



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 001**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02797695 .0**

(86) Fecha de presentación : **06.09.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1427440**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

(54) Título: **Uso de plasminógeno para promover la cicatrización de la perforación de la membrana del tímpano.**

(30) Prioridad: **06.09.2001 US 317643 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

(73) Titular/es: **Omnio Healer AB.**
Villavägen 1
903 36 Umeå, SE

(72) Inventor/es: **Ny, Tor;**
Li, Jinan;
Hellstrom, Sten y
Eriksson, Per-Olof

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 279 001 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de plasminógeno para promover la cicatrización de la perforación de la membrana del tímpano.

5 Esta solicitud reivindica la prioridad bajo 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud Provisional de Patente de EEUU N° 60/317.643, presentada el 6 de Septiembre de 2001.

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a procesos de cicatrización de heridas. En particular, la invención se refiere a la promoción de la cicatrización o cierre de heridas o membranas timpánicas perforadas, así como a la minimización de formación de cicatrices y eliminación de tejido necrótico.

Antecedentes

15 La cicatrización lenta o inadecuada de heridas compromete la calidad de vida de gran cantidad de personas. Un tipo particular de cicatrización de heridas en el que pueden presentarse problemas es la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica (tímpano). Aunque la mayoría de las perforaciones cicatrizarán espontáneamente y se cierran por proliferación de epitelio queratinizante escamoso que avanza delante de un tejido conectivo que crece hacia dentro, algunas perforaciones no cicatrizan, dando frecuentemente como resultado la pérdida de audición u otras complicaciones. Por qué algunas perforaciones cicatrizan, mientras que otras permanecen evidentes es aún una pregunta sin respuesta. Además, en Estados Unidos cada año más de 1,25 millones de personas sufren quemaduras y 6,5 millones tienen úlceras crónicas en la piel causadas por presión, éstasis venoso o diabetes melitus.

25 La cicatrización de heridas es un proceso dinámico de remodelación de tejidos que incluye la formación de una matriz rica en fibrina y fibronectina en el campo de la herida, la infiltración de neutrófilos y macrófagos, la proliferación de queratinocitos epidérmicos en los bordes de la herida y su migración a través de la matriz provisional, la formación de tejido granuloso que contiene vasos nuevos desarrollados y fibroblastos y células inflamatorias con capacidad para migrar y la contracción de la herida. Los estudios de cicatrización de heridas de la piel sugieren que las proteasas juegan papeles importantes en varias etapas. Está bien documentado el hecho de que la degradación de la matriz extracelular (ECM) que tiene lugar durante la cicatrización de la herida y otros procesos de remodelación de la ECM depende de la acción de una diversidad de enzimas proteolíticas secretadas por células inflamatorias, así como por elementos celulares del tejido estromal. Se cree que muchas proteinasas diferentes contribuyen con la remodelación de la matriz durante la cicatrización de una herida (Saksela y Rifkin, Annu. Rev. Cell Biol. 4, 93-126 (1988)). Sin embargo, los mecanismos precisos responsables de este proceso y cómo están regulados se comprenden pobremente.

El Sistema de Activación de Plasminógeno

40 El sistema de activación de plasminógeno es un sistema enzimático versátil, controlado temporalmente en el que el plasminógeno se activa a la enzima proteolítica plasmina por medio de cualquiera de los dos activadores fisiológicos de plasminógeno (PA), activador de plasminógeno de tipo tisular (tPA) y activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). La activación de este sistema se inicia por la liberación de tPA o uPA por parte de células específicas en respuesta a señales externas y lleva a una actividad proteolítica extracelular localmente expresada (Vassalli y col. J. Exp. Med. 159, 1653-1668 (1984); Saksela & Rifkin, 1988, *supra*). El sistema PA es también regulado por inhibidores específicos dirigidos contra PA y plasmina, incluyendo el inhibidor de PA de tipo 1 (PAI-1), el inhibidor de PA de tipo 2 (PAI-2), proteasa nexina 1 (PN-1) y α 2-antiplasmina (Saksela & Rifkin, 1988, *supra*; Ny y col., Thromb Res. 71 (1):1-45 (1993)). Todos estos inhibidores, que pertenecen a la familia de las serpinas, son inhibidores suicidas que son escindidos por proteasas relacionadas (Wilczynska y col., J Biol Chem. 270(50):29652-5 (1995); Wilczynska y col., Nat Struct Biol. 4(5):354-7 (1997)). La característica más importante del sistema PA es la amplificación que se logra por la conversión de plasminógeno que da como resultado la formación de plasmina.

55 Se ha descubierto que los PA están presentes en los bordes de las heridas, junto con varios tipos de metaloproteinasas de matriz (MMP), incluyendo collagenasa intersticial (MMP-1), estromelisina-1 (MMP-3), y las formas latentes de gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9). La expresión de PA y MMP es inducida por citoquinas y mediadores inflamatorios, lo que indica que ambos sistemas enzimáticos pueden actuar conjuntamente. Se sabe que las MMP se sintetizan como enzimas precursoras latentes que pueden activarse por proteólisis limitada, pero en gran parte es desconocido el mecanismo exacto por el cual tiene lugar esta activación *in vivo*. Uno de los factores propuestos para estar involucrado en la activación de algunas subclases de metaloproteinasas es la plasmina (Lijnen, Thromb Haemost 60 86(1):324-33 (2001)).

65 Varios informes han indicado que la expresión o activación de MMP, inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), PA e inhibidores de PA están alterados en los procesos de cicatrización de heridas, y también se ha indicado que la plasmina juega un papel en la cicatrización de heridas en la piel (Romer y col., Nat. Med. 2:287-292 (1996)). Más aún, las Patentes de EEUU N° 5.925.350 y 6.033.664 de Verheijen describen el uso de uPA o tPA para mejorar la cicatrización de heridas de cicatrización lenta o que no cicatrizan. En estos estudios, se notó que el mecanismo de mejora no estaba asociado con la actividad fibrinolítica o la eliminación del tejido necrótico. Se han propuesto también estrategias específicas para mejorar la cicatrización de la membrana timpánica, usando la aplicación tópica de altas

concentraciones de hialuronan (Laurent y col., Arch Otolaryngol Head Neck Surg 114:1435-1441 (1988)) o factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF; Fina y col., Laryngoscope 103(7):804-809 (1993)).

Aunque la comprensión de la cicatrización de heridas y los diversos mecanismos que la regulan está mejorando, y se han propuesto estrategias de tratamiento promisorias, la cicatrización lenta o la falta de cicatrización de perforaciones de membrana timpánica o de otras heridas continúa siendo un problema médico así como también social. Por lo tanto existe una necesidad en la técnica de procedimientos nuevos y mejorados para acelerar los procesos de cicatrización de heridas, tales como la cicatrización de las perforaciones de membrana timpánica, quemaduras y úlceras de la piel, eliminando cualquier tejido necrótico y minimizando la formación de cicatrices. Hay también una necesidad de procedimientos de selección nuevos para identificar y evaluar fármacos que puedan usarse en tales procedimientos de tratamiento. La invención aborda estas y otras necesidades en la técnica.

Resumen de la invención

La presente invención provee un procedimiento nuevo para mejorar la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica o minimizar la formación de cicatrices durante la cicatrización, por medio de la administración de plasminógeno.

Por consiguiente, la invención provee la reivindicación 1. De preferencia, el sujeto es un ser humano, y el plasminógeno es plasminógeno humano. La composición puede además comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, y puede estar en la forma de una solución acuosa, un gel, una loción, un bálsamo, un polvo, una pasta, un vendaje, un apósito para heridas, u otro vehículo de administración adecuado. El plasminógeno se ha de administrar por vía tópica. En el caso de administración tópica, la composición administrada puede comprender desde aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg de plasminógeno, de preferencia desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 5 mg de plasminógeno. La composición puede promover la cicatrización acelerando la cicatrización de la perforación, reduciendo el tejido necrótico y reduciendo la formación de tejido de cicatrización en el área de la herida. En una forma de realización, se repite la administración de plasminógeno al menos una vez, de preferencia al menos una vez cada día.

Las características anteriores y muchas otras ventajas de la invención se entenderán mejor por referencia a la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos que la acompañan.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A y 1B. Progresión en el tiempo de (A) reacción inflamatoria en la cavidad del oído medio y (B) contracción de la perforación, tras la perforación de la membrana timpánica en ratas de tipo salvaje. Se administraron cincuenta μ l de solución de plasminógeno (50 μ g (1 mg/ml) - ■ -; ó 0,5 mg (10 mg/ml) - ▲ -) o control (PBS, - ▼ -) tras la perforación, y a partir de entonces cada 24 horas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la cicatrización de membranas timpánicas perforadas.

La invención está basada, en parte, en el descubrimiento de que en ausencia de plasminógeno, el proceso de cicatrización de heridas no progresa adecuadamente, demostrando que el plasminógeno juega un rol principal en la cicatrización de heridas, particularmente en el caso de perforaciones de la membrana timpánica (ver Ejemplos y Tabla 1). Como se muestra en los Ejemplos, la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica fue anormal y se vio drásticamente alterada en los casos de ratones sin plasminógeno en comparación con controles de tipo salvaje y otros modelos transgénicos (ver Tabla 1). En ratones sin plasminógeno, las perforaciones de la membrana timpánica no cicatrizaron adecuadamente durante el período de la prueba de 144 días durante el que se controló la cicatrización, dando como resultado una membrana timpánica anormal. Se descubrió también que los ratones deficientes en plasminógeno revirtieron hacia un proceso de cicatrización normal tras la inyección de plasminógeno humano (ver Ejemplos 2 y 5), y las ratas de tipo salvaje mostraron una mejor cicatrización de la membrana timpánica tras la administración de plasminógeno (Ejemplo 6). Además, los experimentos mostraron que uPA, pero no tPA, puede también jugar un papel en la cicatrización de heridas normales, ya que aparentemente no es necesario uPA para la eliminación de los depósitos de fibrina (Ejemplos 3 y 4). Sin embargo, en ningún modelo animal la falta de cicatrización normal fue más evidente que en los ratones deficientes en plasminógeno, lo que indica que el plasminógeno juega un papel más esencial y probablemente diferente que el uPA durante la cicatrización de heridas. Sin estar ligados a ninguna teoría específica, los presentes hallazgos avalan que la incapacidad de una cicatrización adecuada puede ser causada por un defecto en la respuesta inflamatoria, en la migración de queratinocitos, o en los acontecimientos de remodelación de la matriz durante el proceso de cicatrización.

Como demuestran los resultados de la Tabla 1, uPA, tPA y plasminógeno juegan papeles diferentes en el proceso de cicatrización de heridas, con el plasminógeno jugando un papel central. Además, como se muestra en los Ejemplos, la eliminación de tejido necrótico y fibrina son dependientes de manera crítica de la presencia o administración de plasminógeno/plasmina más que de tPA o uPA.

TABLA 1

Comparación del Tiempo de Cicatrización y Apariencia del Tejido de la Membrana Timpánica Cicatrizado en Ratones de Tipo Salvaje, Deficientes en uPA, Deficientes en tPA y Deficientes en Plasminógeno				
Genotipos	Día de Cicatrización	Patrón de Cicatrización	Necrosis	Depósito de Fibrina
Tipo salvaje	8,7 ± 2,4	Cicatrización normal	No	No
tPA ^{-/-}	9,0 ± 2,4	Cicatrización aparentemente normal	No	No
uPA ^{-/-}	11,0 ± 1,7 (7/8 ratones cicatrizaron en el día 11)	El área de cicatrización contiene superficie rugosa y depósitos tisulares similares a un adoquinado	No	Puntos de depósitos de fibrina en el área cicatrizada.
Plg ^{-/-}	- (0/8 ratones cicatrizaron en el día 144)	Membrana timpánica cubierta por tejido blanquecino, y es gruesa y no es transparente	La necrosis se hace evidente desde el día 16 en adelante	Extensos depósitos de fibrina que cubren completamente la superficie de la membrana timpánica

Por consiguiente, podría usarse plasminógeno en el tratamiento de enfermedades en las que se ve afectada la cicatrización de heridas, así como en estrategias para acelerar la cicatrización de la membrana timpánica y de heridas, en el tratamiento de afecciones o enfermedades que afectan la cicatrización de tejidos epidérmicos dañados, en procedimientos para reducir la formación de cicatrices o acumulación o formación de tejido necrótico, así como en procedimientos para la selección de fármacos para usar en tratamientos. La administración de plasminógeno puede también minimizar la formación de cicatrices o la acumulación de tejido necrótico en las membranas timpánicas u otros tejidos epidérmicos durante la cicatrización de heridas. Por ejemplo, puede aplicarse plasminógeno conjuntamente con cirugía plástica para reducir la formación de cicatrices residuales, depósitos de fibrina o tejido necrótico o prevenir la aparición de los mismos. También, puede aplicarse plasminógeno en úlceras o quemaduras para mejorar la cicatrización.

Además, la invención podría usarse para mejorar la cicatrización de heridas en condiciones de deficiencia local o sistémica de plasminógeno, o para mejorar la cicatrización de heridas de cicatrización lenta o que no cicatrizan. Notablemente, como se muestra en el Ejemplo 5, la restauración del plasminógeno semanas tras el daño puede disminuir la matriz extracelular acumulada y reiniciar la cicatrización normal, mostrando de esta manera que el plasminógeno puede aplicarse para el tratamiento de heridas crónicas tales como ulceraciones y llagas.

Como alternativa, podría usarse plasmina por sí misma en el tratamiento de enfermedades en las que está afectada la cicatrización de heridas, así como en estrategias para acelerar la cicatrización de la membrana timpánica y de heridas, en el tratamiento de afecciones o enfermedades que afectan la cicatrización de tejidos epidérmicos dañados, o en procedimientos para reducir la formación de cicatrices o acumulación o formación de tejido necrótico. La administración de plasmina puede también minimizar la formación de cicatrices o la acumulación de tejido necrótico.

co en las membranas timpánicas u otros tejidos epidérmicos durante la cicatrización de heridas. Por ejemplo, puede aplicarse plasmina conjuntamente con cirugía plástica para reducir la formación de cicatrices residuales, depósitos de fibrina o tejido necrótico o prevenir la aparición de los mismos. También puede aplicarse plasmina en úlceras, llagas o quemaduras para mejorar la cicatrización.

Las composiciones mencionadas en este documento pueden administrarse por vía tópica, por inyección o por infusión intravenosa. De preferencia, aunque no necesariamente, la administración es local, es decir, próxima a la herida. Cuando se administra plasminógeno o plasmina por inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular), se prepara de manera ventajosa como una solución del material en un líquido farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo solución salina isotónica. El plasminógeno o plasmina pueden administrarse localmente para obtener una concentración elevada, por ejemplo, al menos 200 $\mu\text{g/ml}$ de plasminógeno o al menos 20 $\mu\text{g/ml}$ de plasmina, en el área de la perforación o la herida. Para administración tópica, la composición de plasminógeno o plasmina puede, por ejemplo, ser parte de un gel, loción, bálsamo, pasta, pulverización, polvo, vendaje o apósito de herida. Para acelerar la cicatrización de una perforación de membrana timpánica, la composición se administra de preferencia a través del canal auditivo externo, por ejemplo mediante una pulverización administrada hacia el área de la perforación, o agregando gota a gota una solución de plasminógeno o plasmina. Los dispositivos para administrar composiciones por pulverización son conocidos en la técnica y están descritos en, por ejemplo la Patente de EEUU N° 6.027.712. Las estrategias tales como la administración de plasminógeno/plasmina por pulverización, así como mediante gel o pasta, o una solución administrada por vía tópica, pueden usarse también para tratar heridas en la cavidad oral. Para acelerar la cicatrización de heridas, el plasminógeno o la plasmina pueden estar presentes en un apósito para heridas aplicado en la herida, desde el que se transfiere hacia el área de la herida.

Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva generalmente tienen su significado habitual en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos se discuten a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proveer otra guía al médico describiendo las composiciones y procedimientos de la invención y cómo prepararlas y usarlas.

“Membrana timpánica” y “tímpano” se usan indistintamente en este documento.

Una “perforación en la membrana timpánica” es una abertura en la membrana timpánica usualmente causada por un trauma. Existen al menos cuatro categorías generales: daños por compresión (los más comunes y usualmente el resultado de un golpe en la oreja); daños por instrumentos (los segundos más comunes, usualmente inadvertidos, causados frecuentemente por hisopos de algodón o horquillas para el cabello); daños por quemaduras (frecuentemente observados en la industria, de metales calientes de máquinas o de soldaduras); y daños por explosiones (observados usualmente durante guerras o bombardeos). La infección puede causar demoras en la cicatrización de la membrana timpánica, y la perforación persistente es usualmente una manifestación de tubotimpanitis, una inflamación de la trompa de Eustaquio y de la cavidad timpánica (oído medio).

Una “herida” es una ruptura o discontinuidad en la estructura de un órgano o tejido, incluyendo el epitelio, tejido conectivo y tejido muscular, causada por un agente externo. Los ejemplos de heridas incluyen, pero no se limitan a, heridas de la piel, magulladuras, ulceraciones, llagas, rasguños, desgarros, cortes, pinchazos, heridas soriáticas, perforaciones de la membrana timpánica y quemaduras. Un tipo particular de heridas son aquellas que son consecuencia de procedimientos de cirugía plástica.

“Tópica” y “aplicación tópica” se refieren a la administración no sistémica, local de un ingrediente activo. Por ello, aplicación tópica puede referirse a la aplicación de un ingrediente activo a la superficie externa de una herida.

“Plasminógeno” incluye en este documento al plasminógeno de mamíferos que se presenta de manera endógena, plasminógeno alélico, derivados de plasminógeno con función conservada, fragmentos de plasminógeno funcionalmente activos y homólogos de plasminógeno de mamíferos. Opcionalmente, una composición de plasminógeno puede contener más de un tipo, derivado u homólogo de plasminógeno. De preferencia, el tipo de plasminógeno para usar en una composición para administrar a un sujeto es endógeno de la especie del sujeto. Un compuesto de preferencia es el plasminógeno purificado de una fuente biológica, por ejemplo, plasminógeno humano producido de manera recombinante, o plasminógeno humano purificado, que está disponible, por ejemplo en Blopool AB (Umea, Suecia). Un plasminógeno humano de preferencia tiene la secuencia de aminoácidos de GenBank N° de Acceso PLHU (GI:625234) (SEQ ID N° 1).

“Plasmina” incluye en este documento a la plasmina de mamífero que se presenta de manera endógena, plasmina alélica, derivados de plasmina con función conservada, fragmentos de plasmina funcionalmente activos y homólogos de plasmina de mamíferos. Opcionalmente, una composición de plasmina puede contener más de un tipo, derivado u homólogo de plasmina. De preferencia, el tipo de plasmina para usar en una composición para administrar a un sujeto es endógeno de la especie del sujeto. Un compuesto de preferencia es la plasmina purificada de una fuente biológica, por ejemplo, plasmina humana producida de manera recombinante, o plasmina humana purificada.

“Variantes con función conservada” son proteínas en las que se ha cambiado un resto aminoácido dado sin alterar la conformación total y función de la proteína, incluyendo, pero no limitado a, reemplazo de un aminoácido con otro que

tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, acidez, alcalinidad, hidrofobicidad, y similares). En la técnica se conocen bien los aminoácidos con propiedades similares. Por ejemplo, arginina, histidina y lisina son aminoácidos básicos hidrófilos y pueden intercambiarse. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede reemplazarse con leucina, metionina o valina. Los aminoácidos diferentes de aquellos indicados como conservados pueden 5 diferir en una proteína o enzima de manera que el porcentaje de similitud de proteína o de secuencia de aminoácidos entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo desde 70% hasta 99% como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento tal como el Procedimiento Cluster, en el que la similitud está basada en el algoritmo MEGALIGN. Una “variante de función conservada” incluye también un polipéptido o 10 enzima que tiene al menos 60% de identidad de aminoácidos como se determina por los algoritmos BLAST o FASTA, de preferencia al menos 75%, de más preferencia al menos 85%, de más preferencia aún al menos 90%, y todavía de más preferencia 95%, y que tiene las mismas propiedades o funciones o sustancialmente similares que la proteína o enzima nativa o de origen con la que se compara.

Un “sujeto” incluye en este documento a seres humanos y a animales no humanos. Los animales no humanos 15 incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, cobayas, hámsteres, etc.; los animales domésticos tales como perros y gatos; y animales de granja tales como ovejas, cabras, cerdos, caballos y vacas. Un animal no humano de la presente invención puede ser un animal mamífero o no mamífero; un vertebrado o un invertebrado.

20 “Tratamiento” de un sujeto, o “tratar” en un sujeto una enfermedad o afección significa en este documento reducir o aliviar los síntomas clínicos de la enfermedad o afección tales como la cicatrización alterada o lenta de heridas.

25 “Promover”, “mejorar”, o “aumentar” la cicatrización de la membrana timpánica o de las heridas significa generalmente incrementar la velocidad en la que la herida o perforación cicatriza o reducir la extensión de la cicatriz residual o tejido necrótico durante o tras la cicatrización de la herida o perforación.

Un “control”, “valor de control” o “valor de referencia” en un ensayo es un valor usado para detectar una alteración en, por ejemplo la cicatrización de una membrana timpánica perforada o una herida en la piel, o cualquier otro 30 ensayo descrito en este documento. Por ejemplo, cuando se estudia la cicatrización de la perforación de la membrana timpánica, el efecto inhibitorio/estimulador de un agente puede evaluarse comparando la cicatrización de una herida o perforación con la de un control. El control o referencia puede ser, por ejemplo un valor de referencia predeterminado, o puede determinarse experimentalmente. Por ejemplo, en tal ensayo, un control o referencia puede ser la cicatrización de una herida o perforación similar en un animal sin exposición al fármaco o agente activo, o un animal tratado con el 35 mismo fármaco o agente activo que no tiene alterada la capacidad de cicatrizar la herida.

Una “cantidad eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad que aumenta las concentraciones local y/o sistémica de plasminógeno, y/o mejora la cicatrización de heridas. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un agente activo puede ser una cantidad que da como resultado un nivel local (en la perforación, herida o área de 40 cicatriz) o un nivel sistémico de plasminógeno que excede 200 $\mu\text{g/ml}$. Como alternativa, una cantidad eficaz de un agente es una cantidad que da como resultado una cicatrización más rápida de una perforación o herida que en ausencia del agente, o una cicatriz o formación de tejido necrótico reducida comparada con la que se produce en ausencia del agente. Una cantidad eficaz podría también significar una cantidad o dosis suficiente para aumentar los niveles local y/o sistémico de plasminógeno, por ejemplo, a aproximadamente el 10%, preferiblemente por aproximadamente 45 50 por ciento, y de más preferencia por aproximadamente 100 por ciento, del nivel hallado previo a la administración del agente activo o fármaco. Como alternativa, una cantidad eficaz de plasminógeno es una cantidad que corresponde a aproximadamente desde 5 μg hasta aproximadamente 50 mg, de preferencia aproximadamente desde 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg, y de más preferencia aún, desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 50 5 mg de plasminógeno por centímetro cuadrado en el área de la herida. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede aliviar o presentar una respuesta clínicamente significativa en un sujeto, por ejemplo promoviendo la cicatrización de la perforación de la membrana timpánica o herida, o reduciendo la formación de cicatriz. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para mejorar una afección por cicatrización de heridas o afección por la formación de cicatrices clínicamente significativa en el huésped.

55 Como se usa en este documento, “aproximadamente” significará dentro del 50%, de preferencia dentro del 20%, de más preferencia dentro del 5%, de un valor o intervalo dado.

Un valor que es “sustancialmente diferente” de otro valor puede significar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los dos valores. Puede usarse cualquier procedimiento estadístico adecuado conocido en la técnica 60 para evaluar si las diferencias son significativas o no. Una diferencia “estadísticamente significativa” significa que se determinó una significancia en un intervalo de confianza de al menos 90%, de más preferencia en un intervalo de confianza de 95%.

De acuerdo con la presente invención, pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología 65 y de ADN recombinante, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican ampliamente en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Sambrook y col. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Glover (DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II, 1985); Hames y Higgins (Nucleic Acid Hybridization, 1985); Hames y Higgins (Transcription And Translation, 1984); Freshney (Animal Cell Culture, 1986);

Perbal (A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984); y Ausubel y col. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

Las abreviaturas usadas en la presente descripción incluyen las siguientes:

uPA = activador de plasminógeno de tipo uroquinasa;

PA = activador de plasminógeno;

MMP = metaloproteinasa de matriz;

TIMP = inhibidor tisular de metaloproteinasa;

tPA = activador de plasminógeno de tipo tisular;

Plg = plasminógeno;

ECM = matriz extracelular.

Mejora de la Cicatrización de Heridas

De acuerdo con la invención, se mejora la cicatrización de heridas proveyendo o aumentando los niveles de plasminógeno.

En una forma de realización de preferencia, se usa una preparación sustancialmente pura de plasminógeno humano. Puede adquirirse plasminógeno en forma purificada, o producirse purificando el componente de seres humanos u otros animales, o por medio de producción recombinante en células huésped, incluyendo células huésped procariotas tales como *S. cerevisiae* o *E. coli*, y de más preferencia, células huésped de mamífero tales como células CHO. El plasminógeno puede ser humano de tipo salvaje, un homólogo o uno modificado/mutado de mamífero. En particular, pueden usarse fragmentos del componente que retienen al menos una parte de la actividad deseada del componente de extensión total.

Aplicaciones

La invención puede usarse para acelerar la cicatrización de una membrana timpánica u otra herida en animales, incluyendo pero no limitado a, vertebrados tales como seres humanos y animales domésticos, incluyendo perros, gatos y caballos. Además, puede usarse plasminógeno en esta aplicación clínica para reducir la formación de tejido de cicatrices y tejido necrótico en el área de la herida, y para mejorar la eliminación de los desechos tisulares.

En una forma de realización, la invención se aplica para potenciar la cicatrización de una membrana timpánica perforada en un sujeto humano. El sujeto humano o no humano puede o no sufrir una afección que afecta o hace más lenta la cicatrización de la perforación de la membrana timpánica.

Dado que la invención no sólo aumenta la tasa de cicatrización de heridas, sino que también mejora la calidad de las heridas, es decir, reduce la aparición de cicatrices y la aparición de tejido necrótico, puede administrarse plasminógeno a cualquier paciente para reducir la formación de cicatrices. El sujeto puede ser un ser humano que va a someterse, está siendo sometido, o ha sido sometido, a cirugía plástica o a la aplicación de un sustituto de la piel. En tal caso, puede aplicarse o administrarse una composición que comprende plasminógeno previamente y/o tras la cirugía.

Además, la administración de plasminógeno puede reiniciar un patrón de cicatrización de heridas normal, en situaciones en las que está afectada la cicatrización de heridas. Sin estar ligados a una teoría en particular, además de la fibrinólisis, los niveles de plasminógeno elevados pueden llevar a niveles aumentados de plasmina, que puede iniciar un proceso de cicatrización de heridas a través de la activación de vías de citoquinas.

Composiciones y Tratamientos

En este documento se describen composiciones de plasminógeno, que, cuando se administran en una cantidad eficaz, dan como resultado un nivel aumentado de plasminógeno en el área de la herida de un sujeto y por lo tanto una mejor cicatrización de una perforación de membrana timpánica u otra herida.

Por ejemplo, para acelerar la cicatrización de la membrana timpánica, puede aplicarse una composición que comprende desde aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 50 mg, de preferencia desde aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg, y de más preferencia aún desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 5 mg de plasminógeno, incluyendo un homólogo o derivado de plasminógeno, al área que rodea la perforación de la membrana timpánica. Como alternativa, pueden aplicarse aproximadamente 10-50 µl de una solución de plasminógeno de 1 mg/ml, o la cantidad correspondiente administrada en otra formulación adecuada. Para acelerar la cicatrización de heridas en general, puede aplicarse una composición de plasminógeno de manera tal que la cantidad de plasminógeno

por centímetro cuadrado (cm²) del área de la herida comprenda desde aproximadamente 5 µg hasta aproximadamente 50 mg, de preferencia desde aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg, y de más preferencia aún desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 5 mg de plasminógeno, incluyendo un homólogo o derivado de plasminógeno.

Como alternativa, se administra plasminógeno de tal manera que se alcanza una concentración localmente elevada de plasminógeno en la perforación de membrana timpánica o área de la herida del sujeto, por ejemplo, un paciente humano. En una forma de realización de preferencia, la administración de una cantidad eficaz del agente activo da como resultado una concentración de plasminógeno de al menos aproximadamente 200 µg/ml en la perforación o en el área de la herida. En otra forma de realización de preferencia, la administración de una cantidad eficaz del agente activo da como resultado una concentración de plasminógeno de al menos aproximadamente 200 µg/ml en la perforación o área de la herida. En otra forma más de realización de preferencia, la concentración de plasminógeno resultante de la administración de una cantidad eficaz de un agente activo es desde aproximadamente 2 µg/ml hasta aproximadamente 2 mg/ml, de más preferencia al menos 200 µg/ml. La concentración de plasminógeno en plasma humano es de aproximadamente 200 microgramos por ml.

El plasminógeno puede formularse en composiciones farmacéuticas para administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*, por ejemplo, por administración tópica, inyección o infusión. Por forma biológicamente compatible para administración *in vivo* se entiende una forma de la sustancia para ser administrada en la que cualquier efecto tóxico es compensado por los efectos terapéuticos. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para alcanzar los resultados deseados. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una sustancia puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, sexo, y peso del individuo. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse más de una dosis dividida diariamente o puede reducirse la dosis proporcionalmente como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

Si se desea, pueden aplicarse también otros ingredientes activos conjuntamente con el tratamiento con plasminógeno o plasmina de una perforación o herida. Tales ingredientes activos incluyen, pero no se limitan a, PA de mamífero tales como tPA humano o uPA humano, o PA bacterianos tal como estreptoquinasa.

La sustancia activa puede administrarse de una manera conveniente tal como por inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), inhalación, pulverización, por aplicación tópica o transdérmica, o por administración rectal. Dependiendo de la ruta de administración, la sustancia activa puede estar recubierta en un material para proteger al compuesto de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivarlo. Por lo tanto, las rutas adecuadas de administración incluyen la administración tópica, intravenosa, intramuscular, intradérmica, rectal e intravaginal. Una vía de administración de preferencia es la administración tópica. En el caso de perforaciones de la membrana timpánica, puede administrarse el agente activo a través del canal auditivo externo. Los vasos que soportan la membrana timpánica terminan en el borde de la membrana. En consecuencia, la sangre y los componentes de la sangre tales como el oxígeno, nutrientes y plasminógeno sólo alcanzan la membrana timpánica por difusión.

Las composiciones descritas en este documento pueden prepararse por medio de procedimientos bien conocidos *per se* para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, de manera tal que se combina una cantidad eficaz de la sustancia activa en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, Pa., EEUU 1985). Sobre esta base, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias o compuestos en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y están contenidas en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isosmóticas con los fluidos fisiológicos.

Los ejemplos de vehículos que pueden usarse para administrar el plasminógeno u otra composición de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, formas de dosificación inyectables, infusiones, geles, pastas, bálsamos, ceras, lociones, cremas para piel, y otros diversos formatos para administración tópica conocidos en la técnica. Las composiciones pueden también administrarse localmente en la forma de un polvo o solución pulverizada en el área de la herida. Como alternativa, la composición de la invención puede estar presente en apósitos para heridas, parches, vendajes, gasas, u otros medios aplicados a las heridas, desde los que se transfieren a la superficie de la herida. Tales dispositivos también incluyen dispositivos de liberación lenta, que liberan continuamente plasminógeno u otros componentes durante un período de tiempo prolongado. Con respecto a la cicatrización de las membranas timpánicas, la administración de la composición usando una aplicación por medio de gel, pulverizador o gota a gota a través del canal auditivo externo, es una forma de realización de preferencia. Las formas de dosificación inyectables o infusiones comprenden una solución de plasminógeno o plasmina en un líquido farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, solución salina isotónica, agua estéril o sistemas de tampones acuosos.

Una vez preparadas las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un envase adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Para la administración de una composición de la invención, tal etiquetado debería incluir cantidad, frecuencia y procedimiento de administración.

La administración de plasminógeno puede repetirse al menos una vez. Por ejemplo, podría administrarse plasminógeno en intervalos regulares, por ejemplo, al menos aproximadamente una vez cada dos días, aproximadamente una vez al día, o aproximadamente dos veces al día, o agregarse en vendajes de heridas o dispositivos de liberación lenta que se cambian adecuadamente.

Ejemplos

La invención está además descrita por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo ilustrativos de la invención, y no limitan de ninguna manera el alcance y significado de la invención. De hecho, tras leer esta memoria descriptiva resultarán evidentes para los expertos en la técnica muchas modificaciones y variaciones de la invención, y pueden realizarse sin escapar de su espíritu y alcance.

Ejemplo 1

Cicatrización de Membranas Timpánicas Afectadas en Ratones de Tipo Salvaje y Deficientes en Plasminógeno

Este Ejemplo muestra que los ratones deficientes en plasminógeno tienen una cicatrización más lenta y anormal en comparación con los hermanos de control de tipo salvaje. Los estudios a corto plazo entre ratones deficientes en plasminógeno y ratones control de tipo salvaje mostraron que ya a partir de 6 horas tras la realización de la perforación, los ratones deficientes en plasminógeno tuvieron una respuesta inflamatoria mucho mayor indicando que el plasminógeno funciona tan temprano como la etapa de inflamación de la cicatrización de la herida.

Procedimientos

Se genotiparon ratones macho adultos, deficientes en el gen de plasminógeno y ratones hermanos de tipo salvaje (C57BL/6J, 8-12 semanas de edad) por medio de un ensayo de actividad cromogénico, que determina el nivel de plasminógeno en el plasma de los ratones (Ny y col., Endocrinology. 140(11):5030-5 (1999)) y se confirmó con PCR. Se anestesió a los ratones y se les perforó la membrana timpánica bajo un otomicroscopio con una lanceta de miringotomía. La perforación ocupó el cuadrante superior posterior de la membrana timpánica.

Genotipado de los animales con PCR. Se aisló ADN genómico de las puntas de las colas de los ratones y se genotiparon por PCR. Las secuencias de los pares de cebadores usados en la reacción de PCR fueron los siguientes:

neo:	5' ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC G 3'	(SEQ ID N° 2)
	5' TTC GTC CAG ATC ATC CTG ATC GAC 3'	(SEQ ID N° 3)
plg:	5' TCA GCA GGG CAA TGT CAC GG 3'	(SEQ ID N° 4)
	5' CTC TCT GTC TGC CTT CCA TGG 3'	(SEQ ID N° 5)

“Neo” significa neomicina, que es el marcador de resistencia usado para el desarrollo de los ratones deficientes en el gen. Se agrega el gen de neo al genoma como un “proyector” para inactivar el gen. Por lo tanto una célula deficiente en el gen carece del gen intacto pero tiene el gen de neo insertado en su lugar.

Se realizó la PCR mediante el procedimiento convencional. Brevemente, se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 93°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 45 segundos, finalmente seguida por una elongación durante 5 minutos a 72°C.

Genotipado de los animales con ensayo cromogénico. Para ensayar el nivel de plasminógeno en plasma de ratón, se agregó uroquinasa (ukidan) y se determinó la cantidad de plasmina formada. Comparando la cantidad de plasmina generada entre las diferentes muestras de plasma pudo determinarse el genotipo de un ratón. Brevemente, se recogió sangre de la punta de la cola del ratón en presencia de ácido cítrico 0,04 M. Se preparó el plasma centrifugando durante 10 minutos a 3000 rpm y se almacenó a -20°C hasta la realización del experimento. Se incubó el plasma de ratón, diluido 1000 veces, con uroquinasa 65 nM, lisina 10 mM y sustrato cromogénico S-2251 80 µM en PBS a 37°C en una placa (de 96 pocillos) con un volumen total de 200 µl/pocillo. El sustrato S-2251 se colorea cuando es escindido por una proteinasa. Se prepararon también blancos individuales de muestra, para compensar los diferentes colores de las muestras de plasma, y fueron idénticos a la muestra con la excepción de que se excluyó la uroquinasa. Se midió la absorbancia a 405 nm cada 30 minutos durante 2 horas con un lector de placas de microtitulación. Se calculó el aumento promedio de absorbancia durante el tiempo para cada ratón. Pudieron distinguirse los tres diferentes genotipos en tres diferentes niveles de aumento promedio de absorbancia durante el tiempo, alto (plg+/+), medio (plg+/-) y bajo (plg-/-).

Evaluación clínica de la cicatrización de la herida y preparaciones histológicas. Se evaluó la apariencia de la cicatrización de las heridas bajo un otomicroscopio a los 4, 8, 36, 72 y 144 días tras la perforación, respectivamente. En cada uno de los tiempos, se decapitaron ratones, se limpiaron sus ampollas timpánicas retirando el tejido blando, se abrieron y pusieron en glutaraldehído 2% en tampón cacodilato durante la noche. Se diseccionaron las membranas

5 timpánicas, incluyendo la parte tensa y la parte flácida, se aclararon y fijaron posteriormente en tetraóxido de osmio. Tras deshidratación en acetona, se incluyeron las muestras en una resina epoxi. Se seccionaron las membranas timpánicas incluidas en plástico en cortes paralelos al mango del martillo a través del cuadrante perforado. Se examinaron las secciones de 0,5 micrómetros teñidas con azul de toluidina en el microscopio óptico. También se cortaron secciones ultrafinas, con espesor de 700 nm, y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo para el posterior estudio mediante microscopía electrónica.

Resultados

10 La cicatrización de la membrana timpánica se vio afectada en los ratones deficientes en plasminógeno, como reveló el examen histológico y morfológico (ver Tabla 2). La Tabla 2 muestra los resultados de la evaluación mediante el otomicroscopio de la apariencia de la membrana timpánica, como una función del tiempo tras la perforación. El número de membranas timpánicas claramente cerradas se da en relación al número total examinado. El análisis morfológico reveló que el ratón de tipo salvaje cicatrizó perfectamente, sin embargo, todas las perforaciones en ratones deficientes en plasminógeno tuvieron un patrón de cicatrización totalmente interrumpido en comparación con el tipo salvaje.

TABLA 2

20 La cicatrización de la membrana timpánica está afectada permanentemente en ratones deficientes en plasminógeno. La tabla muestra la fracción de membranas timpánicas claramente cubiertas en cada grupo en cada momento.

25	Tiempo tras la perforación (días):	4	8	11	36	72	144
	Ratones deficientes en	2/24	6/14	0/6	1/6	8/30	0/12
	plasminógeno:						
30	Ratones de tipo salvaje:	0/18	10/14	10/10	10/10	24/24	12/12

35 Además, se evaluaron los datos de cicatrización de ratones heterocigotas para el gen de plasminógeno. Estos ratones tienen 50% de la concentración de plasminógeno en sus fluidos corporales y se vio que tienen una cicatrización retardada en comparación con los ratones de tipo salvaje. Esto muestra que el proceso de cicatrización es dependiente de la dosis y por ello que la administración de plasminógeno a los ratones de tipo salvaje y a seres humanos podría acelerar el proceso de cicatrización.

40 Ejemplo 2

Cicatrización de la Membrana Timpánica en Ratones Deficientes en Plasminógeno Reconstituidos con Plasminógeno

45 Este Ejemplo demuestra que por medio de la reconstitución del plasminógeno por administración sistémica en ratones deficientes en plasminógeno, se convirtió el fenotipo completamente en el de cicatrización normal de las heridas.

Procedimientos

50 Este experimento se realizó de manera similar al Ejemplo 1, excepto por la administración de plasminógeno a un grupo de animales.

55 Reconstitución del plasminógeno en ratones deficientes en plasminógeno. Se reconstituyó plasminógeno humano en ratones deficientes en plasminógeno por medio de repetidas inyecciones intravenosas de 1,5 mg de plasminógeno en 100 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). La primera dosis se administró 12 horas previo a la perforación de la membrana timpánica. De allí en adelante, se administró plasminógeno cada 24 horas a lo largo de toda la duración del experimento.

Resultados

60 La reconstitución del plasminógeno en ratones deficientes en plasminógeno por inyección i.v. restauró la cicatrización normal de heridas en los ratones deficientes en plasminógeno. La Tabla 3 muestra los resultados de la evaluación por medio del otomicroscopio de la apariencia de las membranas timpánicas tras la cicatrización. El número de membranas timpánicas cicatrizadas se da en relación con el número total examinado.

65

TABLA 3

Cicatrización de la Membrana Timpánica en Ratones Deficientes en Plg Tras la Administración de Plg

La tabla muestra la fracción de membranas timpánicas cicatrizadas en cada grupo en cada momento.

Tiempo tras la perforación (días):	4	8	11
Ratones Plg ^{-/-} :	0/3	0/3	0/3
Ratones de tipo salvaje:	0/3	2/3	3/3
Plg ^{-/-} inyectados con Plg:	0/3	2/3	3/3

Por consiguiente, en ratones deficientes en plasminógeno la cicatrización de la herida en la membrana timpánica es anormal, mientras que la cicatrización de la membrana timpánica está restaurada en los ratones deficientes en plasminógeno tras la administración de plasminógeno. Además, tras 144 días, ninguno de los ratones deficientes en plasminógeno cicatrizó normalmente la membrana timpánica, el patrón de cicatrización fue completamente aberrante ya que la membrana timpánica se volvió gruesa y opaca, con tejido similar a un adoquinado blanquecino cubriendo la superficie de la herida. El análisis morfológico reveló que el tejido que llenó el área de la herida tenía estructura similar a fibrina, lo que indica que la migración celular se vio dificultada. Desde el Día 16 y a partir de ese momento resultó evidente la necrosis.

Ejemplo 3

Cicatrización de Perforaciones de la Membrana Timpánica en Ratones Deficientes en tPA

Se perforó la membrana timpánica (MT) de ratones deficientes en tPA (tPA^{-/-}) y de ratones de tipo salvaje en el día 0, y se siguió el patrón de cicatrización bajo otomicroscopio, como se describió anteriormente. Los resultados se describen en la Tabla 4. Los ratones deficientes en tPA retrocruzados 6 veces con C57B1/6 de origen se cruzaron una vez con DBA1/J originales. Las camadas heterocigotas se usaron para cría. Los descendientes de tipo salvaje (tPA^{+/+}) y el homocigoto (tPA^{-/-}) de estas crías se usaron en los experimentos de cicatrización de heridas.

TABLA 4

Cicatrización de Membranas Timpánicas en Ratones Deficientes en tPA

La tabla muestra la fracción de membranas timpánicas cicatrizadas en cada grupo en cada momento.

Tiempo tras la perforación (días):	4	6	8	12
Ratones tPA ^{+/+} :	0/20	5/14	9/14	6/6
Ratones tPA ^{-/-} :	0/24	4/16	10/16	8/8

El patrón de cicatrización de la perforación de MT en ratones tPA^{-/-} fue idéntico al de los ratones control de tipo salvaje, y la calidad del tejido de MT cicatrizado en los ratones tPA^{-/-} y en los controles de tipo salvaje tenían apariencia idéntica, por el hecho de que no se observó tejido “similar a adoquinado” ni depósitos de fibrina en la superficie de la herida. En consecuencia, no se observaron diferencias significativas cuantitativas ni cualitativas en la cicatrización de membrana timpánica en ratones deficientes en tPA comparados con los de tipo salvaje, indicando por lo tanto que el tPA juega un papel menor, si alguno, en la cicatrización de la membrana timpánica.

Ejemplo 4

Cicatrización de Perforaciones de Membrana Timpánica en Ratones Deficientes en uPA

Se perforó la membrana timpánica en ratones de tipo salvaje y en ratones deficientes en uPA (uPA^{-/-}) en el día 0, y se controló el patrón de cicatrización por otomicroscopía como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 5. Los ratones deficientes en uPA retrocruzados 6 veces con C57B1/6 originales se cruzaron una vez con DBA1/J originales. Las camadas heterocigotas se usaron para cría. Los descendientes de tipo salvaje (uPA^{+/+}) y homocigota (uPA^{-/-}) de estas crías se usaron en los experimentos de cicatrización de heridas.

TABLA 5

Cicatrización de Membranas Timpánicas en Ratones Deficientes en uPA

La tabla muestra la fracción de membranas timpánicas cicatrizadas en cada grupo en cada momento.

Tiempo tras la perforación (días):	4	8	16	30
Ratones de tipo salvaje:	0/12	5/8	8/8	6/6
Ratones uPA ^{-/-}	0/16	5/12	7/8	3/4

Este experimento mostró que la cicatrización de la perforación de la membrana timpánica en ratones deficientes en uPA fue demorada de alguna manera en comparación con los controles de tipo salvaje, y pudo observarse tejido similar al adoquinado, blanquecino, con depósitos de fibrina en la superficie perforada tras la cicatrización. Estos datos sugieren que uPA puede jugar un papel en el proceso de cicatrización de la membrana timpánica o heridas, afectando potencialmente la depuración de depósitos de fibrina, aunque en un grado menor que el plasminógeno.

Ejemplo 5

Administración "Tardía" de Plasminógeno

Este ejemplo muestra que un proceso afectado de cicatrización puede restaurarse mediante la administración de plasminógeno varias semanas tras la perforación de la membrana timpánica.

Procedimientos. Se prepararon ratones deficientes en plasminógeno (plg^{-/-}) como se describió anteriormente. Se perforaron las membranas timpánicas en el Día 0. En el Día 36 y a partir de allí durante 7 días, se inyectó un grupo de ratones plg^{-/-} diariamente con 1,5 mg de plasminógeno humano en 150 μ l de solución.

Resultados. Pudo detectarse por otomicroscopía una reducción de la matriz extracelular acumulada anormalmente debido a la administración de plasminógeno. Específicamente, en el ratón deficiente en plasminógeno que recibió administraciones diarias de plasminógeno humano, comenzó una reacción inflamatoria que dio como resultado una exudación del material acumulado desde la superficie de la membrana timpánica dentro de los 2 días posteriores a la primera administración. Durante el período de 7 días de inyecciones, estos ratones mostraron una gran disminución del espesor de la matriz extracelular anormalmente acumulada (principalmente constituida por fibrina y tejido necrótico). Tras este período inicial de 7 días, el patrón de cicatrización de algunas membranas timpánicas se asemejó a la cicatrización normal. Estos resultados indican que el plasminógeno es esencial para la depuración de fibrina y la eliminación del tejido necrótico.

En un experimento similar de restauración de plasminógeno, ratones deficientes en plasminógeno recibieron plasminógeno durante los días 0-3, días 4-7 o días 8-11 tras la perforación. Este experimento mostró que el plasminógeno fue importante durante todas las etapas de cicatrización de la herida: la etapa inflamatoria, la etapa de formación de tejidos y la etapa de remodelación tisular.

Ejemplo 6

Aplicación Tópica de Plasminógeno en Membranas Timpánicas Perforadas en Ratas de Tipo Salvaje

Este ejemplo muestra que la cicatrización de perforaciones de membranas timpánicas es mejorada en ratas de tipo salvaje por la aplicación local de plasminógeno.

Procedimientos. Se perforaron diez membranas timpánicas por grupo de estudio de animales. Se aplicaron cincuenta μ l de PBS (control) o plasminógeno humano en una concentración de 1 mg/ml o 10 mg/ml directamente en la perforación de la membrana timpánica. El agregado de plasminógeno o control se repitió cada 24 horas, y se controló la reacción inflamatoria y el patrón de cicatrización en diferentes momentos. Específicamente, se siguió la acumulación de fluido inflamatorio en la cavidad del oído medio en el área del ático, y se hicieron seguimientos de la contracción de las perforaciones de MT durante las primeras 108 horas tras las perforaciones.

Resultados. Se siguió el tiempo medio de cicatrización en cada grupo y se muestra en la Tabla 6 a continuación. La tabla muestra el período de tiempo promedio para cicatrizar una perforación de la membrana timpánica para cada grupo.

TABLA 6

Mejora de la Cicatrización de Perforaciones en Membrana Timpánica en Ratas de Tipo Salvaje por la Administración de Plasminógeno

Grupo:	Control (PBS)	1 mg/ml Plg	10 mg/ml Plg
Tiempo para cicatrizar (días):	8,1 ± 0,5	7,4 ± 0,6	6,8 ± 0,5

Las ratas que recibieron 10 mg/ml de plasminógeno tuvieron la reacción inflamatoria más fuerte en el área del ático del oído medio, mientras que las ratas que recibieron 1 mg/ml de plasminógeno exhibieron una reacción inflamatoria casi similar a la de los controles. La cicatrización de las membranas timpánicas más rápida se observó en el grupo con 10 mg/ml, aunque ambos grupos que recibieron plasminógeno mostraron una contracción mejorada de la perforación durante las primeras 108 horas en comparación con los controles.

Ejemplo 7

Caracterización del Remodelado Tisular y Acontecimientos de Migración Celular en Ratones Deficientes en Plasminógeno

Con el fin de caracterizar la remodelación de tejidos y los acontecimientos de migración celular anormales en los ratones deficientes en plasminógeno (plg^{-/-}), se realizaron inmunotinciones en serie de queratina, fibrina y neutrófilos en membranas timpánicas cicatrizando/cicatrizadas de ratones de tipo salvaje y de ratones plg^{-/-} en los días 4, 8, 16, 36, 72 y 144 tras la perforación. El anticuerpo reactivo para neutrófilos fue de Cedarlane (Canada), el anticuerpo antiqueratina fue de ICN Pharmaceuticals, Inc., y el anticuerpo reactivo para fibrinógeno/fibrina fue de Nordic Immunology.

Resultados. En el Día 36 y en adelante tras la perforación, los ratones deficientes en plasminógeno tuvieron una composición de matriz extracelular anormal en comparación con los ratones de tipo salvaje. En los ratones deficientes en plasminógeno, las perforaciones contenían cantidades aumentadas de fibrina en vez de queratina, mientras que la queratina se "mantuvo" en el borde de la perforación. Bajo el otomicroscopio, estos depósitos de fibrina se ven como costras de tejido "similar al adoquinado", blanquecino. También se infiltraron grandes cantidades de neutrófilos en el área de la herida. Además, el tejido necrótico resultó evidente en todos los ratones deficientes en plasminógeno en el día 16 después de la perforación y de allí en adelante. Los ratones de tipo salvaje exhibieron una superficie de herida cicatrizada idéntica a la de los controles de tipo salvaje normales.

Estos datos sugieren que el plasminógeno, ya sea directamente o a través de la formación de plasmina, es importante para prevenir o reducir los depósitos de fibrina, promover la formación de la capa de queratina, así como para eliminar el tejido necrótico.

La presente invención no estará limitada en enfoque por las formas de realización específicas descritas en este documento. De hecho, los expertos en la técnica encontrarán evidentes diversas modificaciones de la invención además de las descritas en este documento en la anterior descripción y en las figuras que la acompañan. Se prevé que tales modificaciones caigan dentro del enfoque de las reivindicaciones.

Se entenderá además que los valores son aproximados, y se proveen para descripción.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un plasminógeno para preparar una composición farmacéutica tópica para promover la cicatrización de una perforación de membrana timpánica en un mamífero.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición se selecciona del grupo constituido por una solución acuosa, un polvo o una pulverización.
- 10 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano, y el plasminógeno es plasminógeno humano.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición comprende desde aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg de plasminógeno.
- 20 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la composición comprende desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 5 mg de plasminógeno.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la promoción de la cicatrización se selecciona de acelerar la cicatrización de la perforación, reducir el tejido necrótico, y reducir la formación de tejido cicatrizal.

25

30

35

40

45

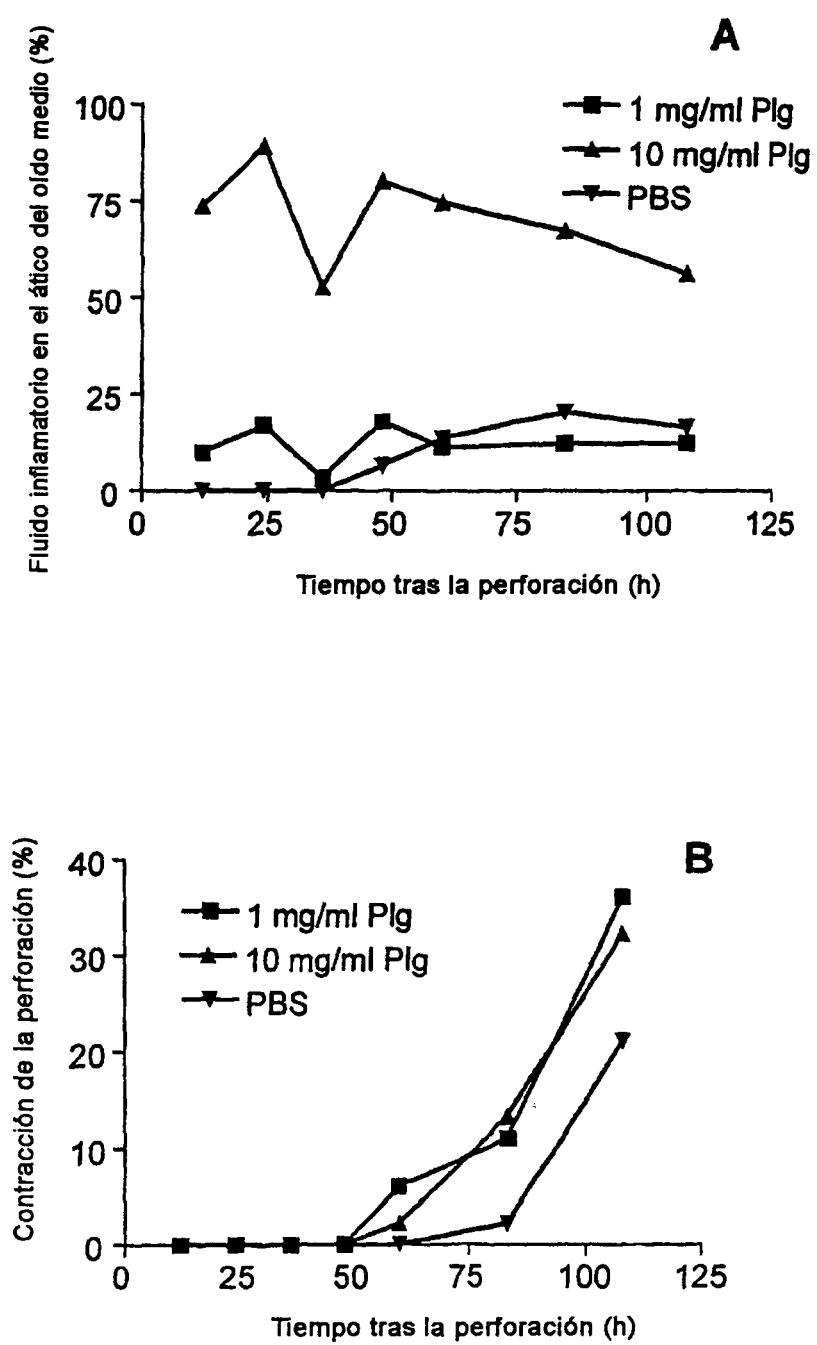
50

55

60

65

FIGURA 1



ES 2 279 001 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> NY, Tor
 LI, Jlnan
 5 HELLSTROM, Sten
 ERIKSSON, Per-Olof
 <120> PROCEDIMIENTO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS
 <130> 3810/2J759-WO0
 <150> EEUU 60/317.643
 <151> 06-09-2001
 <160> 5
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 810
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*
 <300>
 <308> GenBank / 625234
 30 <309> 15-09-2000
 <313> (1)...(810)
 <400> 1
 35
 Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 40 Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30
 Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu
 35 40 45
 Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
 50 55 60
 50 Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
 65 70 75 80
 55 Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
 60 100 105 110
 Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125
 65 Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
 130 135 140

ES 2 279 001 T3

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
 145 150 155 160
 5
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175
 10
 Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190
 15
 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205
 20
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 25
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
 225 230 235 240
 30
 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 245 250 255
 35
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 40
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 275 280 285
 45
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 290 295 300
 50
 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320
 55
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
 325 330 335
 60
 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 340 345 350
 65
 Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365
 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400

ES 2 279 001 T3

	Trp	Ser	Ser	Met	Thr	Pro	His	Arg	His	Gln	Lys	Thr	Pro	Glu	Asn	Tyr	
					405					410					415		
5	Pro	Asn	Ala	Gly	Leu	Thr	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Ala	Asp	
				420					425					430			
10	Lys	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	
			435					440					445				
15	Cys	Asn	Leu	Lys	Lys	Cys	Ser	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ala	Pro	
		450					455						460				
20	Pro	Pro	Val	Val	Leu	Leu	Pro	Asn	Val	Glu	Thr	Pro	Ser	Glu	Glu	Asp	
	465					470					475					480	
25	Cys	Met	Phe	Gly	Asn	Gly	Lys	Gly	Tyr	Arg	Gly	Lys	Arg	Ala	Thr	Thr	
					485					490					495		
30	Val	Thr	Gly	Thr	Pro	Cys	Gln	Asp	Trp	Ala	Ala	Gln	Glu	Pro	His	Arg	
				500					505					510			
35	His	Ser	Ile	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Asn	Pro	Arg	Ala	Gly	Leu	Glu	Lys	
			515					520					525				
40	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	
		530					535					540					
45	Thr	Thr	Asn	Pro	Arg	Lys	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	Val	Pro	Gln	Cys	
	545					550					555					560	
50	Ala	Ala	Pro	Ser	Phe	Asp	Cys	Gly	Lys	Pro	Gln	Val	Glu	Pro	Lys	Lys	
					565					570					575		
55	Cys	Pro	Gly	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Cys	Val	Ala	His	Pro	His	Ser	Trp	
				580					585					590			
60	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Phe	Gly	Met	His	Phe	Cys	Gly	
			595					600					605				
65	Gly	Thr	Leu	Ile	Ser	Pro	Glu	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Leu	
		610					615					620					
70	Glu	Lys	Ser	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	His	
	625					630					635					640	
75	Gln	Glu	Val	Asn	Leu	Glu	Pro	His	Val	Gln	Glu	Ile	Glu	Val	Ser	Arg	
				645						650					655		

ES 2 279 001 T3

5 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 660 665 670
 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 675 680 685
 10 Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 690 695 700
 15 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 705 710 715 720
 20 Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
 725 730 735
 25 Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 740 745 750
 Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
 755 760 765
 30 Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
 770 775 780
 35 Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
 785 790 795 800
 40 Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 805 810

<210> 2

45 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 2

55

atgattgaac aagatggatt gcacg

25

<210> 3

60 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Cebador de PCR

ES 2 279 001 T3

<400> 3		
	ttcgtccaga tcatacctgat cgac	24
5	<210> 4 <211> 20 <212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
15	<400> 20	
	tcagcagggc aatgtcacgg	20
20	<210> 5 <211> 21 <212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador de PCR	
30	<400> 21	
	ctctctgtct gccttccatg g	21
35		
40		
45		
50		
55		
60		
65		