma parte de injeção. A forma de armazenamento pode também ser líquida, mas também pode ser seca (por exemplo, um pó, como um pó composto por plasminogênio seco ou liofilizado (PLG)) ou pode ser uma pasta ou xarope ou algo semelhante. Opcionalmente, uma forma seca, pasta ou xarope pode ser dissolvido ou emulsificado antes de ser administrado

ao paciente.

[0085] Um veículo farmaceuticamente aceitável pode ser exemplificativamente selecionado da lista que consiste em um tampão aquoso, solução salina, água, sulfóxido de dimetila (DMSO), etanol, óleo vegetal, óleo de parafina ou combinações de dois ou mais destes. Além disso, o veículo farmaceuticamente aceitável pode, opcionalmente, conter um ou mais detergentes, um ou mais agentes espumantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio (SLS), dodecil sulfato de sódio (SDS)), um ou mais agentes de coloração (por exemplo, coloração de alimentos), uma ou mais vitaminas, um ou mais sais (por exemplo, sais de sódio, potássio, cálcio, zinco), um ou mais umectantes (por exemplo, sorbitol, glicerol, manitol, propilenoglicol, polidextrose), uma ou mais enzimas, um ou mais agentes conservantes (por exemplo, ácido benzoico, metilparabeno, um ou mais antioxidantes, um ou mais extratos herbais e vegetais, um ou mais agentes estabilizantes, um ou mais agentes quelantes (por exemplo, ácido etilenodiaminatetra-acético (EDTA)), e/ou um ou mais mediadores de absorção (por exemplo, polietileno imina (PEI), um peptídeo de penetração celular (CPP), um domínio de transdução de proteína (PTD), um peptídeo antimicrobiano etc.).

[0086] A presente invenção também se refere a uma unidade de dosagem da composição farmacêutica que pode ser usada no contexto do tratamento ou prevenção da presente invenção. De forma exemplificativa, a presente invenção pode se referir a um recipiente de dose única ou a uma forma de dosagem múltipla.

[0087] A faixa de dose pode ser ajustada de acordo com o uso pretendido. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) pelo menos uma vez com uma dose de plasminogênio (PLG) na faixa de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal.

[0088] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado

com plasminogênio (PLG) pelo menos uma vez com uma dose de plasminogênio (PLG) na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal.

[0089] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) pelo menos uma vez com uma dose de plasminogênio (PLG) na faixa de 0,01 a 0,1 mg/kg de peso corporal, de 0,05 a 0,5 mg/kg de peso corporal, de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal, de 0,5 a 5 mg/kg de peso corporal, de 1 a 10 mg/kg de peso corporal ou de 1 a 100 mg/kg de peso corporal.

[0090] Em uma modalidade preferida, uma dose única administrada por via intravenosa está na faixa de 0,01 a 1 mg/kg. Preferencialmente, a dose única administrada por via intravenosa está na faixa de 0,02 a 0,9 mg/kg, de 0,03 a 0,8 mg/kg, de 0,04 a 0,7 mg/kg, de 0,05 a 0,5 mg/kg, de 0,1 a 0,4 mg/kg ou de 0,25 a 0,35 mg/kg.

[0091] Em uma modalidade preferida, uma dose única administrada por via intramuscular está na faixa de 0,05 a 10 mg/kg. Preferencialmente, a dose única administrada por via intramuscular está na faixa de 0,1 a 9 mg/kg, de 0,2 a 8 mg/kg, de 0,3 a 7 mg/kg ou de 0,5 a 5 mg/kg.

[0092] Em uma modalidade preferida, uma dose única administrada por via subcutânea está na faixa de 0,1 a 100 mg/kg. Preferencialmente, a dose única administrada por via subcutânea está na faixa de 0,5 a 90 mg/kg, de 1 a 80 mg/kg, de 2 a 70 mg/kg ou de 5 a 50 mg/kg.

[0093] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) pelo menos uma vez dentro de 24 horas após a ocorrência de um evento trombótico. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) pelo menos uma vez dentro de doze horas ou pelo menos dentro de seis, cinco ou quatro horas após a ocorrência de um evento trombótico.

[0094] Em uma modalidade preferida alternativa, o paciente é administrado dentro de uma semana antes de ser submetido a um

evento de alto risco de desenvolver um evento trombótico.

[0095] Em outra modalidade preferida alternativa, o paciente é administrado regularmente quando corre o risco de desenvolver um evento trombótico.

[0096] Tal como aqui utilizado, o termo “regularmente” pode ser entendido no sentido mais amplo como durando por um período de tempo de pelo menos uma semana, pelo menos um mês, pelo menos seis meses ou pelo menos um ano.

[0097] Este evento de alto risco de desenvolvimento de evento trombótico pode ser qualquer evento que aumente o risco do paciente de obter um evento trombótico. Em uma modalidade preferida, esse evento é uma intervenção cirúrgica.

[0098] Neste contexto, uma intervenção cirúrgica pode ser qualquer intervenção cirúrgica, preferencialmente a cirurgia vascular. Conforme aqui utilizado, a cirurgia vascular pode ser entendida no sentido mais amplo como sendo selecionada dentre cirurgia de revascularização (por exemplo, cirurgia de revascularização do miocárdio), endoprótese (ou seja, inserção de corpos estranhos, por exemplo, vaso sanguíneo/endoprótese vascular), em aneurismas, lesões traumáticas por estenose e outras intervenções cirúrgicas vasculares. Nesses casos, também pode haver risco de retrombose causada pelas superfícies da lesão dentro do vaso sanguíneo, por uma endoprótese, etc. Estes podem ativar a cascata de coagulação, resultando na formação de um trombo. Para cobrir esses riscos após a ativação da cascata de coagulação, a administração profilática do plasminogênio (PLG) é surpreendentemente bem-sucedida.

[0099] Outros fatores de risco adicionais ou alternativos para o desenvolvimento de um evento trombótico podem incluir: câncer, trauma, falta de movimento, obesidade, tabagismo, controle hormonal de natalidade, gravidez e período após o nascimento, síndrome

antifosfolipídica e determinadas condições genéticas. Os fatores de risco genéticos podem incluir deficiências de antitrombina, proteína C e proteína S, e a mutação do fator V Leiden. O mecanismo subjacente pode envolver alguma combinação de diminuição da taxa de fluxo sanguíneo, aumento da tendência à coagulação e lesões na parede do vaso sanguíneo.

[00100] Outros fatores de risco adicionais ou alternativos para o desenvolvimento de um evento trombótico podem incluir os contraceptivos orais (“pílula”, especialmente aqui as reduzidas em estrogênio ou isentas de estrogênio), especialmente em combinação com o tabagismo, inatividade física, especialmente o repouso prolongado na doença, obesidade, desidratação (exsicose), câncer, trombose passada, gravidez. Mais comumente acometidas por trombose venosa profunda são as pernas. Fala-se, então, da trombose da veia da perna superior ou inferior. Se a panturrilha, a fossa poplíteia e a coxa forem afetadas, isso é chamado de trombose em vários níveis. A trombose da veia pélvica é menos comum, porém mais perigosa devido ao tamanho do vaso e ao maior risco de embolia pulmonar. A trombose da veia pélvica é temida em gestantes, onde um coágulo pode se dissolver após o nascimento devido à falta de compressão do útero e pode levar à embolia pulmonar, o que pode ser fatal. Outra complicação da trombose per se e DVT em particular é a coagulação intravascular disseminada (DIC).

[00101] O paciente pode ser administrado com plasminogênio (PLG) de acordo com qualquer esquema de administração.

[00102] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de três ou mais dias. Preferencialmente, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de tempo de pelo menos uma semana, por pelo menos duas semanas, pelo menos quatro

semanas, pelo menos dois meses ou pelo menos um ano. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado por via intravenosa com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de tempo de três ou mais dias, pelo menos uma semana, por pelo menos duas semanas, pelo menos quatro semanas, pelo menos dois meses ou pelo menos um ano. Neste contexto, uma dose única pode ser uma dose única em qualquer faixa de dose. Em uma modalidade preferida, a administração de uma dose única pode ser, cada uma, na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui.

[00103] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de tempo de três ou mais dias, em que a administração é a administração intravenosa, em que a administração intravenosa de uma única dose pode ser, cada uma, na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui.

[00104] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de tempo de três ou mais dias, preferencialmente em que a administração é a administração intra-arterial, em particular a administração intra-arterial de cada dose única na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de tempo de três ou mais dias, de preferência em que a administração é a administração intracraniana, em particular a administração intravenosa de cada dose única na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal.

[00105] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez a cada dois dias, por um período de tempo de três ou mais dias. Preferencialmente, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) a cada dois dias, por um

período de tempo de pelo menos uma semana, por pelo menos duas semanas, pelo menos quatro semanas, pelo menos dois meses ou pelo menos um ano. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado por via intramuscular ou intravenosa, em particular por via intramuscular, com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de tempo de três ou mais dias, pelo menos uma semana, por pelo menos duas semanas, pelo menos quatro semanas, pelo menos dois meses ou pelo menos um ano. Neste contexto, uma dose única pode ser uma dose única em qualquer faixa de dose. Em uma modalidade preferida, a administração de uma dose única pode ser, cada uma, na faixa de 0,05 a 10 mg/kg de peso corporal. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez ao dia por um período de tempo de três ou mais dias, em que a administração é a administração intramuscular, em que a administração intravenosa de uma única dose pode ser, cada uma, na faixa de 0,05 a 10 mg/kg de peso corporal. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui.

[00106] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez a cada semana, por um período de tempo de três ou mais semanas. Preferencialmente, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez a cada semana por um período de tempo de pelo menos duas semanas, pelo menos quatro semanas, pelo menos dois meses ou pelo menos um ano. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado por via subcutânea com plasminogênio (PLG) uma vez por semana por um período de tempo de três ou mais semanas, pelo menos duas semanas, pelo menos quatro semanas, pelo menos dois meses ou pelo menos um ano. Neste contexto, uma dose única pode ser uma dose única em qualquer faixa de dose. Em uma modalidade preferida, a administração de uma dose única pode ser, cada uma, na faixa de 0,1 a 100 mg/kg de peso

corporal. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com plasminogênio (PLG) uma vez por semana por um período de tempo de três ou mais semanas, em que a administração é a administração subcutânea de uma dose única na faixa de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com uma dose adequada para substituir não mais do que 15% da quantidade normal de plasminogênio (PLG) no compartimento de plasma. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com uma dose adequada para substituir não mais do que 10% da quantidade normal de plasminogênio (PLG) no compartimento de plasma. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui. Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado com uma dose adequada para substituir não mais do que 5% da quantidade normal de plasminogênio (PLG) no compartimento de plasma. Outras faixas de dose preferidas são descritas aqui.

[00107] Em uma modalidade preferida, o paciente é administrado uma vez ao dia por um período de três a sete dias e é administrado subsequentemente uma vez a cada dois dias por um período de tempo de três ou mais dias. Em uma modalidade preferida alternativa, o paciente é administrado uma vez ao dia por um período de tempo de três a sete dias e é posteriormente administrado uma vez por semana por um período de tempo de três ou mais semanas. Em uma modalidade preferida alternativa, o paciente é administrado uma vez ao dia por um período de tempo de três a sete dias e é posteriormente administrado uma vez a cada dois dias por um período de tempo de três ou mais dias e é, subsequentemente, administrado uma vez por semana por um período de tempo de três ou mais semanas.

[00108] Antes da administração, o nível de plasminogênio (PLG) no

sangue do paciente pode ser determinado. Caso o nível determinado de plasminogênio (PLG) seja pelo menos 10% (mol/mol) menor em comparação com o nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie, o paciente pode ser administrado com uma quantidade suficiente de plasminogênio (PLG) para prevenir ou tratar um evento trombótico.

[00109] Assim, em uma modalidade preferida, o paciente é:

[00110] administrado com plasminogênio (PLG) pelo menos uma vez com uma dose de plasminogênio (PLG) na faixa de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal durante o período de tratamento; e subsequentemente

[00111] o nível de plasminogênio (PLG) no sangue do paciente é determinado em uma etapa (i) e, caso o nível determinado de plasminogênio (PLG) seja pelo menos 10% (mol/mol) menor em comparação ao nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie, o paciente é administrado com uma quantidade suficiente de plasminogênio (PLG) para prevenir ou tratar um evento trombótico em uma etapa adicional (ii); e opcionalmente

[00112] as etapas (i) e (ii) são realizadas repetidamente, desde que o nível de plasminogênio (PLG) determinado na etapa (i) seja pelo menos 10% (mol/mol) inferior em comparação ao nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie.

[00113] Outras faixas de dose e faixas de tratamento preferidos são descritos aqui.

[00114] Um período de tratamento é o período da duração do respectivo tratamento, como, por exemplo, uma intervenção (micro)cirúrgica, e o tempo logo após, como, por exemplo, até um dia, até dois dias, até uma semana ou até um mês após o respectivo tratamento.

[00115] O paciente pode ou não sofrer de uma doença. Em uma modalidade preferida, o paciente sofre de trombose venosa profunda,

trombose da veia pélvica, embolia pulmonar, um infarto de qualquer órgão, oclusão da veia retiniana, coagulação intravascular disseminada (DIC), púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), uma coincidência de angiopatia com eventos trombóticos na via do fluxo capilar, particularmente angiopatia diabética, tromboflebite ou uma combinação de dois ou mais destes.

[00116] Em uma modalidade preferida, o paciente sofre de coagulação intravascular disseminada (DIC), lesão renal aguda/renal (AKI), sepse ou uma combinação de dois ou mais destes.

[00117] Em uma modalidade preferida, o paciente sofre de coagulação intravascular disseminada (DIC). Em uma modalidade preferida, o paciente sofre de lesão renal aguda (AKI). Em uma modalidade preferida, o paciente sofre de sepse.

[00118] Em uma modalidade preferida, o paciente corre o risco de desenvolver um evento trombótico, em que o referido paciente sofre de aterosclerose ou estenose de artérias, foi submetido a ou está submetido a uma cirurgia, em particular a cirurgia vascular (incluindo a reconstrução de um vaso (também conhecida como reconstrução vascular) e/ou cirurgia de revascularização), e/ou tem uma endoprótese (por exemplo, endoprótese de vaso sanguíneo/vascular). A cirurgia de revascularização também pode incluir o transplante de vasos (também conhecido como enxertia vascular). Em uma modalidade preferida, o paciente que sofre de um evento trombótico sofre simultaneamente ou já sofreu anteriormente de aterosclerose ou estenose de artérias, foi submetido a ou está submetido a uma cirurgia, em particular a cirurgia vascular [incluindo a reconstrução de um vaso (também conhecida como reconstrução vascular ou cirurgia vascular) e/ou a cirurgia de revascularização], e/ou tem uma endoprótese (por exemplo, endoprótese de vaso sanguíneo/vascular).

[00119] Os exemplos e figuras a seguir destinam-se a fornecer

modalidades ilustrativas da presente invenção descrita e reivindicada neste documento. Esses exemplos não se destinam a fornecer qualquer limitação ao escopo da matéria inventada. As figuras, exemplos e reivindicações a seguir ilustram ainda mais a invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00120] A Figura 1 mostra a redução da taxa de filtração glomerular (GFR), representada como alteração percentual sobre camundongos não tratados, de camundongos administrados com colesterol a 10 mg/kg (CC); camundongos administrados com colesterol a 10 mg/kg e subsequentemente administrados com 132 μ L de uma composição composta por 65 μ g/mL de Glu-plasminogênio 4 horas após a administração do colesterol (CC+Glu-P); e camundongos administrados com 132 μ L de uma composição composta por 65 μ g/mL de Glu-plasminogênio (PBS+Glu-P), cada uma após horas.

[00121] A Figura 2 mostra a redução da taxa de filtração glomerular (GFR), representada como a taxa de fluxo em μ L/min, de camundongos não tratados (Referência); camundongos administrados com colesterol a 10 mg/kg (CC); camundongos administrados com colesterol a 10 mg/kg e administrados subsequentemente com 132 μ L de uma composição composta por 65 μ g/mL de Glu-plasminogênio 4 horas após a administração do colesterol (CC+Glu-P); e camundongos administrados com 132 μ L de uma composição composta por 65 μ g/mL de Glu-plasminogênio (PBS+Glu-p), cada uma após 24 horas.

[00122] A Figura 3 mostra o tamanho do infarto, representado como porcentual do rim inteiro, de camundongos administrados com colesterol a 10 mg/kg (CC); camundongos administrados com colesterol a 10 mg/kg e administrados subsequentemente com 132 μ L de uma composição composta por 65 μ g/mL de Glu-plasminogênio 4 horas após a administração do colesterol (CC+Glu-P); e camundongos administrados com 132 μ L de uma composição composta por 24 μ g/mL

de Glu-plasminogênio (PBS+Glu-p), cada uma após 24 horas.

[00123] A Figura 4 mostra a frequência percentual de diagnóstico entre pacientes com nível reduzido de plasminogênio (PLG) (n = 600) com deficiência de plasminogênio (PLG) (preto) e sem deficiência de plasminogênio (PLG) (cinza).

[00124] A Figura 5 mostra a atividade de alfa-2-antiplasmina (A2AP) em diferentes grupos de pacientes (sem doença/população de controle (Norm), lipoproteína(A) (LpA), deficiência de ferro (Ferro), deficiência de vitamina D (VitD), deficiência de vitamina K (VitK), deficiência de vitamina H (VitH), anemia (Anaem), nível de homocisteína (Hcys), deficiência de proteína Z (PZ), trombose (Thromb), embolia (Emb), acidente cerebral vascular (Stroke), infarto do miocárdio (MI), epistaxias (Epist), hipermenorreia (HM), síndrome de von Willebrand (vWS), Morgus Meulengracht (Meul), doenças hepáticas (Li), doenças antifosfolipídicas (APL), enxaqueca (Migr), doenças tireoidianas (Thyr), abortos (Abort)).

[00125] A Figura 6 mostra a atividade do plasminogênio (PLG) em diferentes grupos de pacientes (as abreviações são as mesmas usadas na Figura 5).

[00126] A Figura 7 mostra a razão (com base na atividade) de alfa-2-antiplasmina: plasminogênio (PLG) (A2AP/PLG) em diferentes grupos de pacientes (as abreviações são as mesmas usadas na Figura 5).

[00127] A Figura 8 mostra a atividade do plasminogênio (PLG) em uma população controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com lesão / insuficiência renal aguda (AKI).

[00128] A Figura 9 mostra a atividade de alfa-2-antiplasmina (A2AP) em uma população controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com lesão / insuficiência renal aguda (AKI).

[00129] A Figura 10 mostra a razão (com base na atividade) de alfa-2-antiplasmina : plasminogênio (PLG) (A2AP/PLG) em uma população

de controle (PC) em comparação a um grupo de pacientes com lesão / insuficiência renal aguda (AKI).

[00130] A Figura 11 mostra a atividade do plasminogênio (PLG) em uma população de controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com coagulação intravascular disseminada (DIC).

[00131] A Figura 12 mostra a atividade de alfa-2-antiplasmina (A2AP) em uma população de controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com coagulação intravascular disseminada (DIC).

[00132] A Figura 13 mostra a razão (com base na atividade) de alfa-2-antiplasmina : plasminogênio (PLG) (A2AP/PLG) em uma população de controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com coagulação intravascular disseminada (DIC).

[00133] A Figura 14 mostra a atividade do plasminogênio (PLG) em uma população de controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com sepse (Sepsis).

[00134] A Figura 15 mostra a atividade de alfa-2-antiplasmina (A2AP) em uma população de controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com sepse (Sepsis).

[00135] A Figura 16 mostra a razão (com base na atividade) de alfa-2-antiplasmina : plasminogênio (PLG) (A2AP/PLG) em uma população de controle (CP) em comparação a um grupo de pacientes com sepse (Sepsis).

[00136] A Figura 17 mostra o resumo de um estudo diagnóstico para deficiência adquirida de plasminogênio (PLG). Neste documento, mede-se o percentual de atividade do plasminogênio (PLG). Neste documento, 40% dos pacientes com lesão renal aguda (AKI) e 62% dos pacientes com coagulação intravascular disseminada (DIC) apresentaram uma deficiência estatisticamente significativa do plasminogênio (PLG) em comparação a uma população de controle (CP).

EXEMPLOS

PREPARAÇÃO DAS PREPARAÇÕES DE GLU-PLASMINOGÊNIO

[00137] O Glu-plasminogênio foi preparado conforme descrito no Exemplo Experimental 1 do documento WO 2018/162754 com uma pureza > 95% (p/p) com base no teor total de proteínas. A preparação de Glu-plasminogênio humano continha 1256 µg/mL de Glu-plasminogênio (conforme determinado pelo ensaio de imunoabsorção enzimática, ELISA).

[00138] O teor total de proteína dessa preparação foi de 1259 µg/mL (conforme determinado pelo ensaio de proteína de Bradford). Assim, verificou-se que a pureza do Glu-plasminogênio foi > 99,7% em peso, com base no teor total de proteínas. A alta pureza também foi confirmada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE).

[00139] A atividade proteolítica do Glu-plasminogênio (conforme determinado por um ensaio padronizado de atividade proteolítica de S-2288 (Chromogix), em referência ao teor total de proteínas, unidades/1,0 g/L do teor total de proteínas) foi verificada abaixo do limite de detecção.

[00140] A preparação de Glu-plasminogênio humano continha apenas um nível insignificante de endotoxina << 1 EU/mL (conforme determinado em um ensaio do endocromo Endosafe com Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL), de acordo com a Farmacopeia Europeia (versão 5.0) capítulo 2.6.14), e < 0,35 g/L IgG, < 0,05 g/L IgA e < 0,35 g/L de IgM (cada um determinado em um ensaio nefelométrico). A albumina (determinada por uma determinação de ponto final policromático) e o Lys-plasminogênio (determinado pelo Western Blot) não foram detectáveis.

[00141] Em outro teste de bioatividade, a concentração do Glu-plasminogênio humano foi ajustada para 200 µg/mL e, em seguida, foi ativada para plasmina. Isso corresponde a uma faixa de concentração

que ocorre naturalmente no sangue. A atividade proteolítica da solução de plasmina obtida foi determinada por meio de um substrato de peptídeo de plasmina marcado com para-nitrofenol (marcado com pNP). Verificou-se que a atividade proteolítica da plasmina estava em uma faixa de 109% em comparação à atividade que ocorre naturalmente na atividade proteolítica da plasmina no plasma sanguíneo, que foi normalizada para 100%. Assim, verificou-se que o Glu-plasminogênio humano era totalmente bioativo e poderia ser convertido em plasmina totalmente ativa.

EXEMPLO 1

MODELO ANIMAL (INDUÇÃO DE MICROTROMBOS EM CAMUNDONGOS POR CRISTAIS DE COLESTEROL)

DESENCADEANDO A FORMAÇÃO DE MICROTROMBOS NO RIM

[00142] Os camundongos foram administrados com colesterol (CC) por meio de uma injeção de 10 mg/kg, 100 µL/camundongo em um vaso sanguíneo que leva ao rim. O momento da injeção foi considerado como ponto de tempo zero (0 hora). Verificou-se que o colesterol leva à formação de coágulos em vasos menores no rim, em particular nos capilares renais.

TRATAMENTO COM PLASMINOGÊNIO (PLG)

[00143] O Glu-plasminogênio foi preparado conforme descrito no Exemplo Experimental 1 do documento WO 2018/162754 com uma pureza > 95% (p/p). As propriedades foram as descritas acima. Alguns camundongos permaneceram sem tratamento. Os que foram tratados foram administrados com injeção intravenosa (i.v.) de 132 µL/camundongo de uma composição contendo 65 µg/mL de Glu-plasminogênio em solução salina tamponada com fosfato 4 horas após a administração do colesterol. A injeção de solução salina tamponada com fosfato após 4 horas da administração de colesterol foi utilizada como grupo de controle, sem tratamento. Como um grupo de controle

adicional, a injeção de PBS em vez de CC e a injeção de 132 µL/camundongo de uma composição contendo 65 µg/mL de Glu-plasminogênio em solução salina tamponada com fosfato foram analisadas após 4 horas.

LEITURA

[00144] 24 Horas após a administração do colesterol, determinou-se a taxa de filtração glomerular (GFR). Além disso, o tamanho do infarto no rim foi determinado por meio de coloração com cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) do tecido renal. Além disso, os camundongos sacrificados foram examinados histologicamente, por exemplo, por meio da determinação da classificação da lesão tubular (PAS), da lesão endotelial (CD31) e da filtração de imunócitos neutrófilos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

[00145] Os resultados quantitativos são representados como as Figuras de 1 a 3. Verificou-se que a administração de colesterol causa microtrombos. Eles também foram encontrados na observação histológica do rim dos camundongos após 24 horas. Verificou-se que estes microtrombos têm um efeito significativo sobre a taxa de filtração glomerular (GFR) (cf. Figuras 1 e 2, amostras incluindo o colesterol (CC)) e causam necrose de mais da metade (50%) do tecido renal (cf. Figura 3, amostras incluindo apenas colesterol (CC)). Verificou-se que a administração do (Glu-)plasminogênio isoladamente não tem um impacto significativo sobre a taxa de filtração glomerular (GFR) (cf. Figuras 1 e 2, direita). Ela também não restaura a taxa de filtração glomerular (GFR) realizada por microtrombos causados pela administração do colesterol (cf. Figuras 1 e 2, amostras incluindo colesterol (CC) e (Glu-)plasminogênio (Glu P)).

[00146] No entanto, a administração do (Glu-)plasminogênio preveniu efetivamente a necrose do tecido (cf. Figura 3, amostras incluindo colesterol (CC) e (Glu-)plasminogênio (Glu-P)).

[00147] A necrose foi reduzida pela metade em comparação à necrose encontrada quando apenas o colesterol é administrado. Assim, o (Glu-)plasminogênio reduziu efetivamente o tamanho do infarto.

[00148] Estes resultados mostram que a administração do (Glu-) plasminogênio trata e impede efetivamente que um paciente sofra de (micro)trombos.

[00149] O (Glu-)plasminogênio produzido de acordo com esta invenção tem surpreendentemente uma atividade fibrinolítica alta e excelente em eventos (micro)trombóticos. Sem estar vinculado a essa teoria, presume-se que o (Glu-)plasminogênio resolva os microtrombos existentes e possa ser usado na profilaxia de eventos micro- e/ou macrotrombóticos. Esses eventos (micro)trombóticos geralmente são causais em infartos como, por exemplo, infartos do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, infartos renais, uma oclusão da veia retiniana, púrpura trombocitopênica trombótica, etc.

EXEMPLO 2

[00150] Situações clínicas com deficiência adquirida de plasminogênio (PLG) causada pelo consumo de plasminogênio (PLG).

[00151] Em geral, uma deficiência adquirida de plasminogênio (PLG) poderia ser esperada em condições que causassem um aumento no consumo de plasminogênio (PLG), em particular Glu-plasminogênio. Isso provavelmente pode ser encontrado em qualquer tipo de evento trombótico que tenha um histórico mais longo, como na aterosclerose. O dano do interior dos vasos sanguíneos, a íntima, pode durar por um período de tempo mais longo. Isso primeiro levará a uma ativação permanente, porém leve, do sistema de coagulação, convertendo permanentemente o fibrinogênio em fibrina. Desde que não se forme nenhum coágulo que obstrua todo o diâmetro dos vasos sanguíneos, o fluxo sanguíneo continuará intacto. Este coágulo pode ativar permanentemente o sistema fibrinolítico. Aqui, o plasminogênio (PLG)

(por exemplo, Glu-plasminogênio) será transformado em plasmina e, portanto, o plasminogênio (PLG) (por exemplo, Glu-plasminogênio) é consumido. Atualmente, existem duas abordagens terapêuticas: primeira, até que não se forme nenhum coágulo de obstrução, a inibição da coagulação, como, por exemplo, por antagonistas da vitamina K, é suficiente. Quando o coágulo é formado (o que pode resultar em, por exemplo, infarto do miocárdio, um acidente vascular cerebral, etc.), até o momento, somente a terapia trombolítica é uma opção. Isso é normalmente realizado pela ativação do plasminogênio (PLG) por tPA, UPA ou estreptoquinase.

[00152] O uso de um dos três fármacos requer a presença do plasminogênio (PLG) enzimático direcionado. No caso da deficiência adquirida de plasminogênio (PLG), o alvo para a terapia de lise não está mais presente. Verificou-se surpreendentemente que, neste caso e em qualquer outra deficiência adquirida de plasminogênio (PLG) (por exemplo, Glu-plasminogênio), a substituição desta proteína pode ser de suporte no tratamento de salvamento desses pacientes.

[00153] Quando os trombos são formados, o plasminogênio (PLG) (por exemplo, o Glu-plasminogênio) do plasma será consumido devido à ativação local. Quanto maior a quantidade de fibrina localizada em um único macrotrombo grande ou em muitos locais nos microtrombos, especialmente durante um evento que se agrava durante um período mais longo, normalmente maior é o consumo de plasminogênio (PLG). Isso pode resultar em deficiência transitória adquirida de plasminogênio (PLG), levando o equilíbrio para um estado hipofibrinolítico e, portanto, protrombótico (cf. Figura 4). Níveis reduzidos de plasminogênio (PLG) foram mostrados em várias condições, incluindo a sepse, doença hepática, infarto do miocárdio, febre hemorrágica Argentina e, após terapia com L-asparaginase, terapia trombolítica e cirurgia. Devido ao importante papel da proteína na fibrinólise, um nível reduzido de

plasminogênio (PLG) pode comprometer a capacidade do corpo de degradar a fibrina e, portanto, causar predisposição à trombose/doenças trombóticas.

[00154] Assim, verificou-se que a causa da doença trombótica pode estar tanto na hipercoagulação quanto na hipofibrinólise. Os tratamentos atuais se concentram na (hiper-)coagulação somente, usando heparina, varfarina ou antagonistas de F.X.

[00155] Foi surpreendentemente observado que o consumo de plasminogênio (PLG) leva a uma hipofibrinólise que também pode ser denominada uma deficiência transitória adquirida de plasminogênio (PLG) (por exemplo, Glu-plasminogênio). Assim, verificou-se que o tratamento de uma deficiência transitória adquirida de plasminogênio (PLG) (por exemplo, Glu-plasminogênio) é capaz de resolver a doença trombótica. Estudos diagnósticos em doenças com alta prevalência e um estado potencialmente fatal evidenciaram esse achado.

EXEMPLO 2.1

LESÃO / INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA (AKI)

[00156] O rim é um dos órgãos envolvidos nas falhas de múltiplos órgãos, também chamadas de “Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS)”.

[00157] Isto é definido como a presença de função orgânica alterada em um paciente com doença aguda e no qual a homeostase não pode ser mantida sem intervenção. A MODS pode eventualmente levar à síndrome da falência de múltiplos órgãos (MOFS) e à morte. A lesão pulmonar aguda (ALI) e a síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS) são manifestações comuns de MODS ou MOFS. No entanto, outras condições além da sepse podem causar MODS, incluindo trauma, queimaduras e choque hemorrágico grave. As disfunções de múltiplos órgãos, o extremo final do continuum, são graus incrementais de desarranjos fisiológicos em órgãos individuais (isto é, processos em

vez de eventos). A alteração na função dos órgãos pode variar muito, variando de um grau leve de disfunção orgânica à falência explícita de órgãos (consulte a falência múltipla de órgãos da sepse, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SARS), síndrome do choque tóxico e tromboflebite séptica).

[00158] Em uma insuficiência renal aguda, a microcirculação no rim é reduzida de forma que não há mais produção de urina. Isso permite uma avaliação objetiva da função renal e sua recuperação.

[00159] Em pacientes com uma lesão / insuficiência renal aguda (AKI) e uma patogênese por um período mais longo, os níveis de plasminogênio (LPC) foram bastante baixos em comparação a pacientes sem uma gênese vascular. Um estudo com este foco foi realizado junto com o Departamento de Química Clínica (IKC) do Hospital Universitário Mannheim. Até março de 2018, foram coletadas amostras de plasma tratadas com citrato de 77 pacientes, armazenadas a temperaturas abaixo de -40 °C. Todas as amostras foram medidas em lote para plasminogênio (PLG) e alfa-2-antiplasmina em um analisador BCS XP (SIEMENS Healthcare) em um laboratório com certificação DIN EN ISO 15189. Um grupo de 53 doadores sadios de plasma foi utilizado como controle nas mesmas condições. Os resultados foram avaliados utilizando-se o teste-U de acordo com Mann-Whitney.

[00160] No primeiro estudo de validação, pacientes com insuficiência renal aguda intra-renal foram selecionados no Departamento de Química Clínica (IKC), Mannheim, seguidos de critérios da rede de lesão renal aguda (AKIN). Parâmetros essenciais: a creatinina aumenta até 1,5 vezes o valor convencional em combinação com a redução da produção de urina.

ESBOÇO DO ESTUDO DA LESÃO / INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA (AKI)

[00161] - Parâmetros: Alfa-2-antiplasmina (A2-AP), plasminogênio

(PLG), atividade, razão $R = A2-AP/plasminogênio$ (PLG) em amostras de sangue, usada também para o diagnóstico convencional;

[00162] - 77 pacientes com lesão / insuficiência renal aguda (AKI);

[00163] - 53 populações de controle (doadores de sangue saudáveis) (CP).

[00164] Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e mostraram:

[00165] - uma significativa (**) deficiência adquirida de plasminogênio (PLG) em pacientes com AKI;

[00166] - uma significativa (**) deficiência adquirida de alfa-2-antiplasmina em pacientes com AKI;

[00167] - nenhuma diferença significativa da razão (com base na atividade) (A2AP/PLG).

TABELA 1. RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DE PLASMINOGÊNIO (PLG) EM PACIENTES COM AKI VERSUS CONTROLE.

Tabela analisada	Dados
Coluna A	CP-plasminogênio (PLG) (grupo de controle)
Coluna B	AKI-plasminogênio (PLG) (grupo de pacientes com AKI)
Teste de Mann-Whitney:	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,0031
Resumo do valor P	**
As médias são significativamente diferentes? ($P < 0,05$)	Sim
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	4096, 4420
U de Mann-Whitney	1417

[00168] O teste de Mann-Whitney de lesão / insuficiência renal aguda (AKI) mostrou uma diferença significativa da atividade do plasminogênio (LPC). $P = 0,0031$ em pacientes (Ptx-77) e grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 8.

TABELA 2. RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DE ALFA-2-ANTIPLASMINA EM PACIENTES COM AKI VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	Dados
Coluna A	CP-alfa-2-antiplasmina (grupo de controle)
Coluna B	AKI-alfa-2-antiplasmina (grupo de pacientes com AKI)
Teste de Mann-Whitney:	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,0011
Resumo do valor P	**
As médias são significativamente diferentes? ($P < 0,05$)	Sim
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	4160, 4355
U de Mann-Whitney	1352

[00169] O teste de Mann-Whitney de insuficiência renal aguda mostrou diferença significativa de atividade da alfa-2-antiplasmina. $P = 0,0011$ em pacientes (Ptx-77) e grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 9.

TABELA 3. RESUMO DOS RESULTADOS DA RAZÃO DE ALFA-2-ANTIPLASMINA PARA PLASMINOGÊNIO (PLG) EM PACIENTES COM AKI VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	Dados
Coluna A	Razão CP (grupo de controle)
Coluna B	Razão AKI (grupo de pacientes com AKI)
Teste de Mann-Whitney:	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,1241
Resumo do valor P	Ns
As médias são significativamente diferentes? ($P < 0,05$)	Não
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	3147, 5369
U de Mann-Whitney	1716

[00170] O teste de Mann-Whitney de insuficiência renal aguda não mostrou diferença significativa da razão (com base na atividade) (A2AP/PLG; $P = 0,1241$) nos pacientes (Ptx-77) e no grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 10.

EXEMPLO 2.2

COAGULAÇÃO INTRAVASCULAR DISSEMINADA (DIC)

[00171] O estudo de validação de pacientes com coagulação intravascular disseminada (micro)coagulação (DIC) foi realizado pelo Departamento de Química Clínica (IKC), Mannheim. Os pacientes com DIC foram identificados pelos níveis de dímeros D e critérios internos.

ESBOÇO DO ESTUDO PARA DIC:

[00172] - parâmetros: atividade de alfa-2-antiplasmina (A2-AP), plasminogênio (PLG). Dímeros D, razão $R = A2-AP/plasminogênio (PLG)$ em amostras de sangue, usados também para o diagnóstico convencional;

[00173] - 13 pacientes com DIC (DIC);

[00174] - 53 populações de controle (CP).

[00175] Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e mostraram:

[00176] - uma significativa (**) deficiência adquirida de plasminogênio (PLG) em pacientes com DIC;

[00177] - sem deficiência adquirida de alfa-2-antiplasmina em pacientes com DIC;

[00178] - uma significativa (***) diferença da razão (A2AP/PLG) (com base na atividade) --> maior inibição da fibrinólise.

TABELA 4. RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DE PLASMINOGÊNIO (PLG) EM PACIENTES COM DIC VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	PLG
Coluna A	CP-plasminogênio (PLG) (grupo de controle)
Coluna B	DIC-plasminogênio (PLG) (grupo de pacientes com DIC)
Teste de Mann-Whitney	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,0013
Resumo do valor P	**
As médias são significativamente diferentes? (P < 0,05)	Sim
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	2256, 519
U de Mann-Whitney	288,0

[00179] O teste de Mann-Whitney da DIC mostrou uma diferença significativa da atividade do plasminogênio (PLG). P = 0,0013 em pacientes (Ptx-13) e grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 11.

TABELA 5. RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DE ALFA-2-ANTIPLASMINA EM PACIENTES COM DIC VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	A2-AP
Coluna A	CP-alfa-2-antiplasmina (grupo de controle)
Coluna B	DIC-alfa-2-antiplasmina (grupo de pacientes com DIC)
Teste de Mann-Whitney	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,0730
Resumo do valor P	ns
As médias são significativamente diferentes? (P < 0,05)	Não
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	2138; 637,5
U de Mann-Whitney	406,5

[00180] O teste de Mann-Whitney da DIC não mostrou diferença significativa da atividade alfa-2-antiplasmina. $P = 0,073$ em pacientes (Ptx-13) e grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 12.

TABELA 6. RESUMO DOS RESULTADOS DA RAZÃO DE ALFA-2-ANTIPLASMINA PARA PLASMINOGÊNIO (PLG) EM PACIENTES COM DIC VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	Razão-DIC
Coluna A	Razão CP (grupo de controle)
Coluna B	Razão DIC (grupo de pacientes com DIC)
Teste de Mann-Whitney	
Valor P (aproximação Gaussiana)	$< 0,0001$
Resumo do valor P	***
As médias são significativamente diferentes? ($P < 0,05$)	Sim
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	1634, 1141
U de Mann-Whitney	203,0

[00181] O teste de Mann-Whitney da DIC mostrou um aumento significativo da razão (com base na atividade) (A2AP/PLG; $P < 0,0001$) nos pacientes (Ptx-13) do que no grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 13.

[00182] Em resumo, em um estudo de 53 indivíduos de uma população de controle (saudável) (CP), 77 pacientes com lesão renal aguda (AKI) e 21 pacientes com coagulação intravascular disseminada (DIC), 40% dos pacientes com AKI e 62% dos pacientes com DIC apresentaram deficiência estatisticamente significativa do plasminogênio (PLG) em comparação com a população de controle (CP). No presente documento, o teste de Mann-Whitney mostrou um intervalo interquartil médio $p > 0,003$ para CP versus AKI e $> 0,001$ para CP versus DIC. Os resultados são mostrados na Figura 17.

EXEMPLO 2.3

SEPSE

[00183] O estudo de validação de pacientes com sepse foi realizado no Departamento de Química Clínica (IKC), Mannheim (identificação por dímeros D e critérios internos).

ESBOÇO DO ESTUDO PARA SEPSE:

[00184] - parâmetros: atividade de alfa-2-antiplasmina (A2AP), plasminogênio (PLG), Razão R = A2-AP/plasminogênio (PLG), PCTP, DD em amostras de sangue, usada também para o diagnóstico convencional;

[00185] - 9 Pacientes com sepse (sepse);

[00186] - 53 Populações de controle (CP).

[00187] Os resultados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e mostraram:

[00188] - uma significativa (*) deficiência adquirida de Plasminogênio (PLG) em pacientes com sepse;

[00189] - não há deficiência adquirida de alfa-2-antiplasmina em pacientes com sepse;

[00190] - nenhuma diferença significativa da razão (com base na atividade) (A2AP/PLG).

TABELA 7. RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DO PLASMINOGÊNIO (PLG) EM PACIENTES COM SEPSE VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	Sepse-PLG
Coluna A	CP-plasminogênio (PLG) (grupo de controle)
Coluna B	Sepse-plasminogênio (PLG) (grupo de pacientes com sepse)
Teste de Mann-Whitney	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,0377
Resumo do valor P	*
As médias são significativamente diferentes?	Sim

Tabela Analisada	Sepse-PLG
(P < 0,05)	
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	1774, 179
U de Mann-Whitney	134,0

[00191] O teste de Mann-Whitney mostrou uma diferença significativa da atividade do plasminogênio (PLG). $P = 0,0377$ em pacientes (Ptx-9) e grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 14.

TABELA 8. RESUMO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE DE ALFA-2-ANTIPLASMINA EM PACIENTES COM SEPSE VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	Sepse-A2AP
Coluna A	CP-alfa-2-antiplasmina (grupo de controle)
Coluna B	Sepse-Alfa-2-antiplasmina (grupo de pacientes com sepsis)
Teste de Mann-Whitney	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,0704
Resumo do valor P	ns
As médias são significativamente diferentes? (P < 0,05)	Não
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	1761; 192,5
U de Mann-Whitney	147,5

[00192] O teste de Mann-Whitney não mostrou diferença significativa da atividade de alfa-2-antiplasmina: $P = 0,0704$ em pacientes (Ptx-9) e grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 15.

TABELA 9. RESUMO DOS RESULTADOS DA RAZÃO DE ALFA-2-ANTIPLASMINA PARA PLASMINOGÊNIO (PLG) EM PACIENTES COM SEPSE VERSUS GRUPO DE CONTROLE

Tabela Analisada	Razão para sepse
Coluna A	Razão CP (grupo de controle)
Coluna B	Razão para sepse (grupo de pacientes com sepse)
Teste de Mann-Whitney	
Valor P (aproximação Gaussiana)	0,2182
Resumo do valor P	ns
As médias são significativamente diferentes? ($P < 0,05$)	Não
Valor P uni- ou bicaudal?	Bicaudal
Soma das classificações na coluna A, B	1608; 345,5
U de Mann-Whitney	176,5

[00193] O teste de Mann-Whitney mostrou uma razão (A2AP/PLG; $P = 0,2182$) não significativa, porém aumentada nos pacientes (Ptx-13) em relação ao grupo de controle (CP-53). Os resultados são mostrados na Figura 16.

EXEMPLO 2.4

POPULAÇÃO DE CONTROLE

[00194] Dados brutos: medição do plasminogênio (PLG) e A2AP na população de controle (CP), doadores de plasma saudáveis de um centro de plasma.

[00195] As faixas de referência podem ser definidas no PLG da população de controle: 90% a 144%; A2AP: 97% a 119%; e Razão: 0,80 a 1,25.

TABELA 10. ATIVIDADE NORMALIZADA DO PLASMINOGÊNIO (PLG) E A2AP DE CONTROLES (NORMALIZADA PARA UMA ATIVIDADE MÉDIA DE 100%)

Controles	Nº	PLG	A2AP	Razão
	1	101,3	105,1	1,04
5 de 50 indivíduos = > 1,26	2	94,4	97,3	1,03
	3	107,3	97,1	0,90
	4	103,7	107,3	1,03
	5	103,8	108,9	1,05

Controles	Nº	PLG	A2AP	Razão
	6	100,4	105,9	1,05
	7	96,3	101,4	1,05
	8	81,6	103,3	1,27
	9	95	94,9	1,00
	10	147,9	114,1	0,77
	11	120,8	113	0,94
	12	122	108,3	0,89
	13	116,5	98,5	0,85
	14	99,6	110,5	1,11
	15	100,9	98,3	0,97
	16	120,1	101,5	0,85
	17	107,6	108,7	1,01
	18	112,4	118,9	1,06
	19	96,7	106	1,10
	20	123,4	117,4	0,95
	21	100,9	107,4	1,06
	22	91,3	97	1,06
	23	123,4	117,4	0,95
	24	100,9	107,4	1,06
	25	91,3	97	1,06
	26	141,1	112	0,79
	27	110,9	108	0,97
	28	145,5	115,9	0,80
	29	100,1	106,7	1,07
	30	100,7	107,3	1,07
	31	149,5	118,9	0,80
	32	130,4	118,9	0,91
	33	95,7	97,9	1,02
	34	108	107,8	1,00
	35	91,1	115,2	1,26
	36	141,3	118,9	0,84
	37	111,3	105,6	0,95
	38	126,3	106,5	0,84
	39	97,2	112,6	1,16
	40	112,3	112,3	1,00
	41	89,3	108,8	1,22
	42	97,5	97,4	1,00

Controles	Nº	PLG	A2AP	Razão
	43	107,6	106	0,99
	44	95,1	96,9	1,02
	45	117,3	118,9	1,01
	46	94	93,7	1,00
	47	128,2	113,7	0,89
	48	85,9	108,5	1,26
	49	106,4	106,7	1,00
	50	123,7	103,4	0,84
	51	133,4	111,5	0,84
	52	115,4	107,4	0,93
	53	118,6	118,3	1,00
Média		110,06	107,52	0,99
Desvio padrão		16,65	7,19	0,12
Mín		81,60	93,70	0,77
Máx		149,50	118,90	1,27
Faixa		67,90	25,20	0,49
MW + 2SD		143,36	121,89	1,23
MW – 2SD		76,76	93,14	0,75
VK		15,13%	6,69%	11,95%
Percentil 80%		< 89,57	< 96,915	< 0,80
Percentil 120%		> 144,84	> 118,9	> 1,25

EXEMPLO 2.5

[00196] Diagnóstico em pacientes com deficiências adquiridas de plasminogênio (PLG) causadas pelo consumo de plasminogênio (PLG)

[00197] No *Centrum für Blutgerinnungsstörungen und Transfusionsmedizin (CBT)* Bonn, de um total de 6000 (de estados não agudos dos consultórios do GP (consultórios médicos de clínica geral / práticas familiares)) pacientes com níveis medidos de plasminogênio (PLG), todos os níveis com níveis reduzidos de plasminogênio (PLG) foram selecionados e analisados (n = 700 {11,6%}). Foi analisada a frequência do diagnóstico entre os pacientes com um nível reduzido de plasminogênio (PLG). Muitos acertos de diagnóstico ocorreram quando

uma deficiência de plasminogênio (PLG) não era esperada. Os resultados são mostrados na Figura 4 e na Tabela 11. Um estudo prospectivo no CBT é realizado para comprovar esses achados. Paralelamente, também é realizado um estudo prospectivo em pacientes agudos com o mesmo diagnóstico.

TABELA 11. RESULTADOS DO DIAGNÓSTICO EM DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES, CORRELAÇÕES DE DIFERENTES PARÂMETROS

	PLG	Quick	Tempo de Trombina	APTT	Prot. C Ativ.	Razão APC	ATIII	AZAP	Razão	PAI 1	Complexo PAP	Dímero D	PLT	CRP
PLG		0,1007	-0,1078	-0,0032	0,2576	-0,0103	0,1813	0,2097	-0,8148	0,1018	-0,0949	-0,0035	0,2000	0,1793
Quick			-0,0905	-0,2004	0,6040	0,1218	0,1539	0,2505	0,0537	-0,0438	-0,0387	0,0298	0,0357	-0,0497
Tempo de Trombina				0,0839	-0,0831	0,0635	-0,0483	-0,0368	0,0802	-0,0251	-0,1529	-0,0288	0,4293	-0,0754
APTT					-0,0864	-0,0025	-0,0559	-0,0167	-0,0063	0,0409	-0,1795	-0,0618	0,0515	0,0204
Prot. C At						-0,0104	0,2444	0,3517	-0,0354	0,0922	-0,1784	-0,0185	0,0630	0,0373
Razão APC							-0,0548	0,0509	0,0444	-0,0409	-0,3889	-0,0500	-0,0498	-0,0355
ATIII								0,4439	0,0512	-0,0878	-0,0624	-0,1363	0,2074	-0,1637
AZAP									0,3335	0,0394	0,0469	-0,1000	0,2259	-0,0136
Razão										-0,0721	0,1070	-0,0373	-0,0378	-0,1433
PAI 1											-0,2503	0,0517	-0,0330	0,1750
Complexo PAP												-0,0218	-0,2029	0,1150
Dímero D													-0,0869	0,2367
PLT														0,0359

[00198] A Tabela 11 descreve o coeficiente de correlação de uma regressão linear $R^2 = r$. Foi realizado no programa de computador Microsoft Excel (usando a função “KORREL” na versão alemã) correlacionando cada um dos dois parâmetros entre si. Isso indica se há ou não uma relação estatística entre dois parâmetros. Supõe-se que as taxas de correlação r de $-0,5 > r < 0,5$ indicam nenhuma correlação ou uma correlação fraca. As taxas de correlação r de $-1,0$ a $-0,5$ ou $0,5$ a $1,0$ indicam uma correlação significativa. Assim, houve apenas uma correlação significativa para PLG com a Razão e para Quick com Pro C Ativ.

[00199] Na Tabela 11, os seguintes parâmetros são mostrados: PLG: plasminogênio [IU/mL]; Quick [seg]; tempo de trombina [seg]; APTT: tempo de tromboplastina parcial ativada [seg]; Prot C Ativ. = proteína C ativada [IU/mL]; razão APC: resistência à proteína C ativada [%]; ATIII = antitrombina III [%]; A2AP: alfa-2-antiplasmina [%]; razão (A2AP/PLG), PAI 1: inibidor do ativador de plasminogênio 1 [ng/mL], complexo PAP: complexo plasminogênio-antiplasmina; Dímero D: dímero D; PLT = plaquetas [$\times 10^6/\mu\text{L}$]; CRP: Proteína C reativa [$\mu\text{g/mL}$].

TABELA 12. RESULTADOS DE VALORES P EM DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES

Doença	Abreviação	Valor P	n
Lipoproteína(A)	LpA	< 0,0001	119
Deficiência de ferro	Ferro	< 0,0001	55
Deficiência de vitamina D.	VitD	< 0,0001	37
Deficiência de vitamina K.	VitK	< 0,0001	21
Anemia	Anaem	< 0,0001	56
Nível de homocisteína	Hcys	< 0,0001	45
Deficiência de proteína Z.	PZ	< 0,0001	21
Trombose	Thromb	< 0,0001	81
Embolia	Emb	< 0,0001	86
Acidente Vascular Cerebral	Stroke	< 0,0005	9
Deficiência de vitamina H.	VitH	< 0,0001	87
Infarto do miocárdio	MI	n.s.	3

Doença	Abreviação	Valor P	n
Epistaxe	Epist	< 0,0001	71
Hipermenorreia	HM	< 0,0001	61
Síndrome de von Willebrand	vWS	< 0,0001	54
Morgus Meulengracht	Meul	< 0,0001	21
Doenças hepáticas	Li	< 0,0001	29
Doenças antifosfolípídicas	APL	< 0,0001	51
Enxaqueca	Migr	< 0,0001	29
Doenças tireoidianas	Thyr	< 0,0001	41
Abortos	Abort	< 0,0001	158
Não / população de controle	Norm	n/A	55

[00200] Neste estudo, o plasminogênio (PLG) foi identificado como um parâmetro independente. Não houve correlação com nenhum outro parâmetro do sistema de coagulação ou fibrinolítico, exceto a fraca correlação com a razão (A2AP/PLG) com base na atividade) (onde o plasminogênio (PLG) está presente). Todas as amostras foram coletadas de pacientes não agudos. Portanto, apenas alguns pacientes com infarto agudo do miocárdio estiveram presentes neste estudo. A população de pacientes selecionada (com baixos níveis de plasminogênio (PLG)) apresentou níveis normais de A2AP.

REIVINDICAÇÕES

1. Plasminogênio para uso em um método de prevenção ou tratamento de um evento trombótico em um paciente, caracterizado pelo fato de que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos com diâmetros inferiores a 1 mm.

2. Plasminogênio para uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o plasminogênio é Glu-plasminogênio.

3. Plasminogênio para uso, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o paciente apresenta uma deficiência adquirida de Glu-plasminogênio causada pelo aumento do consumo de Glu-plasminogênio, diminuição da biossíntese de Glu-plasminogênio ou uma combinação de ambos.

4. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o plasminogênio é Glu-plasminogênio e o paciente sofre de pelo menos uma região isquêmica que leva à necrose de pelo menos uma parte de um tecido sem a administração de Glu-plasminogênio ao referido paciente.

5. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o plasminogênio não tem atividade proteolítica.

6. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 4 e 5, caracterizado pelo fato de que o paciente apresenta deficiência adquirida de plasminogênio.

7. Plasminogênio para uso, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a deficiência adquirida de plasminogênio é causada pelo aumento do consumo de plasminogênio.

8. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 5 a 7, caracterizado pelo fato de que o plasminogênio é Lys-plasminogênio ou uma combinação de Glu-plasminogênio e Lys-plasminogênio ou uma combinação de Glu-

plasminogênio e Lys-plasminogênio e um ou mais derivados do plasminogênio.

9. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos, resultando em uma trombose ou embolização dos grandes vasos sanguíneos.

10. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de um estado patológico selecionado do grupo composto por estenose de artérias, veias, arteríolas, vênulas, capilares ou espasmos em artérias, veias, arteríolas, vênulas, capilares, resultando em doenças como lipoproteína(a)-anemia, deficiência de ferro, deficiência de vitamina D, deficiência de vitamina K, deficiência de vitamina H, anemia, homocisteinemia, deficiência de proteína Z, embolia, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, epistaxe, hipermenorreia, Síndrome de Von Willebrand, Morgus Meulengracht, uma disfunção hepática, síndrome antifosfolipídica, enxaqueca, uma disfunção tireoidiana, aborto, falhas terapêuticas na terapia de lise usando ativadores para plasminogênio (PLG) e uma combinação de dois ou mais destes.

11. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o paciente tem um nível sanguíneo de plasminogênio inferior ao nível sanguíneo de plasminogênio encontrado em toda a população da mesma espécie.

12. Plasminogênio para uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o nível sanguíneo de plasminogênio inferior é causado por uma ou mais razões selecionadas do grupo que consiste em alto consumo fisiológico ou patológico de plasminogênio, uma alta taxa de eliminação de plasminogênio, uma baixa taxa de expressão de plasminogênio e a presença de altos níveis de um ou mais

inibidores de plasminogênio.

13. Plasminogênio para uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o nível sanguíneo de plasminogênio inferior é causado por alto consumo fisiológico ou patológico de plasminogênio.

14. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o nível de plasminogênio no sangue do paciente é determinado e, caso o nível determinado de plasminogênio seja pelo menos 10% (mol/mol) menor em comparação ao nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie, o paciente é administrado com uma quantidade suficiente de plasminogênio para prevenir ou tratar um evento trombótico.

15. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que os microtrombos são microtrombos de capilares.

16. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de pelo menos uma região isquêmica que leva à necrose de pelo menos uma parte de um tecido sem a administração de plasminogênio ao referido paciente.

17. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de mais de um evento trombótico.

18. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de pelo menos uma região isquêmica que leva à necrose de pelo menos uma parte de um tecido sem a administração de plasminogênio ao referido paciente e mais de um evento trombótico.

19. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma

das reivindicações 1 a 18, caracterizado pelo fato de que o evento trombótico é causado por um infarto, causado por qualquer razão típica na patogênese dos infartos.

20. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o evento trombótico é causado pela ruptura de uma placa aterosclerótica contendo cristais de colesterol causados por hipercolesterolemia.

21. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que o evento trombótico é causado por um infarto, causado por qualquer razão típica na patogênese dos infartos, e pela ruptura de uma placa aterosclerótica contendo cristais de colesterol causados por hipercolesterolemia.

22. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o evento trombótico causa um infarto.

23. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 22, caracterizado pelo fato de que o paciente é administrado com plasminogênio pelo menos uma vez com uma dose de plasminogênio na faixa de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal ou 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal.

24. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o paciente é administrado com plasminogênio pelo menos uma vez dentro de 24 horas após a ocorrência de um evento trombótico, dentro de uma semana antes de ser submetido a um evento de alto risco de desenvolver um evento trombótico, como uma intervenção cirúrgica, ou regularmente, quando correr em risco de desenvolver um evento trombótico.

25. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 24, caracterizado pelo fato de que o paciente é

administrado com plasminogênio, de acordo com um dos seguintes esquemas de administração:

(A) o paciente é administrado com plasminogênio uma vez ao dia por um período de tempo de três ou mais dias, preferencialmente em que a administração é a administração intravenosa, em particular a administração intravenosa de uma dose única, cada uma na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal;

(B) o paciente é administrado com plasminogênio uma vez ao dia por um período de três ou mais dias, preferencialmente em que a administração é intra-arterial, em particular a administração intra-arterial de uma única dose, cada uma na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal.

(C) o paciente é administrado com plasminogênio uma vez ao dia por um período de três ou mais dias, de preferência em que a administração é administração intracraniana, em particular a administração intracraniana de uma dose única, cada uma na faixa de 0,01 a 1 mg/kg de peso corporal;

(D) o paciente é administrado com plasminogênio uma vez a cada dois dias por um período de tempo de três ou mais dias, preferencialmente em que a administração é administração intramuscular, em particular a administração intramuscular de uma dose única, cada uma na faixa de 0,05 a 10 mg/kg de peso corporal.

(E) o paciente é administrado com plasminogênio uma vez por semana por um período de tempo de três ou mais semanas, preferencialmente em que a administração é a administração subcutânea, em particular a administração subcutânea de uma dose única, cada uma na faixa de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal; ou

(F) o paciente é administrado com plasminogênio uma vez ao dia por um período de tempo de três a sete dias e é subsequentemente administrado uma vez a cada dois dias por um

período de tempo de três ou mais dias ou uma vez por semana por um período de tempo de três ou mais semanas.

26. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que o paciente é administrado com uma dose adequada para substituir não mais do que 15%, não mais do que 10% ou não mais do que 5%, da quantidade normal de plasminogênio no compartimento de plasma.

27. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 26, caracterizado pelo fato de que o paciente é:

(a) administrado com plasminogênio pelo menos uma vez com uma dose de plasminogênio na faixa de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal durante o período de tratamento; e subsequentemente

(b) o nível de plasminogênio no sangue do paciente é determinado em uma etapa (i) e, caso o nível determinado de plasminogênio seja pelo menos 10% (mol/mol) menor em comparação ao nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie, o paciente é administrado com uma quantidade suficiente de plasminogênio para prevenir ou tratar um evento trombótico em uma etapa adicional (ii), e opcionalmente

(c) as etapas (i) e (ii) são realizadas repetidamente, desde que o nível de plasminogênio determinado na etapa (i) seja pelo menos 10% (mol/mol) inferior em comparação ao nível médio encontrado em toda a população da mesma espécie.

28. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de trombose venosa profunda, trombose da veia pélvica, embolia pulmonar, um infarto de qualquer órgão, oclusão da veia retiniana, coagulação intravascular disseminada (DIC), púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), uma coincidência de angiopatia com eventos trombóticos na via do fluxo capilar, particularmente angiopatia diabética,

tromboflebite ou uma combinação de dois ou mais destes.

29. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, caracterizado pelo fato de que o paciente corre o risco de desenvolver um evento trombótico, em que o referido paciente sofre de aterosclerose ou estenose de artérias, foi submetido a uma cirurgia, em especial a cirurgia de revascularização, ou tem endoprótese de vaso sanguíneo.

30. Plasminogênio para uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 29, caracterizado pelo fato de que o paciente sofre de coagulação intravascular disseminada (DIC), lesão renal aguda (AKI), sepse ou uma combinação de dois ou mais destes.

Fig. 1

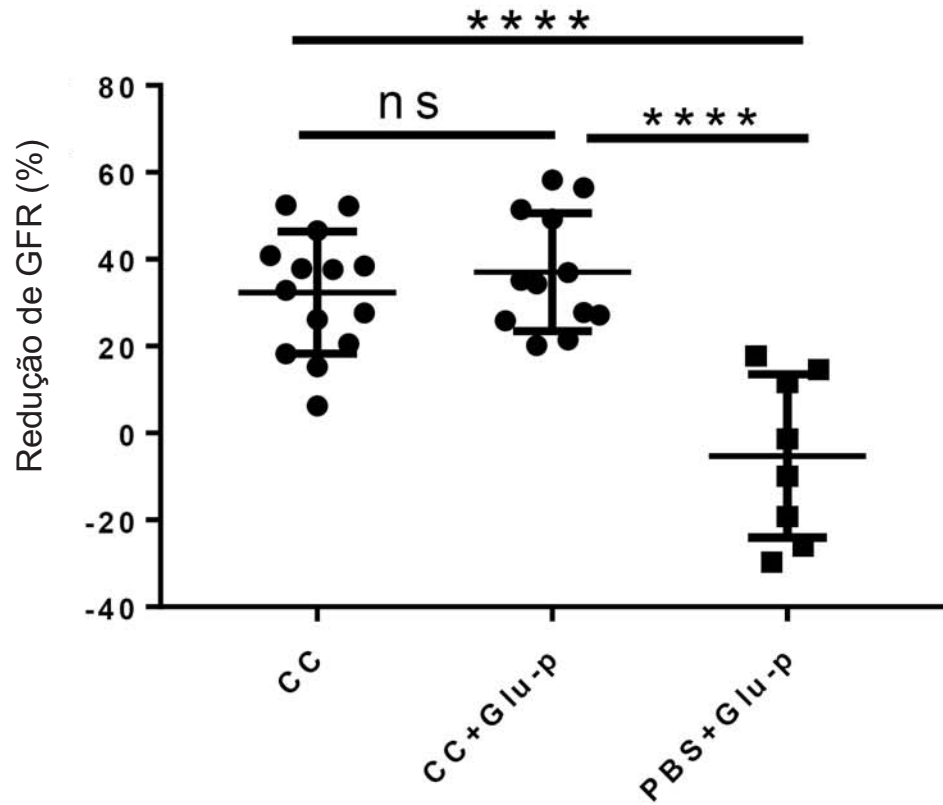


Fig. 2

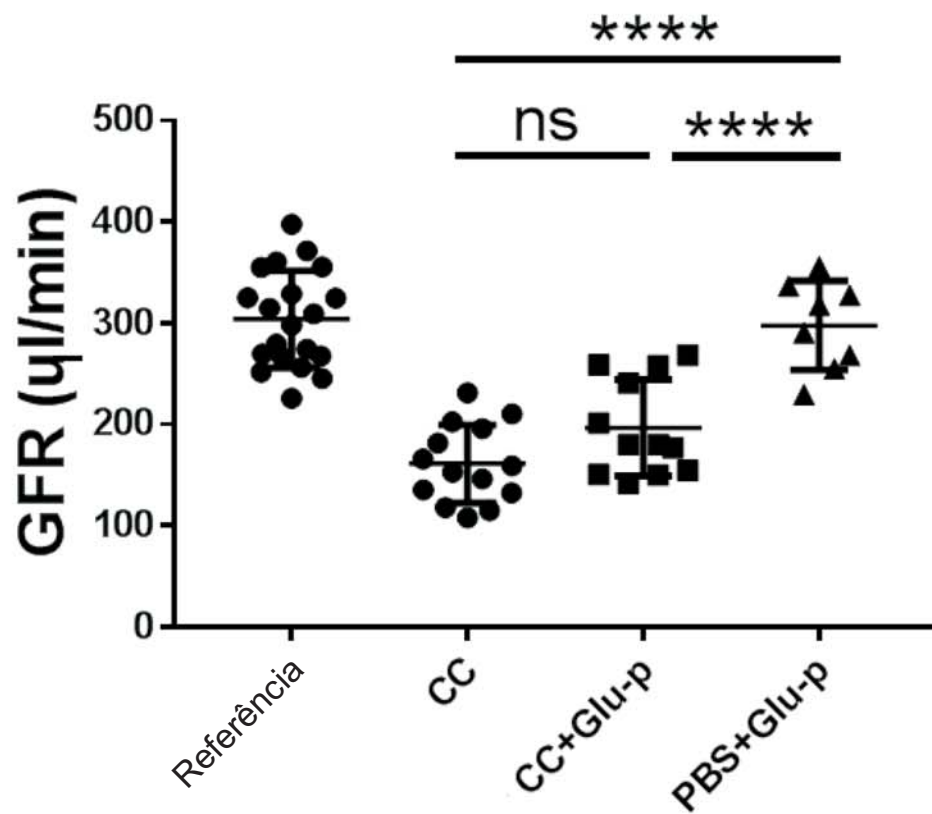
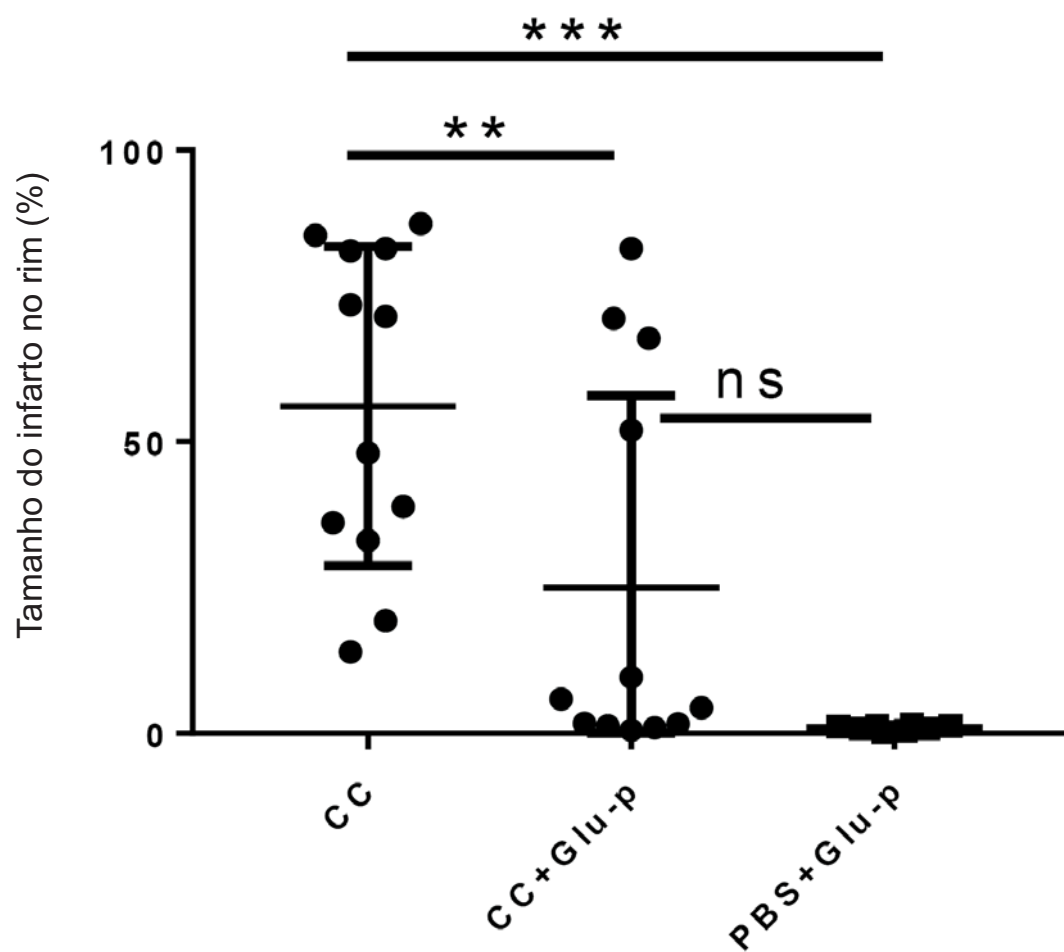
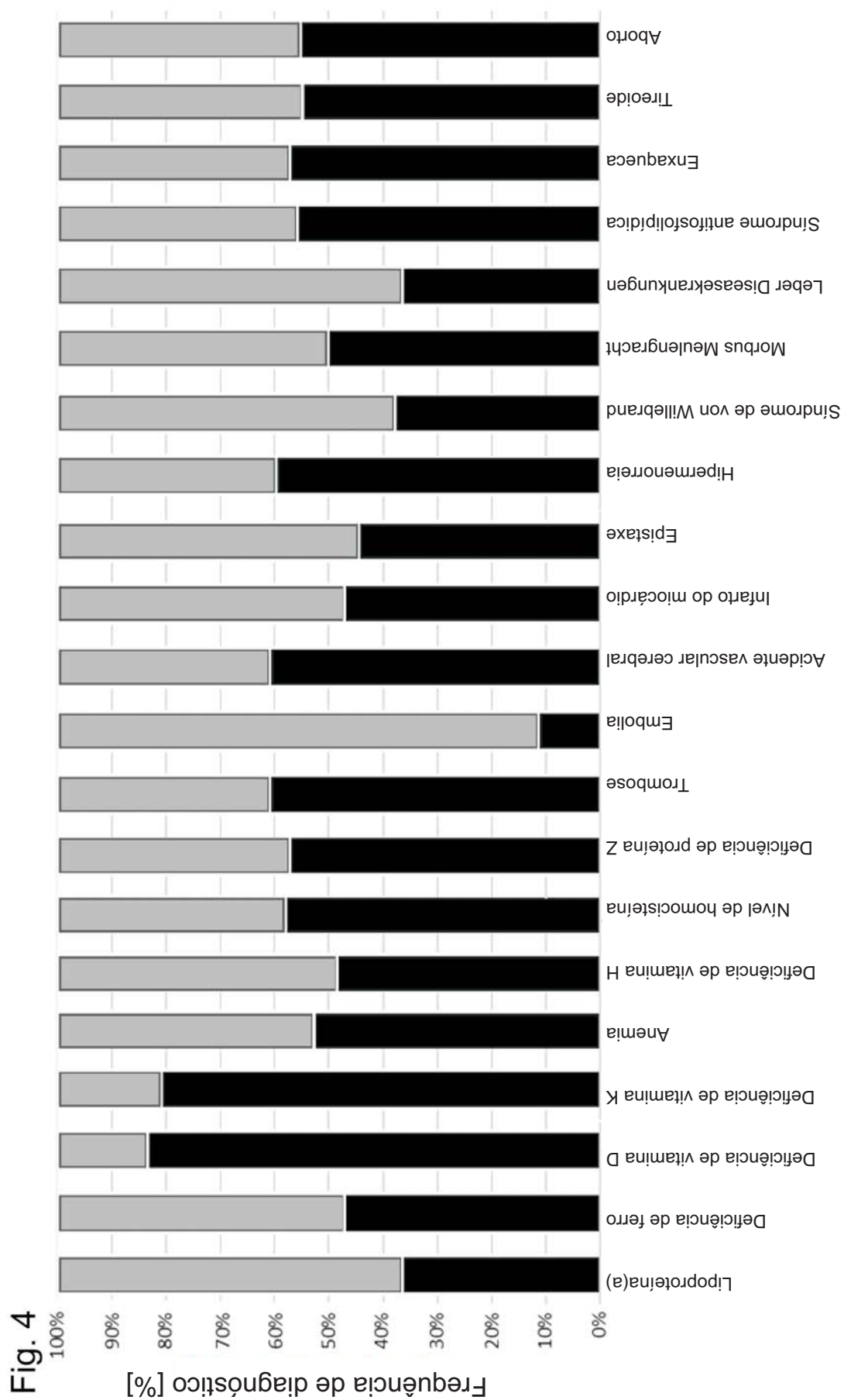
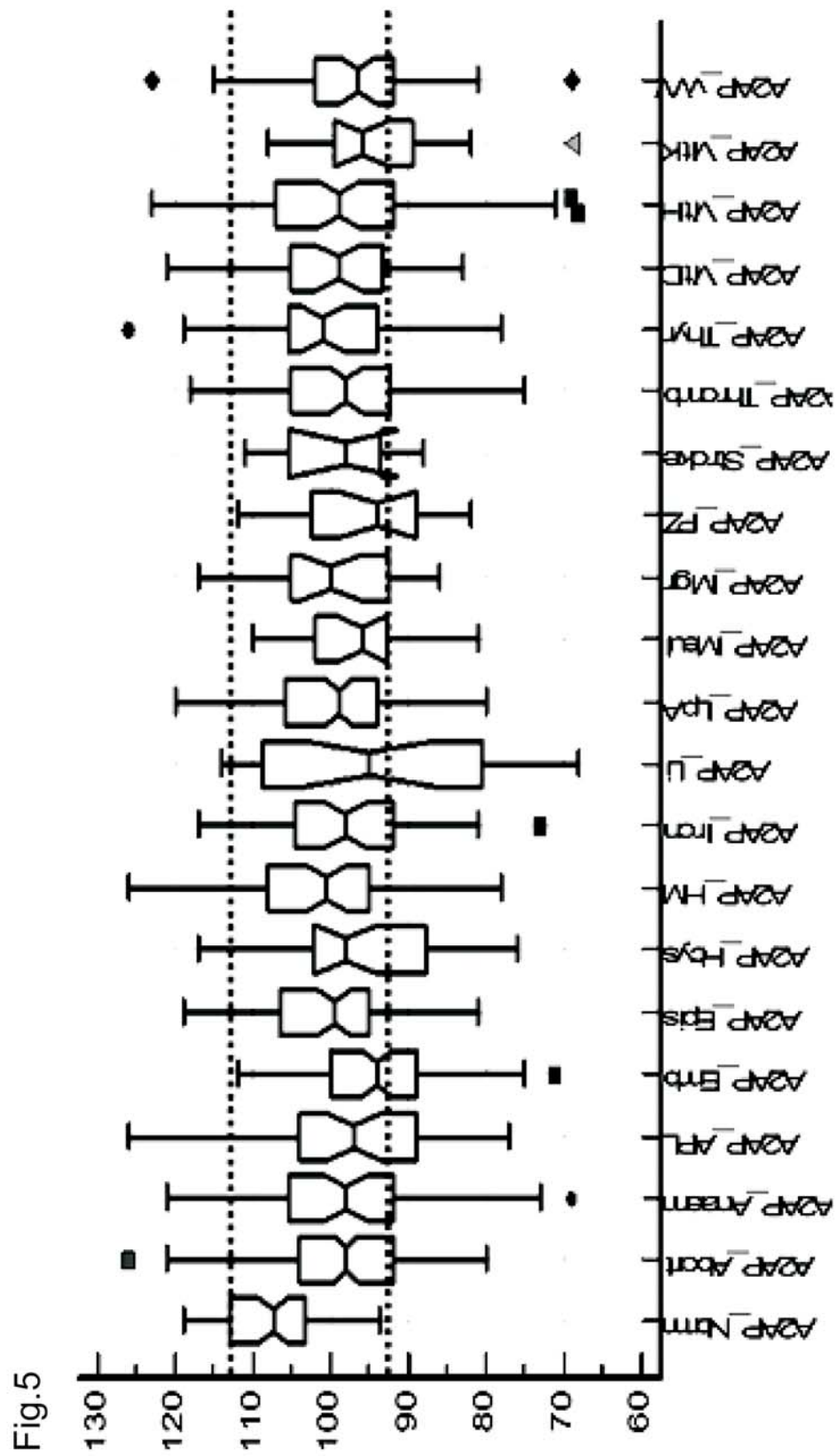
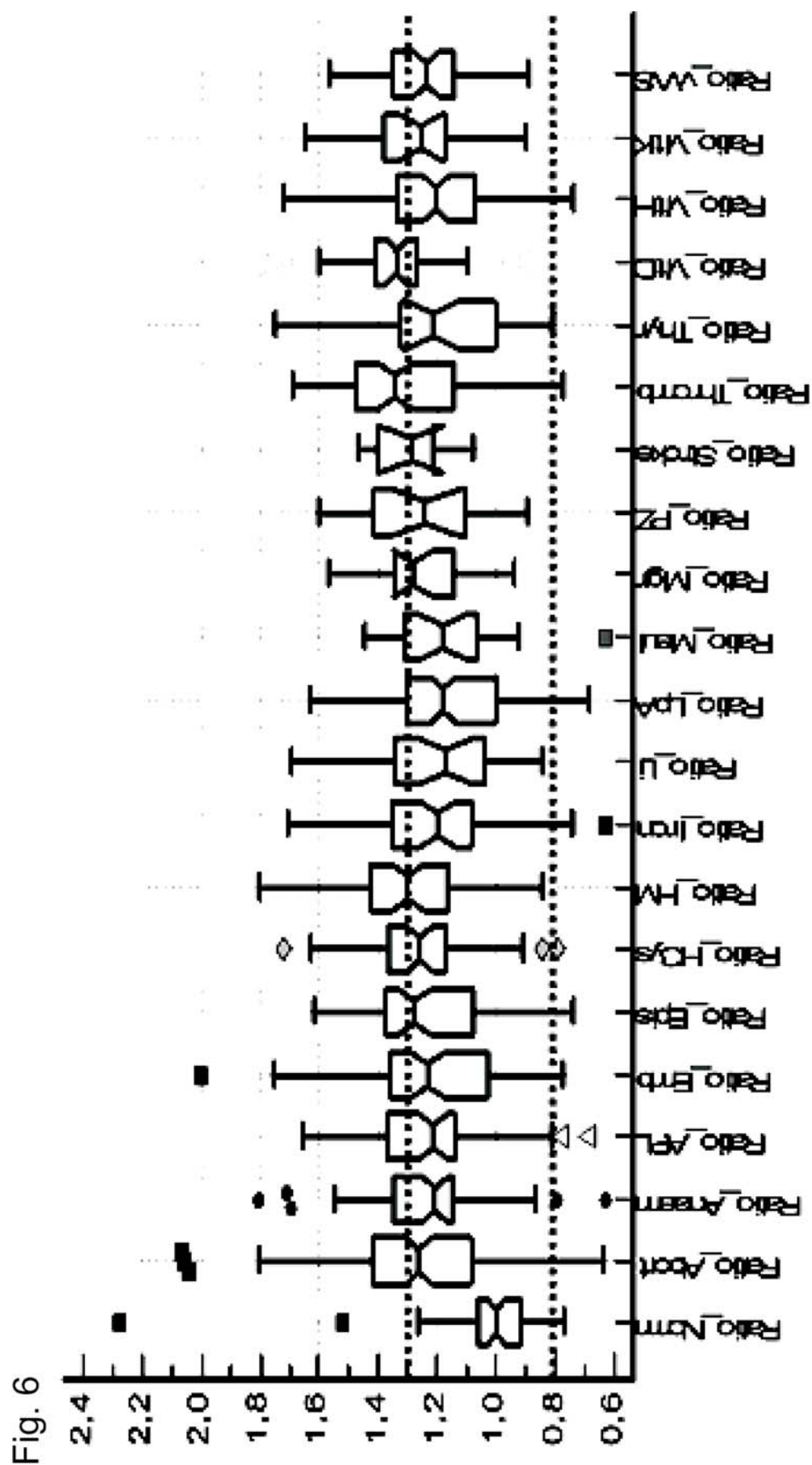


Fig. 3









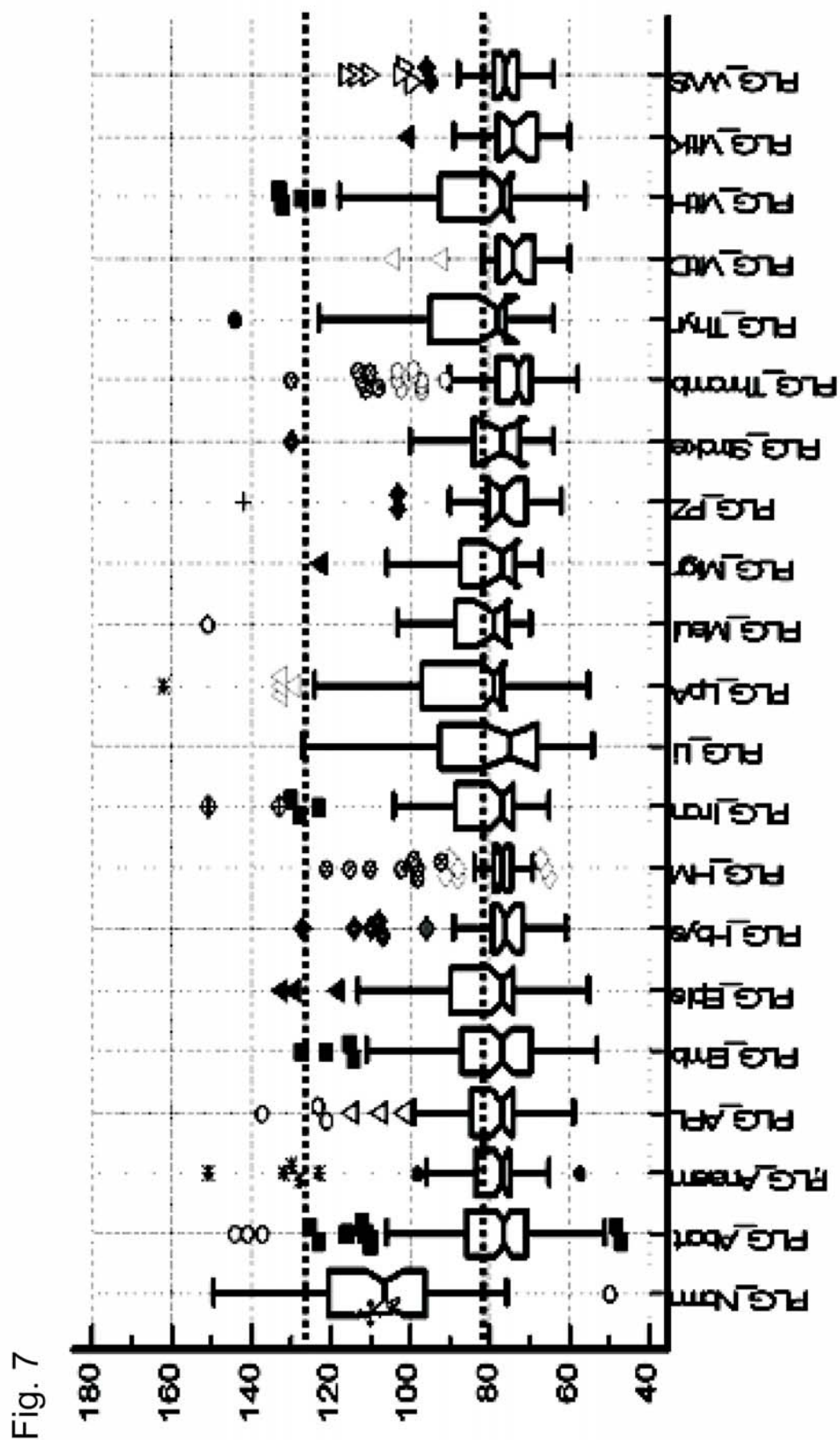


Fig. 8

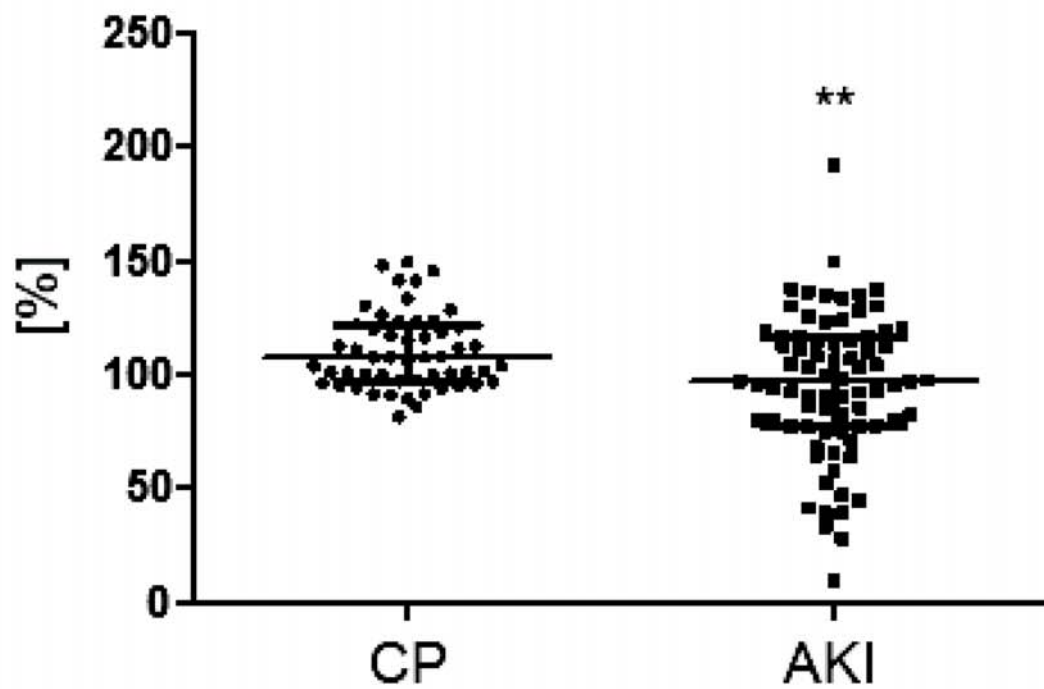


Fig. 9

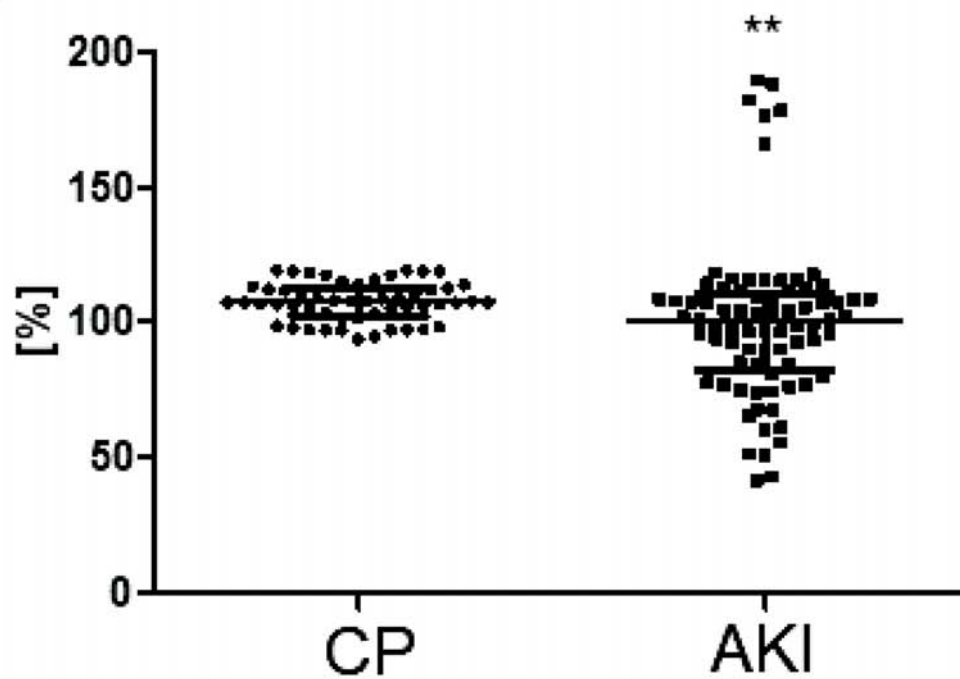


Fig. 10

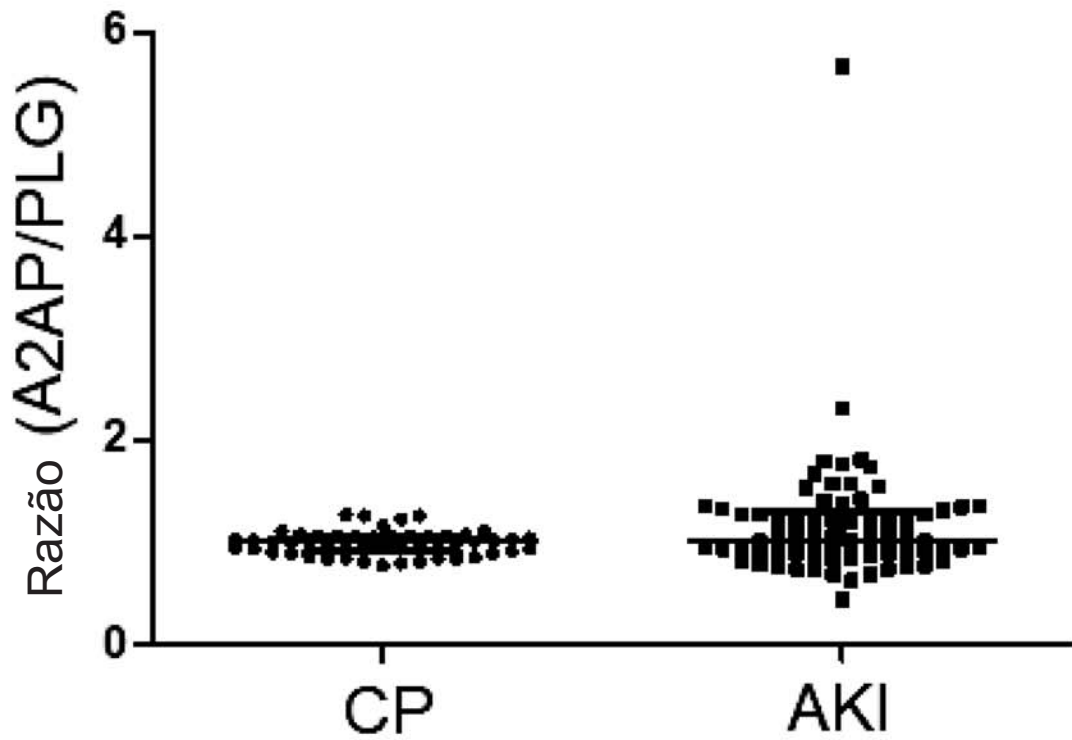


Fig. 11

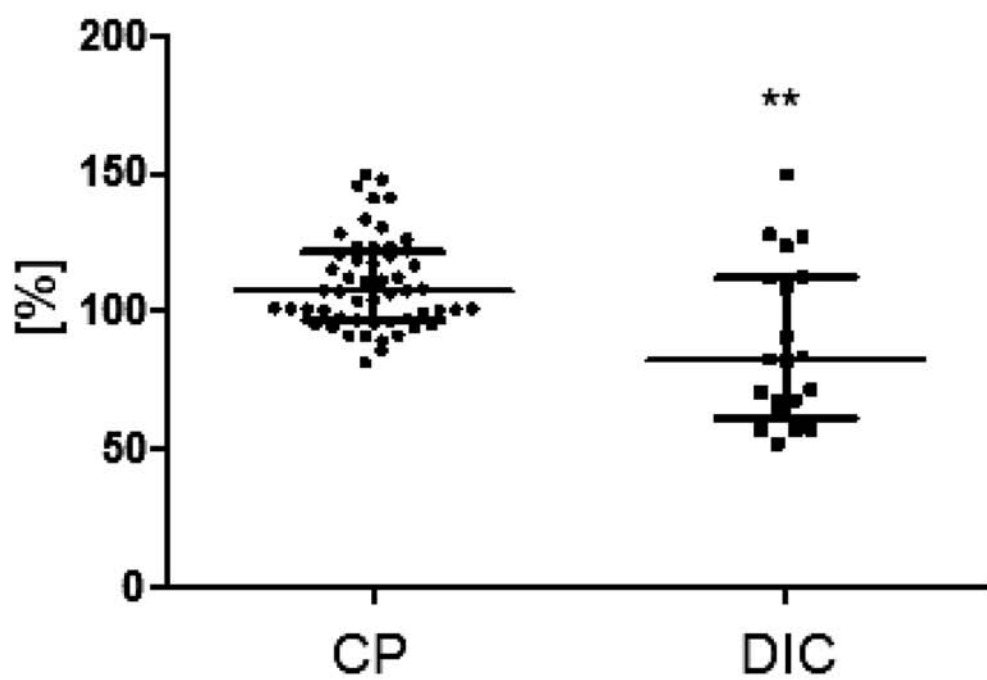


Fig. 12

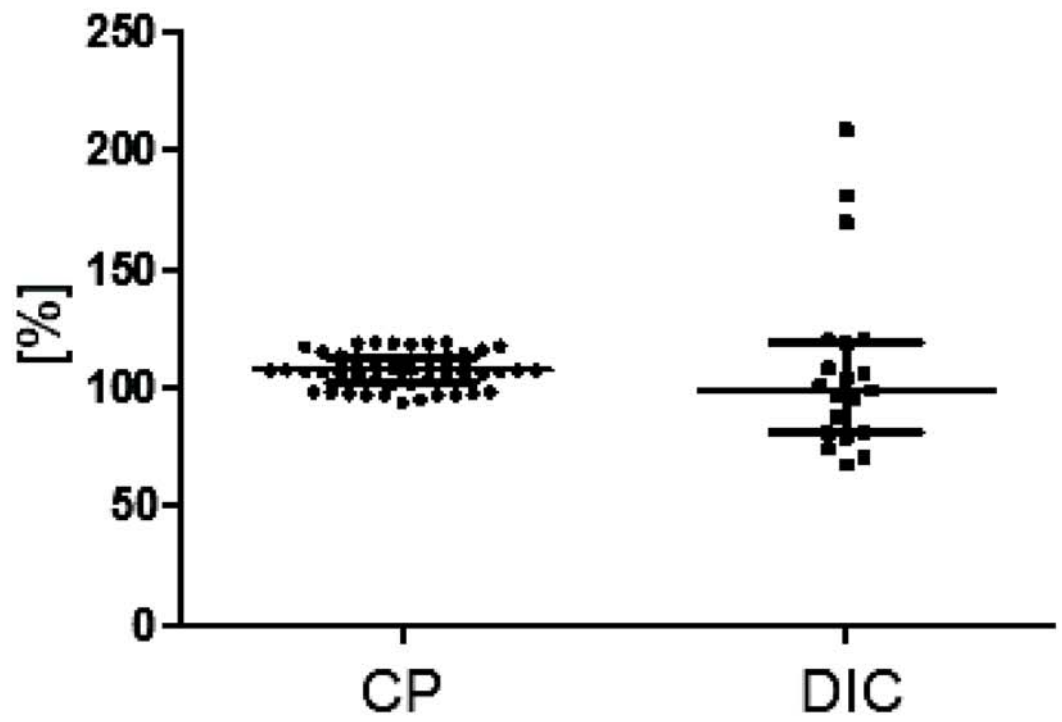


Fig. 13.

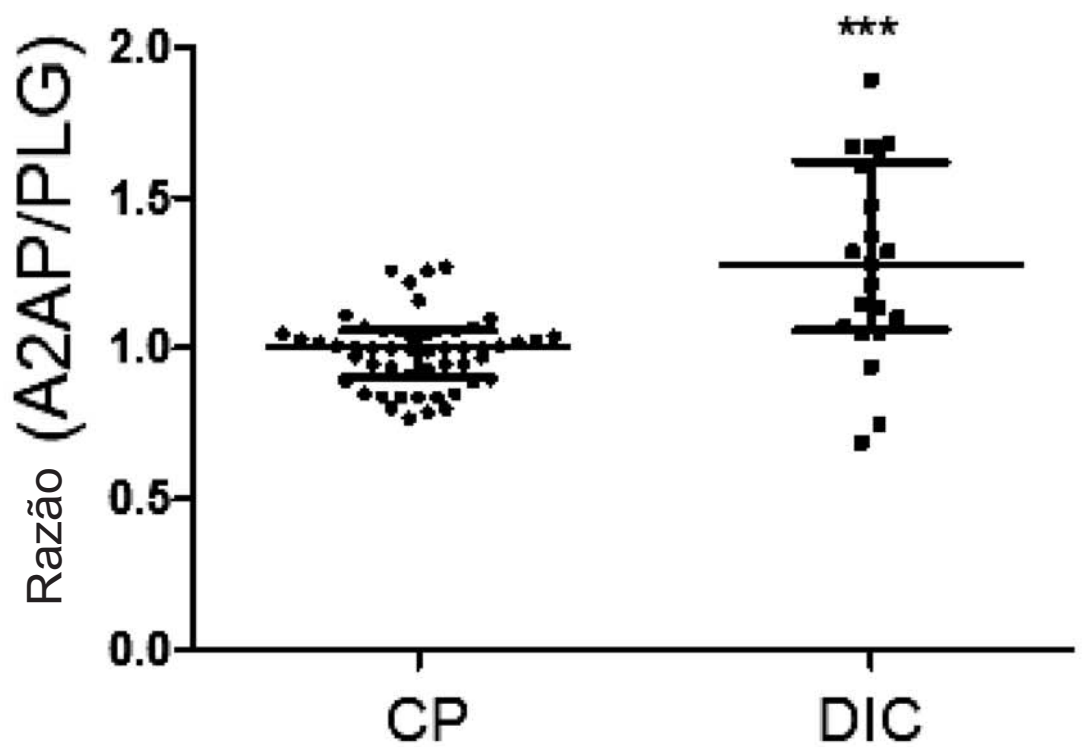


Fig. 14

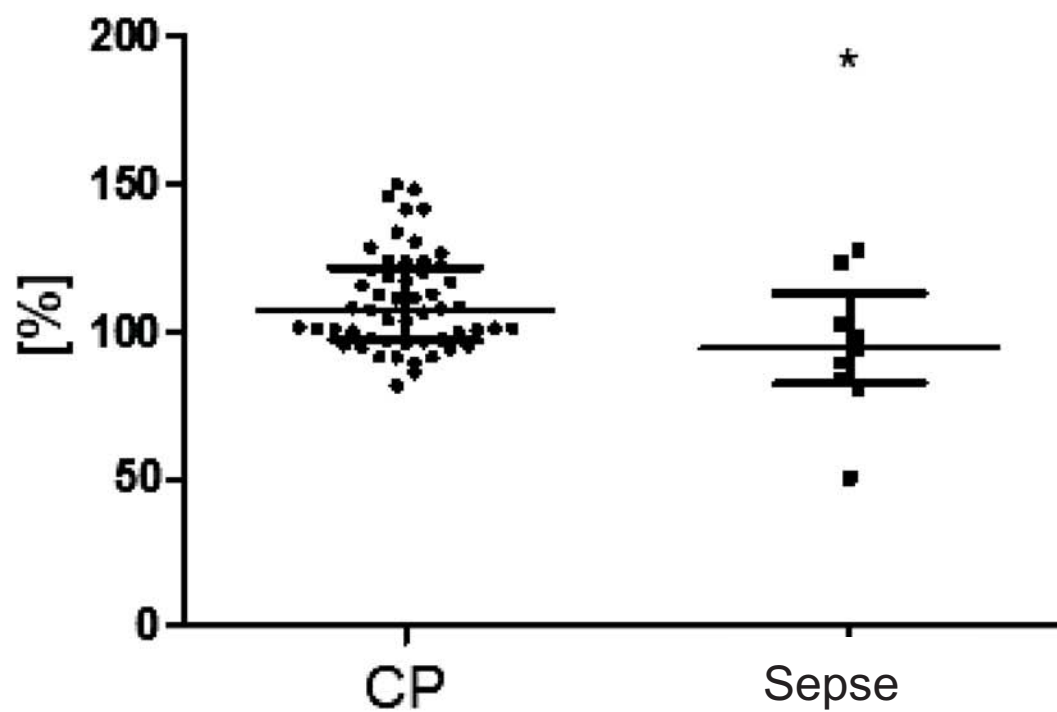


Fig. 15

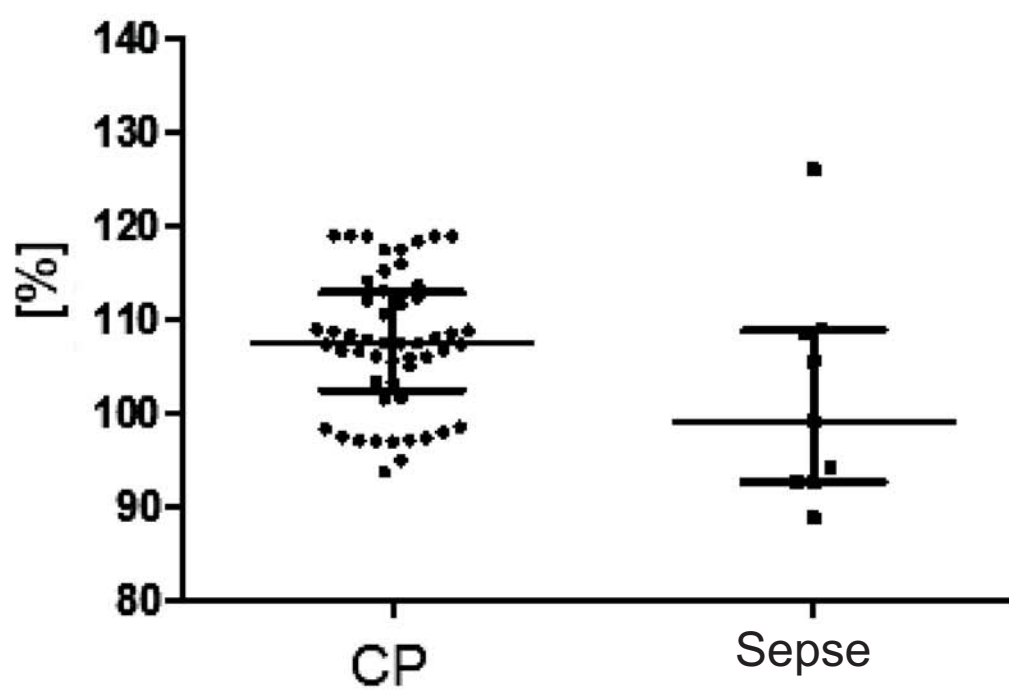


Fig. 16

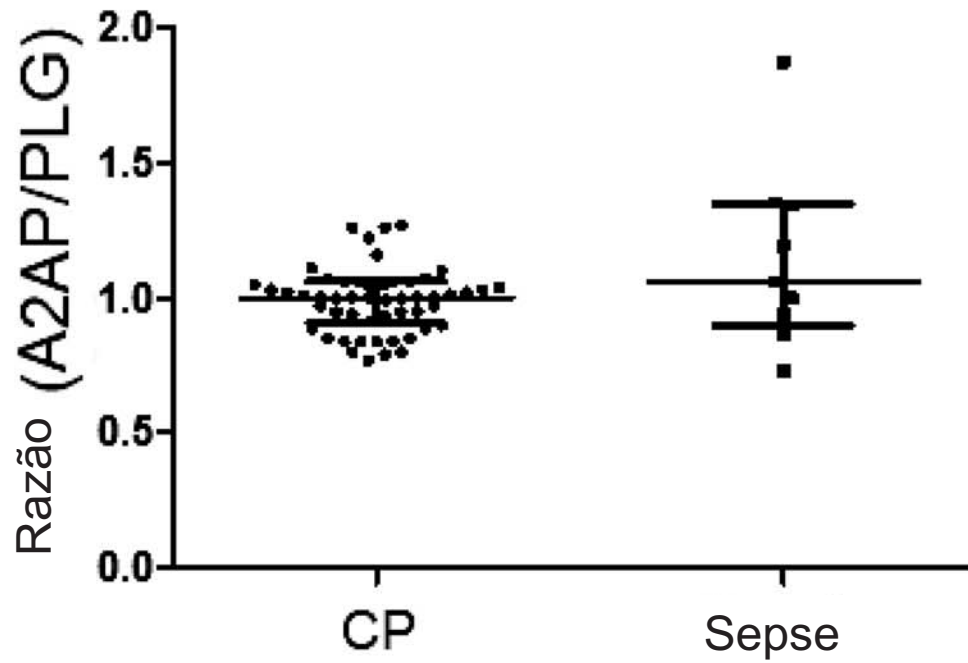
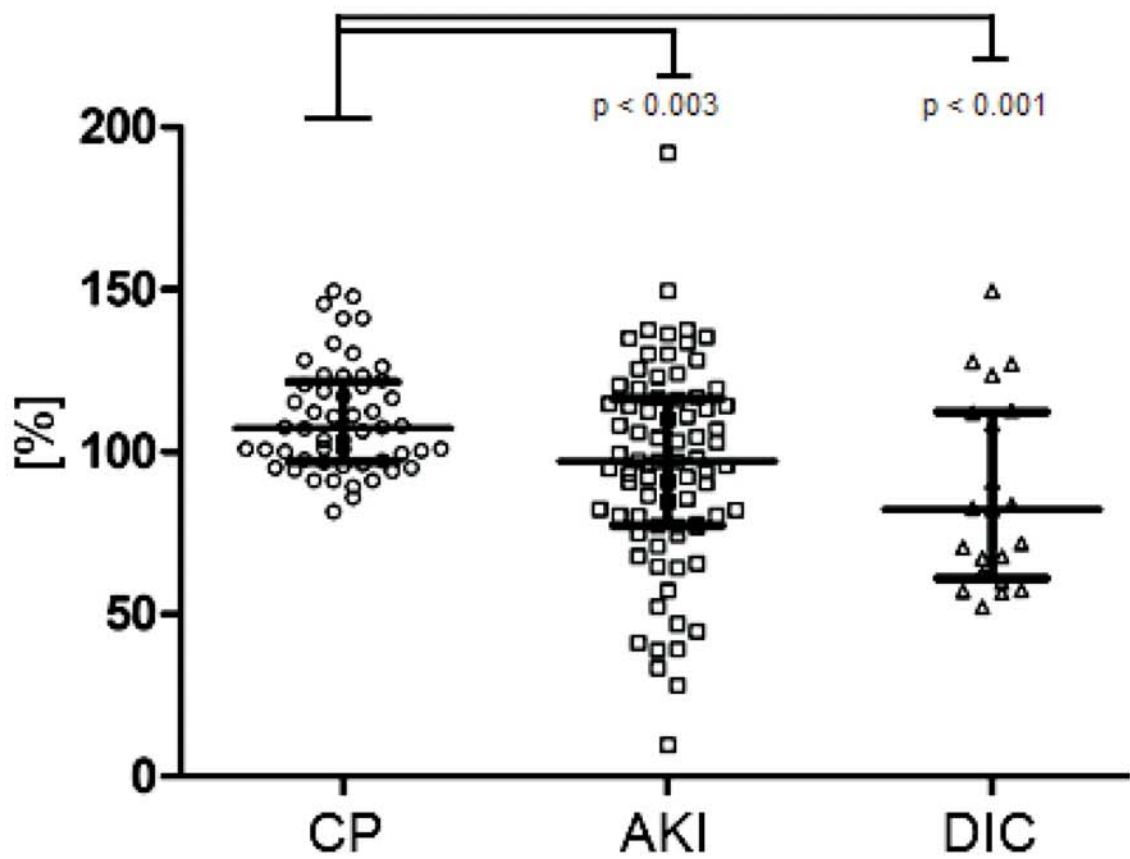


Fig. 17



RESUMO

Patente de Invenção: **“PLASMINOGÊNIO PARA TRATAMENTO E PREVENÇÃO DE MICROTROMBOSE”**.

A presente invenção refere-se a plasminogênio para uso em um método de prevenção ou tratamento de um evento trombótico em um paciente, em que o paciente corre o risco de desenvolver ou sofre de microtrombos.