

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 294**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016 PCT/CN2016/110449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17101867**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 16874924 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2024 EP 3395353**

54 Título: **Plasminógeno para su uso en el tratamiento o prevención de lesiones nerviosas por diabetes mellitus**

30 Prioridad:
18.12.2015 WO PCT/CN2015/097943

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2024

73 Titular/es:
**TALENGEN INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)
Rm 2B, B1k 10 La Serence Discovery Bay
Hongkong, CN**

72 Inventor/es:
LI, JINAN

74 Agente/Representante:
IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 982 294 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

Plasminógeno para su uso en el tratamiento o prevención de lesiones nerviosas por diabetes mellitus

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a los efectos del plasminógeno en la reparación de lesiones del tejido nervioso y la prevención y/o el tratamiento de trastornos relacionados con lesiones nerviosas diabéticas.

10 **Antecedentes de la técnica**

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que provoca trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas debido a una insuficiencia relativa o absoluta de insulina en el organismo, a una sensibilidad disminuida de la de las células diana a la insulina o a defectos estructurales de la propia insulina^[1]. El coste anual del tratamiento de la diabetes mellitus en los Estados Unidos es de 176.000 millones de dólares, y las pérdidas indirectas provocadas por la diabetes mellitus ascienden también a 69.000 millones de dólares^[2]. La neuropatía diabética es una enfermedad relacionada con los trastornos metabólicos del organismo caracterizada por la hiperglucemia diabética que afecta al sistema nervioso, y también es una de las complicaciones crónicas más comunes de la diabetes mellitus^[3]. Entre el 60% y el 75% de los diabéticos acaban desarrollando una neuropatía diabética^[4]. La neuropatía diabética es el factor más importante en la amputación no traumática de miembros inferiores. La neuropatía diabética incluye principalmente la neuropatía diabética central y la neuropatía diabética periférica (DNP), especialmente es más frecuente esta última. La neuropatía diabética central se refiere a las lesiones provocadas por daños en las neuronas y las fibras nerviosas del cerebro, el cerebelo y el tronco encefálico, y en las neuronas de la médula espinal en el contexto de la diabetes mellitus. La neuropatía diabética periférica se refiere a la presencia de síntomas y/o signos asociados a la disfunción neurológica periférica en diabéticos, excluyendo otras causas, que se producen principalmente por daño o infección de los nervios sensoriales periféricos.

El dolor es uno de los principales síntomas de la neuropatía diabética y está provocado principalmente por la lesión nerviosa diabética. Como se ha mencionado anteriormente, el dolor neuropático diabético se divide correspondientemente en dolor neuropático central diabético y dolor neuropático periférico diabético. Este último es más frecuente y afecta gravemente a la calidad de vida de los pacientes, en particular, perjudica el sueño y reduce el disfrute de la vida. Los síntomas de dolor crónico a largo plazo alteran los aspectos mentales, emocionales y otros aspectos de los pacientes, y reducen su capacidad para vivir y socializar al mismo tiempo.

Para la neuropatía diabética, la patogénesis específica del dolor en las distintas etapas aún no se comprende completamente. En la actualidad, los fármacos usados clínicamente para el tratamiento del dolor neuropático diabético incluyen principalmente las siguientes categorías: (1) fármacos antiepilépticos, como gabapentina y pregabalina; (2) analgésicos opioides como tramadol, morfina y oxicodona; (3) anestésicos locales, como lidocaína; (4) antidepresivos, como amitriptilina, paroxetina y venlafaxina; y (5) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), como naproxeno y nambumetona. Sin embargo, los fármacos tradicionales siguen teniendo muchos defectos. Por ejemplo, la gabapentina y otros fármacos antiepilépticos tienen una alta incidencia de efectos secundarios y reacciones adversas y son caros; los opioides y los fármacos antiinflamatorios no esteroideos tienen una eficacia limitada o insuficiente sobre los dolores neuropáticos periféricos y centrales; la paroxetina, la venlafaxina y otros antidepresivos son propensos a provocar el síndrome serotoninérgico central y tienen muchos tabúes de medicación; y demás. Por lo tanto, aunque en los últimos años se han producido algunos avances en el desarrollo de fármacos para aliviar el dolor neuropático diabético, sigue habiendo una necesidad urgente de un fármaco eficaz para reparar las lesiones nerviosas diabéticas y prevenir los trastornos relacionados con lesiones nerviosas diabéticas.

La plasmina es un componente clave del sistema de activación del plasminógeno (sistema PA). Es una proteasa de amplio espectro capaz de hidrolizar varios componentes de la matriz extracelular (ECM), incluyendo la fibrina, la gelatina, la fibronectina, la laminina y el proteoglicano^[5]. Además, la plasmina puede activar algunas prometaloproteinasas (pro-MMPs) para formar metaloproteinasas activas (MMPs). Por lo tanto, se considera que la plasmina es un importante regulador ascendente de la proteólisis extracelular^[6,7]. La plasmina se forma por la proteólisis del plasminógeno por dos PA fisiológicos: el activador tisular del plasminógeno (tPA) o el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Debido al nivel relativamente alto de plasminógeno en plasma y otros fluidos corporales, tradicionalmente se cree que la regulación del sistema PA se consigue principalmente a través de los niveles de síntesis y actividad de PA. La síntesis de los componentes del sistema PA está estrictamente regulada por diferentes factores, como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas. Además, también hay inhibidores fisiológicos específicos de la plasmina y los PA. El principal inhibidor de la plasmina es la α 2-antiplasmina. Hay receptores de superficie celular específicos de uPA (uPARs) que tienen actividad hidrolítica directa en ciertas superficies celulares^[8,9].

El plasminógeno (plg) es una glicoproteína de cadena sencilla compuesta por 791 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 92 kDa^[10,11]. El plasminógeno se sintetiza principalmente en el hígado y está abundantemente presente en el líquido extracelular. El contenido de plasminógeno en el plasma es de

aproximadamente 2 μ M. Por lo tanto, el plasminógeno es una enorme fuente potencial de actividad proteolítica en tejidos y fluidos corporales^[12,13]. El plasminógeno existe en dos formas moleculares: ácido glutámico-plasminógeno (Glu-plasminógeno) y lisina-plasminógeno (Lys-plasminógeno). Las formas de plasminógeno secretadas de manera natural y no escindidas tienen un ácido glutámico aminoterminal (N-terminal) y, por lo tanto, se denominan ácido glutámico-plasminógeno. Sin embargo, en presencia de plasmina, el ácido glutámico-plasminógeno se hidroliza a lisina-plasminógeno en Lys76-Lys77. En comparación con el ácido glutámico-plasminógeno, el lisina-plasminógeno tiene una mayor afinidad por la fibrina y puede ser activado por los AP a una velocidad mayor. El enlace peptídico Arg560-Val561 de estas dos formas de plasminógeno puede ser escindido por uPA o tPA, dando como resultado la formación de plasmina como una proteasa de cadena doble enlazada a disulfuro^[14]. La porción aminoterminal del plasminógeno contiene cinco anillos homotriméricos, es decir, los denominados kringles, y la porción carboxi-terminal contiene un dominio de proteasa. Algunos kringles contienen sitios de unión a lisina que median la interacción específica del plasminógeno con la fibrina y su inhibidor α 2-AP. Un fragmento de 38 kDa del plasminógeno recientemente descubierto, que comprende los kringles 1-4, es un potente inhibidor de la angiogénesis. Este fragmento se denomina angiostatina y puede producirse por proteólisis del plasminógeno por varias proteasas.

El principal sustrato de la plasmina es la fibrina, y la disolución de la fibrina es la clave para prevenir la trombosis patológica^[15]. La plasmina también tiene especificidad de sustrato para varios componentes de la ECM, incluyendo la laminina, la fibronectina, el proteoglicano y la gelatina, lo que indica que la plasmina también desempeña una función importante en la remodelación de ECM^[12,16,17]. Indirectamente, la plasmina también puede degradar otros componentes de la ECM mediante la conversión de ciertos precursores de proteasas en proteasas activas, entre las que se incluyen la MMP-1, la MMP-2, la MMP-3 y la MMP-9. Por lo tanto, se ha propuesto que la plasmina puede ser un importante regulador ascendente de la proteólisis extracelular^[18]. Además, la plasmina tiene la capacidad de activar ciertas formas potenciales de factores de crecimiento^[19-21]. In vitro, la plasmina también puede hidrolizar componentes del sistema del complemento y liberar fragmentos quimiotácticos del complemento.

El ratón db/db es uno de los modelos animales experimentales de diabetes mellitus más ampliamente usados. Es muy similar a los humanos en cuanto al proceso patogénico, la patogénesis, etc. de la neuralgia diabética. Por lo tanto, los ratones db/db se usan para estudios relacionados, y los resultados son representativos. Los ratones db/db se convierten en ratones diabéticos a las 4-6 semanas, presentan hiperalgesia a las 8-12 semanas e hipoalgesia después de 12 semanas.^[22-26]

A través de la investigación, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el plasminógeno tiene efectos significativos en la reparación del nervio y en el tratamiento de la lesión de nervios diabética y sus trastornos relacionados, y tiene buena seguridad. Por lo tanto, el plasminógeno puede ser una nueva estrategia para reparar la lesión del tejido nervioso diabético y tratar y/o prevenir sus trastornos relacionados. La invención se define en las reivindicaciones.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de plasminógeno para su uso en un método para reparar lesiones nerviosas diabéticas en un sujeto, en donde el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de plasminógeno para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas en un sujeto, en donde el trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas se selecciona entre dolor de extremidades, hipoestesia, entumecimiento, ardor, frialdad y dolor neuropático diabético provocado por lesión del sistema nervioso resultante de diabetes mellitus, en donde el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno.

En una realización, la lesión nerviosa diabética incluye lesión del tejido nervioso y neuroinflamación. En una realización, el trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas incluye dolor de extremidades, hipoestesia, entumecimiento, ardor, frialdad y dolor neuropático diabético, incluyendo, pero no limitado a, dolor espontáneo, hipoalgesia, hiperalgesia, etc. inducido por complicaciones diabéticas. En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno.

En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ -plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno se administra sistémica o localmente, por ejemplo, por vía tópica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, inhalatoria, intraespinal, inyección local, inyección intraarticular o administración rectal. En una realización, el plasminógeno puede administrarse en combinación con otros fármacos o terapias. En una realización, los otros fármacos o terapias incluyen fármacos neurotróficos, analgésicos, fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus, fármacos antiinfecciosos, fármacos antihipertensivos, fármacos antihiperlipidémicos y terapias físicas como

la terapia electromagnética y la terapia infrarroja.

En una realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente humano.

5 En una realización, el sujeto tiene un nivel bajo de plasmina o plasminógeno. Específicamente, el nivel bajo es innato, secundario y/o local.

10 En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es una proteína que tiene 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos añadidos, suprimidos y/o sustituidos en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ-plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno es una variante conservadoramente sustituida seleccionada entre las variantes de Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, δ-plasminógeno o micro-plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es un plasminógeno natural humano, como un ortólogo del plasminógeno mostrado en la SEQ ID N° 2, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de primates o roedores, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de gorilas, monos rhesus, murinos, vacas, caballos y perros. Lo más preferible, la secuencia de aminoácidos del plasminógeno de la presente invención es como se muestra en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12.

20 En una realización, el plasminógeno se administra en combinación con un portador o estabilizador polipeptídico adecuado. En una realización, el plasminógeno se administra a una dosificación de 0,0001-2000 mg/kg, 0,001-800 mg/kg, 0,01-600 mg/kg, 0,1-400 mg/kg, 1-200 mg/kg, 1-100 mg/kg o 10-100 mg/kg (por kg de peso corporal) o 0,0001-2000 mg/cm², 0,001-800 mg/cm², 0,01-600 mg/cm², 0,1-400 mg/cm², 1-200 mg/cm², 1-100 mg/cm² o 10-100 mg/cm² (por centímetro cuadrado de superficie de área corporal) diariamente, preferiblemente la dosificación se repite por lo menos una vez, preferiblemente la dosificación se administra por lo menos diariamente. En caso de administración local, las dosificaciones anteriores pueden ajustarse aún más en función de las circunstancias.

30 En una realización, la lesión nerviosa diabética incluye lesión del tejido nervioso y neuroinflamación. En una realización, el trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas incluye dolor de extremidades, hipoestesia, entumecimiento, ardor, frialdad y dolor neuropático diabético, incluyendo, pero no limitado a, dolor espontáneo, hipoalgesia e hiperalgesia inducida por complicaciones diabéticas. En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ-plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno se administra sistémica o localmente, por ejemplo, por vía tópica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, inhalatoria, intraespinal, inyección local, inyección intraarticular o administración rectal. En una realización, el plasminógeno puede administrarse en combinación con otros fármacos o terapias. En una realización, los otros fármacos o terapias incluyen fármacos neurotróficos, analgésicos, fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus, fármacos antiinfecciosos, fármacos antihipertensivos, fármacos antihiperlipidémicos y terapias físicas como la terapia electromagnética y la terapia infrarroja.

En una realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.

45 En una realización, el sujeto tiene un nivel bajo de plasmina o plasminógeno. Específicamente, el nivel bajo es innato, secundario y/o local.

50 En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es una proteína que tiene 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos añadidos, suprimidos y/o sustituidos en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ-plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno es una variante conservadoramente sustituida seleccionada entre las variantes de Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, δ-plasminógeno o micro-plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es un plasminógeno natural humano, como un ortólogo del plasminógeno mostrado en la SEQ ID N° 2, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de primates o roedores, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de gorilas, monos rhesus, murinos, vacas, caballos y perros. Lo más preferible, la secuencia de aminoácidos del plasminógeno de la presente invención es como se muestra en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12.

60 En una realización, el plasminógeno se administra en combinación con un portador o estabilizador polipeptídico adecuado. En una realización, el plasminógeno se administra a una dosificación de 0,0001-2000 mg/kg, 0,001-800 mg/kg, 0,01-600 mg/kg, 0,1-400 mg/kg, 1-200 mg/kg, 1-100 mg/kg o 10-100 mg/kg (por kg de peso corporal) o 0,0001-2000 mg/cm², 0,001-800 mg/cm², 0,01-600 mg/cm², 0,1-400 mg/cm², 1-200 mg/cm², 1-100 mg/cm² o 10-100 mg/cm² (por centímetro cuadrado de área de superficie corporal) diariamente, preferiblemente la dosificación se repite

por lo menos una vez, preferiblemente la dosis se administra por lo menos diariamente. En caso de administración local, las dosificaciones anteriores pueden ajustarse aún más dependiendo de las circunstancias.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende plasminógeno para su uso en la prevención y/o reparación de la lesión nerviosa diabética en un sujeto. En una realización, la lesión nerviosa diabética incluye lesión del tejido nervioso y neuroinflamación. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende plasminógeno para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas en un sujeto. En una realización, el trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas incluye dolor de extremidades, hipoestesia, entumecimiento, ardor, frialdad y dolor neuropático diabético, incluyendo, pero no limitado a, dolor espontáneo, hipoalgesia e hiperalgesia inducida por complicaciones diabéticas. En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ -plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno se administra sistémica o localmente, por ejemplo, por vía tópica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, inhalatoria, intraespinal, inyección local, inyección intraarticular o administración rectal. En una realización, el plasminógeno puede administrarse en combinación con otros fármacos o terapias. En una realización, los otros fármacos o terapias incluyen fármacos neurotróficos, analgésicos, fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus, fármacos antiinfecciosos, fármacos antihipertensivos, fármacos antihiperlipidémicos y terapias físicas como la terapia electromagnética y la terapia infrarroja.

En una realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.

25 En una realización, el sujeto tiene un nivel bajo de plasmina o plasminógeno. Específicamente, el nivel bajo es innato, secundario y/o local.

30 En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es una proteína que tiene 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos añadidos, suprimidos y/o sustituidos en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ -plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno es una variante conservadoramente sustituida seleccionada entre las variantes de Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, δ -plasminógeno o micro-plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es un plasminógeno natural humano, como un ortólogo del plasminógeno mostrado en la SEQ ID N° 2, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de primates o roedores, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de gorilas, monos rhesus, murinos, vacas, caballos y perros. Lo más preferible, la secuencia de aminoácidos del plasminógeno de la presente invención es como se muestra en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12.

40 En una realización, el plasminógeno se administra en combinación con un portador o estabilizador polipeptídico adecuado. En una realización, el plasminógeno se administra a una dosificación de 0,0001-2000 mg/kg, 0,001-800 mg/kg, 0,01-600 mg/kg, 0,1-400 mg/kg, 1-200 mg/kg, 1-100 mg/kg o 10-100 mg/kg (por kg de peso corporal) o 0,0001-2000 mg/cm², 0,001-800 mg/cm², 0,01-600 mg/cm², 0,1-400 mg/cm², 1-200 mg/cm², 1-100 mg/cm² o 10-100 mg/cm² (por centímetro cuadrado de área de superficie corporal) diariamente, preferiblemente la dosificación se repite por lo menos una vez, preferiblemente la dosificación se administra por lo menos diariamente. En caso de administración local, las dosificaciones anteriores pueden ajustarse aún más dependiendo de las circunstancias.

50 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un artículo de fabricación o un kit de una composición farmacéutica que comprende plasminógeno o plasmina y es útil en la prevención y/o reparación de la lesión nerviosa diabética en un sujeto. En una realización, la lesión nerviosa diabética incluye lesión del tejido nervioso y neuroinflamación. La presente divulgación también se refiere a un artículo de fabricación o un kit de una composición farmacéutica que comprende plasminógeno o plasmina y es útil en el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas en un sujeto. En una realización, el trastorno relacionado con lesiones nerviosas diabéticas incluye dolor de extremidades, hipoestesia, entumecimiento, ardor, frialdad y dolor neuropático diabético, incluyendo, pero no limitado a, dolor espontáneo, hipoalgesia e hiperalgesia inducida por complicaciones diabéticas. En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ -plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno se administra sistémica o localmente, por ejemplo, por vía tópica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, inhalatoria, intraespinal, inyección local, inyección intraarticular o administración rectal. En una realización, el plasminógeno puede administrarse en combinación con otros fármacos o terapias. En una realización, los otros fármacos o terapias incluyen fármacos neurotróficos, analgésicos, fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus, fármacos antiinfecciosos, fármacos antihipertensivos, fármacos antihiperlipidémicos y terapias físicas como terapia electromagnética y terapia infrarroja.

65

En una realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano.

En una realización, el sujeto tiene un nivel bajo de plasmina o plasminógeno. Específicamente, el nivel bajo es innato, secundario y/o local.

En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es una proteína que tiene 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos añadidos, suprimidos y/o sustituidos en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ -plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno es una variante conservadoramente sustituida seleccionada entre las variantes de Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, δ -plasminógeno o micro-plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es un plasminógeno natural humano, como un ortólogo del plasminógeno mostrado en la SEQ ID N° 2, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de primates o roedores, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de gorilas, monos rhesus, murinos, vacas, caballos y perros. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del plasminógeno de la presente invención es como se muestra en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12.

En una realización, el artículo de fabricación o kit comprende un recipiente que contiene una dosificación eficaz de plasminógeno. Preferiblemente, el artículo de fabricación o kit comprende además un recipiente que contiene uno o más fármacos. El kit también puede comprender instrucciones de uso, que indican que el plasminógeno puede usarse para tratar la lesión nerviosa provocada por la diabetes mellitus y los trastornos relacionados con lesiones nerviosas, y pueden indicar además que el plasminógeno puede administrarse antes, simultáneamente y/o después de la administración de otros fármacos o terapias.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de plasminógeno o plasmina en la fabricación de un medicamento, artículo de fabricación o kit para prevenir y/o tratar lesiones (daños) en los tejidos corporales y órganos internos provocados por la angiopatía diabética en un sujeto. Esta realización no es parte de la invención. En una realización, la lesión (daño) a tejidos y órganos internos incluye lesión (daño) al cerebro, corazón, hígado, pulmones, riñones, nervios, retina, piel y tracto gastrointestinal. En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de plasminógeno o plasmina en la fabricación de un medicamento, artículo de fabricación o kit para prevenir y/o tratar una complicación diabética en un sujeto. En una realización, la complicación diabética es encefalopatía diabética, cardiopatía diabética, hepatopatía diabética, nefropatía diabética, neumonopatía diabética, neuropatía diabética, angiopatía diabética, retinopatía diabética o dermatopatía diabética inducida por diabetes mellitus.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para fabricar un medicamento, que comprende la preparación de un medicamento, artículo de fabricación o kit para prevenir y/o tratar la lesión (daño) a los tejidos corporales y órganos internos provocada por la angiopatía diabética en un sujeto usando plasminógeno o plasmina y un portador farmacéuticamente aceptable. Esta realización no forma parte de las reivindicaciones. En una realización, la lesión (daño) a tejidos y órganos internos incluye lesión (daño) al cerebro, corazón, hígado, pulmones, riñones, nervios, retina, piel y tracto gastrointestinal. En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para fabricar un medicamento, que comprende preparar un medicamento, artículo de fabricación o kit para prevenir y/o tratar una complicación diabética en un sujeto usando plasminógeno o plasmina y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la complicación diabética es encefalopatía diabética, cardiopatía diabética, hepatopatía diabética, nefropatía diabética, neumonopatía diabética, neuropatía diabética, angiopatía diabética, retinopatía diabética o dermatopatía diabética inducida por diabetes mellitus.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a plasminógeno o plasmina, y una composición farmacéutica, artículo de fabricación o kit que comprende el plasminógeno o plasmina, que son útiles en la prevención y/o tratamiento de lesión (daño) a tejidos corporales y órganos internos provocada por angiopatía diabética en un sujeto. En una realización, la lesión (daño) a tejidos y órganos internos incluye lesión (daño) al cerebro, corazón, hígado, riñones, pulmones, nervios, retina, tracto gastrointestinal y piel. En un aspecto, la presente divulgación se refiere al plasminógeno, y a una composición farmacéutica, artículo de fabricación o kit que comprende el plasminógeno, que son útiles en la prevención y/o tratamiento de una complicación diabética en un sujeto. En una realización, la complicación diabética es encefalopatía diabética, cardiopatía diabética, hepatopatía diabética, neumonopatía diabética, nefropatía diabética, neuropatía diabética, angiopatía diabética, retinopatía diabética o dermatopatía diabética inducida por diabetes mellitus.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prevenir y/o tratar lesiones (daños) en tejidos corporales y órganos internos provocadas por angiopatía diabética en un sujeto, que comprende la administración de plasminógeno o plasmina o una composición farmacéutica, artículo de fabricación o kit que comprende el plasminógeno o plasmina al sujeto. Esta realización no forma parte de la invención. La presente divulgación también se refiere al uso de plasminógeno o plasmina, o una composición farmacéutica, artículo de fabricación o kit que comprende el plasminógeno o plasmina para prevenir y/o tratar lesiones (daños) en tejidos corporales y órganos internos provocadas por angiopatía diabética en un sujeto. En una realización, la lesión (daño)

a tejidos y órganos internos incluye lesión (daño) al cerebro, corazón, hígado, pulmones, riñones, nervios, retina, tracto gastrointestinal y piel. En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para prevenir y/o tratar una complicación diabética en un sujeto, que comprende administrar plasminógeno o plasmina, o una composición farmacéutica, artículo de fabricación o kit que comprende el plasminógeno o plasmina al sujeto. La presente divulgación también incluye el uso de plasminógeno o plasmina, o una composición farmacéutica, artículo de fabricación o kit que comprende el plasminógeno o plasmina para prevenir y/o tratar una complicación diabética en un sujeto. En una realización, la complicación diabética es encefalopatía diabética, cardiopatía diabética, hepatopatía diabética, neumonopatía diabética, nefropatía diabética, neuropatía diabética, angiopatía diabética, retinopatía diabética o dermatopatía diabética inducida por diabetes mellitus. Estas realizaciones no forman parte de la invención.

En una realización, el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es una proteína que tiene 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos añadidos, suprimidos y/o sustituidos en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno. En una realización, el plasminógeno se selecciona entre Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, micro-plasminógeno, δ-plasminógeno o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el plasminógeno es una variante conservadoramente sustituida seleccionada entre las variantes de Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, mini-plasminógeno, δ-plasminógeno o micro-plasminógeno. En una realización, el plasminógeno es un plasminógeno natural humano, como un ortólogo del plasminógeno mostrado en la SEQ ID N° 2, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de primates o roedores, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de gorilas, monos rhesus, murinos, vacas, caballos y perros. Lo más preferible, la secuencia de aminoácidos del plasminógeno de la presente invención es como se muestra en la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12.

En una realización, el sujeto tiene un nivel bajo de plasmina o plasminógeno. Específicamente, el nivel bajo es innato, secundario y/o local.

La presente invención abarca explícitamente todas las combinaciones de características técnicas pertenecientes a las realizaciones de la presente invención como se define en las reivindicaciones, y estas soluciones técnicas combinadas se han divulgado explícitamente en la presente, como si las soluciones técnicas anteriores se hubieran divulgado individual y explícitamente. Además, la presente invención también abarca explícitamente todas las subcombinaciones de las varias realizaciones y elementos de las mismas, y estas subcombinaciones se han divulgado en la presente, como si se hubiera divulgado cada una de dichas subcombinaciones individual y explícitamente en la presente.

Descripción detallada de las realizaciones

1. Definición

La "diabetes mellitus" es una serie de síndromes dismetabólicos de hidratos de carbono, proteínas, grasas, agua, electrolitos y similares que están provocados por la hipofunción de los islotes, la resistencia a la insulina y similares resultantes de los efectos de factores genéticos, disfunción inmunitaria, infecciones microbianas y toxinas de los mismos, toxinas de radicales libres, factores mentales y otros varios factores patógenos en el cuerpo, y se caracteriza principalmente por la hiperglucemia desde el punto de vista clínico.

Las "complicaciones diabéticas" son daños o disfunciones de otros órganos o tejidos del cuerpo provocados por un mal control de la glucosa en sangre durante la diabetes mellitus, incluyendo daños o disfunciones del hígado, los riñones, el corazón, la retina, daños en el sistema nervioso y similares. De acuerdo con las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, hay hasta más de 100 complicaciones diabéticas, y la diabetes mellitus es una enfermedad de la que actualmente se conocen más complicaciones.

La "microangiopatía diabética" se refiere a una microangiopatía provocada por varios grados de anomalías en la microcirculación de varios órganos o tejidos corporales de los diabéticos. El proceso de formación de la microangiopatía comprende, a grandes rasgos, cambios funcionales en la microcirculación, lesión endotelial, engrosamiento de la membrana basal, aumento de la viscosidad sanguínea, agregación de glóbulos rojos, y adhesión y agregación de plaquetas, lo que finalmente lleva a la microtrombosis y/o la oclusión microvascular.

La "microangiopatía diabética" mencionada anteriormente provoca lesiones vasculares locales en tejidos u órganos, flujo sanguíneo deficiente, hipoxia de las células y formación de coágulos sanguíneos, trombos e inflamación, y afecta además a las funciones de los tejidos y órganos periféricos, provocando de este modo "complicaciones diabéticas". Por lo tanto, cuando se mencionan en la presente divulgación, los términos "angiopatía diabética" y "complicaciones diabéticas" abarcan ambas los trombos inducidos por la diabetes mellitus.

La "neuropatía diabética" (o denominada "enfermedad nerviosa diabética") es una enfermedad que implica trastornos metabólicos del cuerpo caracterizados por la hiperglucemia diabética que afecta al sistema nervioso, y está provocada por la lesión del sistema nervioso resultante de la diabetes mellitus.

La "lesión nerviosa diabética" incluye la deficiencia nerviosa sensorial, la deficiencia nerviosa motora y la deficiencia nerviosa autonómica. De ellas, la deficiencia nerviosa sensorial suele ser más grave. Un síntoma común es el dolor, que incluye dolor tipo quemadura, dolor tipo descarga eléctrica, dolor tipo pinchazo de aguja, otras experiencias varias del paciente y similares.

Los "trastornos diabéticos relacionados con lesiones nerviosas" son una serie de trastornos que implican trastornos metabólicos del organismo caracterizados por la hiperglicemia diabética que afecta al sistema nervioso, y están provocados por lesiones del sistema nervioso derivadas de la diabetes mellitus que incluyen, pero no se limitan a: dolor de extremidades, hipoestesia, entumecimiento, ardor, frialdad y dolor neuropático diabético, que incluye, pero no se limita a, dolor espontáneo, hipoalgesia, hiperalgesia, etc. inducidos por complicaciones diabéticas.

El "dolor neuropático diabético" es la forma más común de neuropatía diabética, y habitualmente está provocado por el deterioro de los nervios sensoriales diabéticos. El dolor principal va acompañado habitualmente de pérdida de la temperatura y de la sensación táctil. El dolor se produce sobre todo en las extremidades inferiores, y también se produce en las extremidades superiores y el tronco. En general, el dolor puede dividirse en dolor neuropático periférico y central. El dolor neuropático periférico está provocado por una lesión en los nervios periféricos, y el dolor neuropático central está provocado por una lesión en el sistema nervioso central y/o la médula espinal.

La "plasmina" es una enzima muy importante que existe en la sangre y puede hidrolizar los coágulos de fibrina en productos de degradación de la fibrina y D-dímeros.

El "plasminógeno" es la forma zimogénica de la plasmina, y basándose en la secuencia de Swiss-prot y calculada a partir de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 4) del plasminógeno humano natural que contiene un péptido señal, es una glicoproteína compuesta de 810 aminoácidos, que tiene un peso molecular de aproximadamente 90 kD y se sintetiza principalmente en el hígado y es capaz de circular en la sangre; y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es la que se muestra en la SEQ ID N°3. El plasminógeno de longitud completa contiene siete dominios: un dominio de serina proteasa C-terminal, un dominio Pan Apple (PAP) N-terminal y cinco dominios Kringle (Kringles 1-5). Con referencia a la secuencia en la Swiss-prot, el péptido señal comprende residuos Met1-Gly19, PAP comprende residuos Glu20-Val98, Kringle 1 comprende residuos Cys103-Cys181, Kringle 2 comprende residuos Glu184-Cys262, Kringle 3 comprende residuos Cys275-Cys352, Kringle 4 comprende residuos Cys377-Cys454, y Kringle 5 comprende residuos Cys481-Cys560. De acuerdo con los datos del NCBI, el dominio de serina proteasa comprende los residuos Val581-Arg804.

El glu-plasminógeno es un plasminógeno natural de longitud completa y está compuesto por 791 aminoácidos (sin un péptido señal de 19 aminoácidos); la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia es la que se muestra en la SEQ ID N° 1; y la secuencia de aminoácidos es la que se muestra en la SEQ ID N° 2. In vivo, el Lys-plasminógeno, que se forma por hidrólisis de los aminoácidos en las posiciones 76-77 del Glu-plasminógeno, también está presente, como se muestra en la SEQ ID N°6; y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID N°5. El δ -plasminógeno es un fragmento de plasminógeno de longitud completa que carece de la estructura de Kringle 2-Kringle 5 y contiene sólo Kringle 1 y el dominio serina proteasa^[27,30]. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID N° 8) del δ -plasminógeno se ha descrito en la bibliografía^[30], y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es la que se muestra en la SEQ ID N° 7. El miniplasminógeno está compuesto de Kringle 5 y el dominio de serina proteasa, y en la bibliografía se ha informado que comprende los residuos Val443-Asn791 (con el residuo Glu de la secuencia Glu-plasminógeno que no contiene un péptido señal como aminoácido de partida)^[28]; la secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID N° 10; y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID N° 9. El micro-plasminógeno comprende únicamente el dominio de serina proteasa, cuya secuencia de aminoácidos, según se ha informado en la bibliografía, comprende los residuos Ala543-Asn791 (con el residuo Glu de la secuencia Glu-plasminógeno que no contiene un péptido señal como aminoácido de partida)^[29], y cuya secuencia, según se ha informado también en el documento de patente CN 102154253 A, comprende los residuos Lys531-Asn791 (con el residuo Glu de la secuencia Glu-plasminógeno que no contiene un péptido señal como aminoácido de partida) (la secuencia en esta solicitud de patente se refiere al documento de patente CN 102154253 A); la secuencia de aminoácidos es la que se muestra en la SEQ ID N°12 y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es la que se muestra en la SEQ ID N°11.

En la presente divulgación, "plasmina" se usa indistintamente con "fibrinolisisina" y "fibrinoclasa", y los términos tienen el mismo significado; y "plasminógeno" se usa indistintamente con "zimógeno fibrinolítico" y "zimógeno fibrinoclasa", y los términos tienen el mismo significado.

En el curso de la circulación, el plasminógeno se encuentra en una conformación cerrada e inactiva, pero cuando se une a trombos o superficies celulares, se convierte en plasmina activa en una conformación abierta bajo la mediación de un activador del plasminógeno (PA). La plasmina activa hidroliza adicionalmente los coágulos de fibrina en productos de degradación de la fibrina y dímeros D, disolviendo de este modo los trombos. El dominio PAP del plasminógeno comprende un determinante importante que mantiene al plasminógeno en una conformación inactiva cerrada, y el dominio KR es capaz de unirse a residuos de lisina presentes en receptores y sustratos. Se conocen una

variedad de enzimas que pueden servir como activadores del plasminógeno, incluyendo: activador del plasminógeno tisular (tPA), activador del plasminógeno uroquinasa (uPA), calicreína, factor de coagulación XII (factor de Hagmann), y similares.

5 "Fragmento activo de plasminógeno" se refiere a un fragmento activo en la proteína de plasminógeno que es capaz de unirse a una secuencia diana en un sustrato y ejercer la función proteolítica. Las soluciones técnicas de la presente divulgación que implican plasminógeno abarcan soluciones técnicas en las que el plasminógeno se sustituye por un fragmento activo de plasminógeno. El fragmento activo de plasminógeno es una proteína que comprende un dominio de serina proteasa del plasminógeno. Preferiblemente, el fragmento activo de plasminógeno de la presente invención comprende la SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos un 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID NO: 14. Por lo tanto, el plasminógeno de la presente invención comprende una proteína que contiene el fragmento activo de plasminógeno y que sigue teniendo actividad de plasminógeno. El fragmento activo de plasminógeno de la presente invención es como se define en las reivindicaciones.

15 En la actualidad, los métodos para determinar el plasminógeno y su actividad en la sangre incluyen: la detección de la actividad del activador tisular del plasminógeno (t-PAA), detección del antígeno del activador tisular del plasminógeno (t-PAAg) en plasma, detección de la actividad tisular del plasminógeno (plgA) en plasma, la detección del antígeno tisular del plasminógeno (plgAg) en plasma, detección de la actividad del inhibidor de los activadores tisulares del plasminógeno en plasma, detección de antígenos inhibidores de los activadores tisulares del plasminógeno en plasma y la detección del complejo plasmina-antiplasmina (PAP) en plasma. El método de detección más comúnmente usado es el del sustrato cromogénico: se añaden estreptoquinasa (SK) y un sustrato cromogénico a un plasma de prueba, el plasminógeno en el plasma de prueba se convierte en PLM por la acción de la SK, el PLM actúa sobre el sustrato cromogénico y, a continuación, se determina que el aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad del plasminógeno usando un espectrofotómetro. Además, la actividad del plasminógeno en la sangre también puede determinarse por inmunquímica, electroforesis en gel, inmunonefelometría, radioinmunodifusión y similares.

20 "Ortólogos" se refieren a homólogos entre especies diferentes, incluyendo tanto homólogos de proteínas como homólogos de ADN, y también se conocen como homólogos ortólogos y homólogos verticales. El término se refiere específicamente a proteínas o genes que han evolucionado a partir del mismo gen ancestral en diferentes especies. El plasminógeno de acuerdo con la presente invención incluye el plasminógeno natural humano, y también incluye ortólogos de plasminógenos derivados de diferentes especies y que tienen actividad de plasminógeno en la medida que esta esté cubierta por la definición de plasminógeno en las reivindicaciones.

25 "Variante conservadoramente sustituida" se refiere a aquella en la que se cambia un residuo de aminoácido dado sin alterar la conformación y función global de la proteína o enzima, incluyendo, pero no limitado a, la sustitución de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la proteína original por un aminoácido con propiedades similares (como acidez, alcalinidad e hidrofobicidad). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos básicos hidrófilos y son intercambiables. De manera similar, la isoleucina es un aminoácido hidrófobo que puede sustituirse por leucina, metionina o valina. Por lo tanto, la similitud de dos proteínas o secuencias de aminoácidos con funciones similares puede ser diferente. Por ejemplo, la similitud (identidad) es del 70%-99% sobre la base del algoritmo MEGALIGN. "Variante conservadoramente sustituida" también incluye un polipéptido o enzima que tiene una identidad de aminoácidos del 60% o más, preferiblemente del 75% o más, más preferiblemente del 85% o más, incluso más preferiblemente del 90% o más según se determina mediante el algoritmo BLAST o FASTA, y que tiene las mismas propiedades o funciones o que la proteína o enzima natural u original unas sustancialmente similares.

30 Plasminógeno "aislado" se refiere a la proteína plasminógeno aislada y/o recuperada de su entorno natural. En algunas realizaciones, el plasminógeno se purificará (1) hasta una pureza de más del 90%, de más del 95% o de más del 98% (en peso), según se determina mediante el método de Lowry, como de más del 99% (en peso); (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna usando un secuenciador de vaso giratorio; o (3) hasta la homogeneidad, que se determina mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o tinción de plata. El plasminógeno aislado también incluye el plasminógeno preparado a partir de células recombinantes mediante técnicas de bioingeniería y separado mediante por lo menos un paso de purificación.

35 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente y se refieren a formas poliméricas de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados genéticamente y no codificados genéticamente, aminoácidos modificados química o bioquímicamente o derivados, y polipéptidos que tienen estructuras principales peptídicas modificadas. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo pero no limitadas a, proteínas de fusión que tienen secuencias de aminoácidos heterólogas, fusiones con secuencias líderes heterólogas y homólogos (con o sin residuos de metionina N-terminal), y similares.

40 El "porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos (%)" con respecto a la secuencia polipeptídica de

referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia cuando se introduce un hueco según sea necesario para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no se consideran sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La comparación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede realizarse de varias maneras según los conocimientos técnicos, por ejemplo, usando programas informáticos de acceso público, como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima comparación en toda la longitud de las secuencias que se estén comparando. Sin embargo, para los propósitos de la presente invención, el valor porcentual de identidad de secuencia de aminoácidos se genera usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2.

En el caso de la comparación de secuencias de aminoácidos usando ALIGN-2, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a una secuencia de aminoácidos B dada (o puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o contiene un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o para una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

$$\text{fracción } X/Y \times 100$$

en donde X es el número de residuos de aminoácidos idénticamente coincidentes puntuados por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de A y B usando el programa, y en donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en la presente se obtienen usando el programa informático ALIGN-2 como se describe en el párrafo anterior.

Como se usan en la presente, los términos "tratamiento" y "que trata" se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser la prevención completa o parcial de una enfermedad o sus síntomas y/o la curación parcial o completa de la enfermedad y/o sus síntomas, e incluye: (a) la prevención del desarrollo de la enfermedad en un sujeto que puede tener una predisposición a la enfermedad pero al que no se le ha diagnosticado la enfermedad; (b) la supresión de la enfermedad, es decir, el bloqueo de su formación; y (c) el alivio de la enfermedad y/o sus síntomas, es decir, la eliminación de la enfermedad y/o sus síntomas.

Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente y se refieren a mamíferos incluyendo, entre otros, murinos (ratas y ratones), primates no humanos, humanos, perros, gatos, ungulados (por ejemplo, caballos, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras) y demás.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de plasminógeno suficiente para lograr la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad cuando se administra a un mamífero u otro sujeto para tratar la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del plasminógeno usado, la gravedad de la enfermedad y/o sus síntomas, así como la edad, el peso corporal del sujeto a tratar y similares.

2. Preparación del plasminógeno de la presente invención

El plasminógeno puede aislarse y purificarse de la naturaleza para usos terapéuticos adicionales, y también puede sintetizarse mediante técnicas estándar de síntesis química de péptidos. Cuando se sintetiza químicamente, un polipéptido puede someterse a síntesis en fase líquida o sólida. La síntesis de polipéptidos en fase sólida (SPPS) es un método adecuado para la síntesis química de plasminógeno, en el que el aminoácido C-terminal de una secuencia se une a un soporte insoluble, seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Para sintetizar plasminógeno pueden usarse varias formas de SPPS, como Fmoc y Boc. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany y Solid-Phase Peptide Synthesis; pp. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A, Merrifield et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963); Stewart et al. *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chem Co., Rockford, Ill. (1984); y Ganesan A. 2006 *Mini Rev. Med Chem* 6:3-10 y Camarero JA et al. 2005 *Protein Pept Lett.* 12:723-8. Brevemente, se tratan pequeñas perlas porosas insolubles con una unidad funcional sobre la que se construye una cadena peptídica. Después de ciclos repetidos de acoplamiento/desprotección, la amina N-terminal libre en fase sólida se acopla a una única unidad de aminoácido N-protégida. Luego, esta unidad se desprotege para exponer una nueva amina N-terminal que puede acoplarse a otro aminoácido. El péptido permanece inmovilizado en la fase sólida antes de ser cortado.

Para producir el plasminógeno de la presente invención pueden usarse métodos recombinantes estándar. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica el plasminógeno se inserta en un vector de expresión, de tal manera que se enlaza operativamente a una secuencia reguladora en el vector de expresión. La secuencia reguladora de la expresión incluye, pero no se limita a, promotores (por ejemplo, promotores asociados de manera natural o

heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. La regulación de la expresión puede ser un sistema promotor eucariota en un vector capaz de transformar o transfectar células huésped eucariotas (por ejemplo, células COS o CHO). Una vez incorporado el vector a un huésped adecuado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de la secuencia de nucleótidos y la recogida y purificación del plasminógeno.

Un vector de expresión adecuado se replica habitualmente en un organismo huésped como un episoma o como parte integrante del ADN cromosómico del huésped. En general, un vector de expresión contiene un marcador selectivo (por ejemplo, resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina, resistencia a la kanamicina o resistencia a la neomicina) para facilitar la detección de aquellas células exógenas transformadas con una secuencia de ADN deseada.

La *Escherichia coli* es un ejemplo de células huésped procariotas que pueden usarse para clonar un polinucleótido que codifique el plasminógeno. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus subtilis* y otras especies de enterobacteriaceae (como *Salmonella* spp. y *Serratia* spp.), y varias *Pseudomonas* spp. En estos huéspedes procariotas, también pueden generarse vectores de expresión que contendrán típicamente una secuencia de control de expresión (por ejemplo, origen de replicación) que sea compatible con la célula huésped. Además, habrá muchos promotores bien conocidos, como el sistema promotor de la lactosa, el sistema promotor del triptófano (trp), el sistema promotor de la betalactamasa o el sistema promotor del fago lambda. Opcionalmente, en el caso de la manipulación de una secuencia génica, un promotor controlará habitualmente la expresión, y tiene una secuencia de sitio de unión a ribosomas y similares para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

Para la expresión también pueden usarse otros microorganismos, como las levaduras. La *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*) y *Pichia* son ejemplos de células huésped de levadura adecuadas, en las que un vector adecuado tiene una secuencia de control de expresión (por ejemplo, promotor), un origen de replicación, una secuencia de terminación y similares, según se requiera. Un promotor típico comprende la 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores inducibles de levadura incluyen específicamente promotores derivados de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de microorganismos, para expresar y generar el plasminógeno de la presente invención (por ejemplo, un polinucleótido que codifica el plasminógeno en cuestión) también pueden usarse células de mamífero (por ejemplo, células de mamífero cultivadas en cultivo celular in vitro). Consultar Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen líneas celulares CHO, varias líneas celulares Cos, células HeLa, líneas celulares de mieloma y células B transformadas o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden comprender una secuencia de control de la expresión, como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen et al. Immunol. Rev. 89:49 (1986)), así como sitios de información de procesamiento necesarios, como un sitio de unión a ribosomas, un sitio de corte y empalme de ARN, un sitio de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción. Ejemplos de secuencias de control de expresión adecuadas son los promotores derivados del gen de la inmunoglobulina blanca, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Consultar Co et al. J. Immunol. 148:1149 (1992).

Una vez sintetizado (química o recombinantemente), el plasminógeno de la presente invención puede purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columna de afinidad, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis en gel y similares. El plasminógeno es sustancialmente puro, por ejemplo, por lo menos aproximadamente entre un 80% y un 85% puro, por lo menos aproximadamente entre un 85% y un 90% puro, por lo menos aproximadamente entre un 90% y un 95% puro, o entre un 98% y un 99% puro o más puro, por ejemplo, libre de contaminantes como restos celulares, macromoléculas distintas del plasminógeno y similares.

3. Formulaciones farmacéuticas

Puede prepararse una formulación terapéutica mezclando plasminógeno de la pureza deseada con un portador, excipiente o estabilizador farmacéutico opcional (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. ed. (1980)) para formar una preparación liofilizada o una solución acuosa. Los portadores, excipientes y estabilizadores aceptables no son tóxicos para el receptor en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, como fosfatos, citratos y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecil dimetil bencil amonio; cloruro de hexano diamina; cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio; fenol, butanol o alcohol bencílico; p-hidroxibenzoatos de alquilo, como p-hidroxibenzoato de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, como la glicina, la glutamina, la asparagina, la histidina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo la glucosa, la manosa o las dextrinas; agentes quelantes, como el EDTA; azúcares, como la sacarosa, el manitol, la fucosa o el sorbitol; contraiones formadores de sales, como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos

zinc-proteína); y/o surfactantes no iónicos, como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones de la invención también pueden comprender uno o más compuestos activos requeridos para el trastorno particular que se va a tratar, preferiblemente aquellos que son complementarios en actividad y no tienen efectos secundarios entre sí, por ejemplo, fármacos antihipertensivos, fármacos antiarrítmicos, fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus, y similares.

El plasminógeno de la presente invención puede encapsularse en microcápsulas preparadas mediante técnicas como la coacervación o la polimerización interfacial, por ejemplo, puede incorporarse en un sistema coloidal de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o incorporarse en microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gel y microcápsulas de poli(metil metacrilato) en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

El plasminógeno de la presente invención para la administración in vivo debe ser estéril. Esto puede lograrse fácilmente mediante filtración a través de una membrana de filtración estéril antes o después de la liofilización y reconstitución.

El plasminógeno de la presente invención puede prepararse en una preparación de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices sólidas semipermeables de polímeros hidrófobos que tienen una forma y contienen glicoproteínas, como películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato)) (Langer et al. J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981); y Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)), o poli(alcohol vinílico), polilactidos (Patente de Estados Unidos 3773919, y EP 58,481), copolímero de ácido L-glutámico y ácido etil-L-glutámico (Sidman et al. Biopolymers 22:547(1983)), etilvinilacetato no degradable (Langer et al. supra), o copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico como Lupron DepotTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli D-(-)-3-hidroxitútrico. Los polímeros, como el etilvinilacetato y el ácido láctico-glicólico, son capaces de liberar moléculas de forma persistente durante 100 días o más, mientras que algunos hidrogeles liberan proteínas durante un periodo de tiempo más corto. Puede diseñarse una estrategia racional para la estabilización de proteínas basada en mecanismos relevantes. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace intermolecular S-S a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilidad se logra modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

4. Administración y dosificación

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse de diferentes maneras, por ejemplo, por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, intratecal, intraarterial (por ejemplo, a través de la carótida), intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica, o por vía medular o cerebral. Una preparación en aerosol, como una preparación de espray nasal, comprende soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo junto con un conservante y un agente isotónico. Estas preparaciones se ajustan a un pH y un estado isotónico compatibles con la mucosa nasal.

En algunos casos, la composición farmacéutica de plasminógeno de la presente invención puede modificarse o formularse de tal manera que proporcione su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Tales composiciones de plasminógeno pueden administrarse a un individuo que padezca de trombosis y/o una enfermedad relacionada con la trombosis a través de una variedad de vías de administración enterales y parenterales, incluyendo oral, intravenosa y similares.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de solventes no acuosos son el propilenglicol, el polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen el agua y las soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo los medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen suplementos líquidos y nutrientes, suplementos electrolíticos y similares. También pueden estar presentes, por ejemplo, conservantes y otros aditivos, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

En algunas realizaciones, el plasminógeno de la invención se formula con un agente que promueve que el plasminógeno cruce la barrera hematoencefálica. En algunos casos, el plasminógeno de la presente invención se fusiona directamente o mediante un conector a una molécula portadora, péptido o proteína que promueve la fusión para atravesar la barrera hematoencefálica. En algunas realizaciones, el plasminógeno de la presente invención se fusiona a un polipéptido que se une a un receptor endógeno de la barrera hematoencefálica (BBB). El polipéptido que está enlazado al plasminógeno y se une a un receptor endógeno de BBB promueve la fusión para atravesar la BBB.

Los polipéptidos adecuados que se unen a receptores endógenos de BBB incluyen anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a receptores endógenos de BBB. Los receptores endógenos de BBB adecuados incluyen, entre otros, los receptores de insulina. En algunos casos, los anticuerpos se encapsulan en liposomas. Consultar, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2009/0156498.

El personal médico determinará el régimen de dosificación basándose en varios factores clínicos. Como es bien sabido en el ámbito médico, la dosificación de cualquier paciente depende de una variedad de factores, incluyendo el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto específico que se va a administrar, el sexo, la frecuencia y la vía de administración, el estado general de salud y otros fármacos administrados simultáneamente. El intervalo de dosificación de la composición farmacéutica que comprende plasminógeno de la presente invención puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 a 2000 mg/kg, o de aproximadamente 0,001 a 500 mg/kg (como 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 10 mg/kg y 50 mg/kg) del peso corporal del sujeto al día. Por ejemplo, la dosis puede ser de 1 mg/kg de peso corporal o 50 mg/kg de peso corporal, o en el intervalo de 1 mg/kg-50 mg/kg, o por lo menos 1 mg/kg. También se contemplan dosificaciones por encima o por debajo de este intervalo ejemplar, especialmente teniendo en cuenta los factores anteriores. También se incluyen en el alcance de la presente invención las dosificaciones intermedias en el intervalo anterior. A un sujeto se le pueden administrar tales dosis diariamente, cada dos días, semanalmente o en base a cualquier otro esquema determinado por análisis empírico. Un esquema de dosificación ejemplar incluye 1-10 mg/kg durante días consecutivos. Durante la administración del fármaco de la presente invención, el efecto terapéutico y la seguridad deben evaluarse en tiempo real y regularmente.

5. Eficacia del tratamiento y seguridad del tratamiento

Puede llevarse a cabo una evaluación de la eficacia del tratamiento y la seguridad del tratamiento después de tratar a un sujeto con plasminógeno.

Evaluación de la eficacia del tratamiento: Se evalúa el dolor medio diario de un sujeto desde la semana en la que comienza el tratamiento (semana de referencia) hasta la fase de tratamiento preestablecida, y la evaluación puede llevarse a cabo usando la puntuación del dolor en la escala VAS de 11 puntos, la escala LANSS, la escala de dolor neuropático (NPS), la escala de Likert (graduada de 0 a 10 puntos) o similares. Por ejemplo, en la escala VAS, 0 significa ausencia de dolor y 11 dolor intolerable, en la que:

0 puntos: sin dolor;

3 puntos o menos: el dolor es leve y tolerable;

4-6 puntos: el sujeto siente dolor y el dolor afecta al sueño, pero sigue siendo tolerable; y

7-10 puntos: el sujeto experimenta un dolor creciente, y el dolor es intolerable y afecta al apetito y al sueño.

También es posible usar una escala VAS más fina para la puntuación, por ejemplo, para evaluar el dolor en una escala de 100 mm.

También puede usarse el índice de dolor también como índice de evaluación principal, y al mismo tiempo se establecen índices de evaluación secundarios, como la movilidad articular, el estado funcional y la calidad de vida.

Evaluación de la seguridad: Además, la evaluación de la seguridad del régimen terapéutico durante y después de tratar a un sujeto con plasminógeno y sus variantes incluye, pero no está limitada a, la monitorización de acontecimientos adversos, la evaluación del laboratorio clínico, el electrocardiograma (ECG), las mediciones de las constantes vitales, los exámenes físicos y neurológicos, etc., y las estadísticas de la semivida sérica, la semivida del tratamiento, la dosis tóxica mediana (TD50) y la dosis letal mediana (LD50) del fármaco en el sujeto. Un acontecimiento adverso se define como cualquier acontecimiento médico adverso en un paciente o sujeto de ensayo clínico al que se le administran fármacos y que no tiene necesariamente una relación causal con el tratamiento. Los acontecimientos adversos incluyen típicamente, entre otros, dolores de cabeza, mareos, infecciones de las vías respiratorias superiores, náuseas y similares.

6. Artículos de fabricación o kits

Un artículo de fabricación o un kit que puede comprender el plasminógeno de la presente invención. El artículo de fabricación incluye preferentemente un recipiente, etiqueta o prospecto. Los recipientes adecuados incluyen botellas, viales, jeringuillas y similares. El recipiente puede estar hecho de varios materiales, como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la enfermedad o trastorno de la presente invención y tiene un acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que contiene un tapón que puede perforarse con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo de la composición es plasminógeno. La etiqueta sobre o adherida al recipiente indica que la composición se usa para tratar la neuropatía diabética de la presente invención. El artículo puede comprender además un segundo recipiente que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable, como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de glucosa. Puede comprender además otras sustancias necesarias desde el punto de vista comercial y

del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas. Además, el artículo comprende un prospecto con instrucciones de uso, que incluyen, por ejemplo, instrucciones para que un usuario de la composición administre a un paciente la composición de plasminógeno y otros fármacos para tratar una enfermedad concomitante.

5 Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra los cambios en el peso corporal después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 14-15 semanas de edad.

10 La **Figura 2** muestra los cambios en la capacidad de respuesta a la alodinia mecánica después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 14-15 semanas de edad.

La **Figura 3** muestra los resultados de detección de la capacidad de respuesta a la estimulación por frío en los días 0, 3, 6 y 12 después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 14-15 semanas de edad.

La **Figura 4** muestra los resultados de detección de la capacidad de respuesta a la hiperalgesia mecánica en los días 0, 3, 6 y 12 después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 14-15 semanas de edad.

15 La **Figura 5** muestra los cambios en el peso corporal después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas.

La **Figura 6** muestra los resultados de detección de la capacidad de respuesta a la alodinia mecánica en los días 0, 4, 7, 11 y 16 después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad.

20 La **Figura 7** muestra los resultados de detección de la capacidad de respuesta a la estimulación por frío en los días 0, 4, 7, 11 y 16 después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad.

La **Figura 8** muestra los resultados de detección de la capacidad de respuesta a la hiperalgesia mecánica en los días 0, 4, 7, 11 y 16 después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad.

25 La **Figura 9** muestra los resultados observados de la tinción HE del nervio ciático después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 15 días consecutivos.

La **Figura 10** muestra los resultados observados de la inmunotinción de fibrina del nervio ciático después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 15 días consecutivos.

30 La **Figura 11** muestra los resultados observados de la inmunotinción de fibrina del hígado después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 31 días consecutivos.

La **Figura 12** muestra los resultados observados de la inmunotinción con F4/80 del hígado después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 31 días consecutivos.

La **Figura 13** muestra los resultados observados de la inmunotinción de fibrina de los riñones después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 31 días consecutivos.

35 La **Figura 14** muestra los resultados observados de la inmunotinción de Bcl-2 de los riñones después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 31 días consecutivos.

La **Figura 15** muestra los resultados observados de la tinción PAS de la retina después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 31 días consecutivos.

40 La **Figura 16** muestra los resultados de detección del contenido de dímero D en el suero después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 15 días consecutivos.

La **Figura 17** muestra los resultados de detección de la concentración de troponina I cardiaca en suero después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas durante 31 días.

45 La **Figura 18** muestra los resultados observados de la inmunotinción de IgM de los riñones después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas de edad durante 31 días.

La **Figura 19** muestra los resultados de la detección de alanina transaminasa (ALT) en suero después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24-25 semanas durante 31 días.

La **Figura 20** muestra los cambios en la capacidad de respuesta a la alodinia mecánica después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 8 semanas de edad durante 9 días.

50 Ejemplos

Ejemplo 1. Efecto del plasminógeno sobre el peso corporal de animales de experimentación

55 Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 14-15 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control

60 al que se administró PBS de vehículo. Los ratones se pesaron los días 0, 3, 6 y 12, respectivamente. Los resultados mostraron que no había diferencias significativas en el peso corporal entre los ratones del grupo al que se administró plasminógeno y los del grupo de control al que se le administró vehículo de PBS en los días 0, 3, 6 y 12 (Figura 1), lo que indica que el plasminógeno tiene poco efecto sobre el peso corporal de los animales.

Ejemplo 2. El plasminógeno promueve la reparación de la capacidad de respuesta de los ratones diabéticos a la algesia

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 14-15 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se le administró vehículo PBS y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los días 0, 3, 6 y 12 después de la administración de plasminógeno, se detectó la sensibilidad de los animales a las lesiones mecánicas usando filamentos de Von-Frey (Stoelting, USA). Con 2,0 g de fuerza como fuerza inicial, se detectó primero la pata izquierda. Si se producían 4 retiradas de la pata durante 5 estimulaciones, era positivo y se registraba como umbral de la sensibilidad del animal a la lesión mecánica. Si la respuesta del estímulo con una fuerza de 2,0 g era negativa, se estimulaba el pie derecho con una fuerza grande; si era positiva, se registraba como su umbral; y si era negativa, se seguía estimulando el pie izquierdo con una fuerza grande, y por tanto se estimulaban alternativamente los pies izquierdo y derecho de los ratones diabéticos hasta que se producía una reacción positiva^[31]. Los resultados estadísticos del experimento con filamentos de Von Frey mostraron que los ratones del grupo al que se administró plasminógeno presentaban un umbral de algesia del 50% significativamente menor que los del grupo de control al que se administró PBS de vehículo, tanto después de 3 días de administración como de 11 días de administración (Figura 2), lo que indica que el plasminógeno repara la capacidad de los ratones diabéticos para responder a la alodinia mecánica.

Ejemplo 3. El plasminógeno restaura la respuesta neural de los ratones diabéticos a la estimulación por frío

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 14-15 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día por la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo se les administró un volumen igual de PBS. Los días 0, 3, 6 y 12 después de la administración de plasminógeno, se exprimió una gota de acetona con una jeringuilla sin aguja y se tocó ligeramente la planta de cada ratón diabético para cubrir toda la planta con acetona. Empezando por el pie izquierdo, se estimularon alternativamente los pies izquierdo y derecho cada 3 minutos hasta un total de 10 estimulaciones, y se contó el número de retiradas de la pata. Porcentaje de respuesta = número de retiradas de la pata/número de estimulaciones x 100%.

Los resultados experimentales mostraron que no había diferencias significativas en la respuesta a la estimulación con acetona entre los ratones del grupo al que se administró plasminógeno y los del grupo de control los días 0 y 3; sin embargo, se observó una diferencia significativa a partir del día 6, y una diferencia extremadamente significativa el día 12 (Figura 3). Estos resultados indicaron que los ratones mostraron una sensibilidad significativa a la sensación de frío 6 días después de la administración de plasminógeno, y una diferencia extremadamente significativa en la respuesta el día 12, lo que indica que el plasminógeno repara notablemente la lesión en la respuesta neural de los ratones diabéticos a la estimulación por frío.

Ejemplo 4. El plasminógeno repara la respuesta de los ratones diabéticos a la hiperalgesia mecánica

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 14-15 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los días 0, 3, 6 y 12 después de la administración de plasminógeno, se estimuló a los ratones db/db en la planta con una aguja de calibre 27 estándar americano con una fuerza que tocaba suavemente la planta de los ratones, pero no perforaba la capa de corion. Empezando por el pie izquierdo, se estimularon alternativamente los pies izquierdo y derecho cada 3 minutos hasta un total de 10 estimulaciones, y se contó el número de retiradas de la pata. Porcentaje de respuesta = número de retiradas de la pata/número de estimulaciones x 100%. La diferencia en la respuesta de acupuntura entre los ratones del grupo al que se administró plasminógeno y los del grupo de control al que se administró PBS de vehículo fue extremadamente significativa, y el valor P fue < 0,0001 (Figura 4), lo que indica que el plasminógeno repara de manera extremadamente significativa la lesión en la respuesta de hiperalgesia neuromecánica provocada por la diabetes mellitus.

Ejemplo 5. Efecto del plasminógeno sobre el peso corporal de ratones diabéticos tardíos con lesión nerviosa.

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno,

respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 15 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los ratones se pesaron los días 0, 4, 7, 11 y 16 después de la administración del plasminógeno, respectivamente. Los resultados mostraron que no había diferencias significativas en el peso corporal entre los ratones del grupo al que se administró plasminógeno y los del grupo de control al que se administró PBS de vehículo en los días 0, 4, 7, 11 y 16 (Figura 5), lo que indica que el plasminógeno tiene poco efecto sobre el peso corporal de los animales.

Ejemplo 6. El plasminógeno promueve la reparación de la capacidad de los ratones diabéticos tardíos con lesión nerviosa para responder a la alodinia mecánica

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 15 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los días 0, 4, 7, 11 y 16 después de la administración de plasminógeno, se detectó la sensibilidad de los animales a las lesiones mecánicas usando filamentos de Von-Frey (Stoelting, USA). Con 2,0 g de fuerza como fuerza inicial, se detectó primero la pata izquierda. Si se producían 2 retiradas de pata durante 5 estimulaciones, era positivo; y si era positivo, a continuación, se estimulaba el pie derecho con una fuerza menor. Si era negativo, se estimulaba el pie derecho con una fuerza mayor; por tanto, se estimulaban alternativamente los pies izquierdo y derecho durante un total de 6 estimulaciones con un intervalo de estimulación de 5 minutos y, a continuación, se calculaba el umbral de retirada de la pata del 50% de acuerdo con el método introducido en S.R. Chaplan et. al. (1994)^[32].

El estudio descubrió que, en comparación con los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo, los ratones diabéticos del grupo al que se administró plasminógeno mostraron un aumento uniforme de la respuesta a la alodinia mecánica, y se encontró una diferencia extremadamente significativa el día 16 en comparación con los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo (Figura 6), lo que indica que el plasminógeno repara la capacidad de respuesta a la alodinia mecánica de los ratones diabéticos con lesión nerviosa tardía.

Ejemplo 7. El plasminógeno repara la respuesta de ratones diabéticos tardíos con lesión nerviosa a la estimulación por frío

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 15 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los días 0, 4, 7, 11 y 16 después de la administración, se exprimió una gota de acetona con una jeringuilla sin aguja y se tocó ligeramente la planta de cada ratón db/db para cubrir toda la planta con acetona. Empezando por el pie izquierdo, se estimularon alternativamente los pies izquierdo y derecho cada 3 minutos hasta un total de 10 estimulaciones, y se contó el número de retiradas de la pata. Porcentaje de respuesta = número de retiradas de la pata/número de estimulaciones x 100%.

Los resultados experimentales mostraron que no había diferencia significativa en la respuesta a la estimulación con acetona entre los ratones del grupo al que se administró plasminógeno y los del grupo de control al que se administró PBS de vehículo en los días 0 y 4; sin embargo, se observó una diferencia significativa a partir del día 7, y una diferencia extremadamente significativa en el día 16, y el valor P fue < 0,0001 (Figura 7), lo que indica que después de 15 días de administración, los ratones diabéticos recuperaron casi por completo la respuesta a la estimulación por frío, lo que sugiere que el plasminógeno repara de manera extremadamente significativa la lesión en el nervio por estimulación por frío en la diabetes mellitus tardía.

Ejemplo 8. El plasminógeno repara la respuesta de ratones diabéticos tardíos con lesión nerviosa a la hiperalgesia mecánica

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 15 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó

plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los días 0, 4, 7, 11 y 16 después de la administración de plasminógeno, se estimuló a los ratones db/db en la planta con una aguja de calibre 27 con una fuerza que tocaba suavemente la planta de los ratones, pero sin perforar la capa de corion. Empezando por el pie izquierdo, se estimularon alternativamente los pies izquierdo y derecho cada 3 minutos durante un total de 10 estimulaciones, y se contó el número de retiradas de la pata. Porcentaje de respuesta = número de retiradas de la pata/número de estimulaciones x 100%.

Los resultados experimentales mostraron que se observaron diferentes grados de restauración de la respuesta a la estimulación por acupuntura en ratones diabéticos tardíos con lesión nerviosa en el día 7 o antes después de la administración de plasminógeno, y se observó una diferencia extremadamente significativa y una diferencia significativa en la respuesta a la estimulación por acupuntura entre los ratones del grupo al que se administró plasminógeno y los del grupo de control al que se administró PBS de vehículo en los días 11 y 16 (Figura 8), lo que indica que el plasminógeno repara de manera extremadamente significativa la respuesta de los ratones diabéticos tardíos a la hiperalgesia mecánica.

Ejemplo 9. Efecto protector del plasminógeno en la lesión del tejido nervioso de ratones diabéticos tardíos con lesión nerviosa.

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 15 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo se les administró un volumen igual de PBS. Los ratones se sacrificaron el día 16 y se fijaron los nervios ciáticos en formalina neutra al 10% durante 24 horas. Los nervios ciáticos fijados se embebieron en parafina después de deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron, se tiñeron con hematoxilina y eosina (tinción HE), se diferenciaron con ácido clorhídrico al 1% en alcohol y se volvieron a teñir de azul con agua amoniacal. Las secciones se sellaron tras deshidratación con gradiente de alcohol y se observaron al microscopio a 400 x.

Los resultados experimentales mostraron que los ratones del grupo de control a los que se administró el PBS de vehículo tenían una brecha de fibras nerviosas ciáticas ensanchada, en la que un gran número de vainas de mielina y axones estaban hinchados (↑), y un pequeño número de axones estaban disgregados (▲) (Figura 9A). Sin embargo, los ratones del grupo del plasminógeno tenían fibras nerviosas estrechamente dispuestas, y sólo una pequeña cantidad de vainas de mielina y axones estaban hinchados y disgregados (Figura 9B). Esto indicaba que el plasminógeno tiene un cierto efecto reparador sobre la lesión del tejido nervioso de los ratones diabéticos tardíos.

Ejemplo 10. El plasminógeno reduce el nivel de fibrina en tejidos nerviosos de ratones diabéticos tardíos con lesión nerviosa

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 15 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo se les administró un volumen igual de PBS. Los ratones se sacrificaron el día 16 y se fijaron los nervios ciáticos en formalina neutra al 10% durante 24 horas. Los nervios ciáticos fijados se embebieron en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y se rehidrataron, se lavaron con agua una vez y, a continuación, se marcaron los tejidos con un rotulador PAP. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno diluido en TBS al 3% durante 15 minutos, y se lavaron con agua tres veces. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 10% (Vector laboratories, Inc., USA) durante 1 hora, y se aspiró el exceso de suero. Las secciones se incubaron con anticuerpo de conejo anti-fibrina (fibrinógeno) de ratón (Abcam) durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C y se lavaron con TBS tres veces. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abcam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con TBS tres veces. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en gradiente, la permeabilización y el sellado, las secciones se observaron al microscopio a 400 x.

El fibrinógeno es el precursor de la fibrina y, en presencia de una lesión tisular, como respuesta de estrés a

la lesión del cuerpo, el fibrinógeno se hidroliza en fibrina [33-35]. Por lo tanto, el nivel de fibrinógeno puede usarse como signo del grado de lesión.

5 El estudio descubrió que, en comparación con los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo (Figura 10A), los del grupo al que se administró plasminógeno (Figura 10B) tenían una disminución del nivel de fibrina en el nervio ciático, lo que indica que el plasminógeno repara hasta cierto punto la lesión del tejido nervioso.

Ejemplo 11. El plasminógeno reduce el nivel de fibrina en los tejidos hepáticos en la diabetes mellitus tardía

10 Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo se les administró un volumen igual de PBS. Los ratones se sacrificaron el día 15 32 y los tejidos hepáticos se fijaron en formalina neutra al 10% durante 24 horas. Los tejidos hepáticos fijados se embebieron en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con una solución de suero de cabra normal al 10% (Vector laboratories, Inc., USA) durante 1 hora; una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de suero de cabra y se marcaron los tejidos con un rotulador PAP. Las secciones se incubaron con anticuerpo de conejo anti-fibrina (fibrinógeno) de ratón (Abcam) durante toda la noche a 4° C y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abcam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en gradiente, la permeabilización y el sellado, las secciones se observaron al microscopio a 200 x.

20 El fibrinógeno es el precursor de la fibrina y, en presencia de una lesión tisular, como respuesta de estrés a la lesión del organismo, el fibrinógeno se hidroliza en fibrina^[33-35]. Por lo tanto, puede usarse el nivel de fibrina como signo del grado de lesión.

35 El estudio descubrió que, en comparación con los ratones del grupo de control administrados con el PBS de vehículo (Figura 11A), los del grupo al que se administró plasminógeno (Figura 11B) presentaban una tinción positiva de fibrina más clara en los tejidos hepáticos, lo que indica que la inyección de plasminógeno puede reducir significativamente la fibrina depositada en los tejidos hepáticos de los ratones diabéticos, lo que refleja el importante efecto reparador del plasminógeno en la lesión del tejido hepático de los ratones diabéticos.

Ejemplo 12. El plasminógeno reduce la inflamación de los tejidos hepáticos de ratones diabéticos tardíos

45 Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo se les administró un volumen igual de PBS. Los ratones se sacrificaron 31 días después de la administración de plasminógeno, y los tejidos hepáticos se fijaron en formalina neutra al 10% durante 24 horas. Los tejidos hepáticos fijados se embebieron en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 10% (Vector laboratories, Inc., USA) durante 1 hora y, una vez transcurrido el tiempo, se desechó el suero y se marcaron las secciones con un rotulador PAP. Las secciones se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo contra F4/80 (Abcam) durante toda la noche a 4° C y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abcam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con TBS dos veces. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en gradiente, la permeabilización y el sellado, las secciones se observaron al microscopio a 400 x.

65

El F4/80 es un marcador de macrófagos que puede indicar el grado y la etapa de una respuesta inflamatoria. Los resultados mostraron que, en comparación con los ratones del grupo de control al que se administró el PBS de vehículo (Figura 12A), la expresión positiva de F4/80 se redujo significativamente en los del grupo al que se administró plasminógeno (Figura 12B), lo que indica que la inflamación de los tejidos hepáticos se reduce tras la administración de plasminógeno. La Figura 12C muestra los resultados del análisis cuantitativo de la expresión positiva inmunohistoquímica de F4/80, en el que la expresión de F4/80 en los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se redujo significativamente con diferencia estadística, lo que indica que la inyección de plasminógeno puede reducir significativamente la inflamación del hígado de los ratones diabéticos.

10 **Ejemplo 13. El plasminógeno promueve la hidrólisis de la fibrina en los riñones de ratones diabéticos tardíos**

Se dividieron aleatoriamente veinte ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, diez en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y diez en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los ratones se sacrificaron el día 32 y los riñones se fijaron en formalina neutra al 10% durante 24 horas. Los tejidos renales fijados se embebieron en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con una solución de suero de cabra normal al 10% (Vector laboratories, Inc., USA) durante 1 hora; una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de suero de cabra y se marcaron los tejidos con un rotulador PAP. Las secciones se incubaron con anticuerpo de conejo anti-fibrina (fibrinógeno) de ratón (Abcam) durante toda la noche a 4° C y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abcam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en gradiente, la permeabilización y el sellado, las secciones se observaron al microscopio a 200 x.

El fibrinógeno es el precursor de la fibrina, y en presencia de una lesión tisular, como respuesta de estrés a la lesión del organismo, el fibrinógeno se hidroliza en fibrina y se deposita en el lugar de la lesión^[33-35]. Por lo tanto, el nivel de fibrina puede usarse como signo del grado de lesión.

Los resultados mostraron que, en comparación con los ratones del grupo de control al que se le administra PBS de vehículo (Figura 13A), los ratones del grupo al que se administró plasminógeno (Figura 13B) tenían una tinción positiva de fibrinógeno más clara, lo que indica que la inyección de plasminógeno puede reducir significativamente la fibrina depositada en los riñones de los ratones diabéticos, lo que refleja que el plasminógeno tiene un efecto reparador significativo en las lesiones corporales de los ratones diabéticos.

45 **Ejemplo 14. El plasminógeno promueve la expresión de Bcl-2, una proteína inhibidora de la apoptosis, en los riñones de ratones diabéticos tardíos.**

Se dividieron aleatoriamente veinte ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, diez en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y diez en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los ratones se sacrificaron el día 32 y los riñones se fijaron en formalina neutra al 10% durante 24 horas. Los tejidos renales fijados se embebieron en parafina después de deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con una solución de suero de cabra normal al 10% (Vector laboratories, Inc., USA) durante 1 hora; y una vez transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de suero de cabra y se marcaron los tejidos con un rotulador PAP. Las secciones se incubaron con anticuerpo de conejo anti-Bcl-2 de ratón (Abcam) a 4° C durante la noche y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abcam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en

gradiente, la permeabilización y el sellado, las secciones se observaron al microscopio a 200 x.

Bcl-2 es una proteína inhibidora de la apoptosis, y su expresión se regulará a la baja bajo la acción de un factor estimulante de la apoptosis^[36, 37]. Los resultados inmunohistoquímicos de Bcl-2 mostraron que la tinción de expresión positiva de las células epiteliales tubulares de los ratones del grupo al que se administró plasminógeno (Figura 14B) era significativamente más oscura que la de las células epiteliales tubulares de los del grupo de control al que se administró PBS de vehículo (Figura 14A), y las primeras tenían un intervalo de tinción más amplio. Los resultados del análisis cuantitativo fueron consistentes con las observaciones, y hubo diferencias significativas (como se muestra en la Figura 14C). Esto indicaba que el plasminógeno puede promover la expresión de Bcl-2, una molécula inhibidora de la apoptosis, en los riñones de ratones diabéticos y, por tanto, puede inhibir la apoptosis en los tejidos renales de ratones diabéticos.

Ejemplo 15. El plasminógeno mejora la lesión de la retina de ratones diabéticos tardíos

Se dividieron aleatoriamente veinte ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, diez en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y diez en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Los ratones se sacrificaron el día 32 y se fijaron los globos oculares izquierdos en fijador de paraformaldehído durante 24 horas. La retina se separó de los globos oculares fijados y se colocó en un tubo EP de 1 ml que contenía pancreatina al 3% (Solarbio), y se agitó para su digestión en un agitador a 37° C durante 2-3 h. Una vez que la retina se hubo ablandado y desprendido, se transfirió cuidadosamente a un tubo EP lleno de agua destilada y se agitó en un agitador a 37° C durante 2-3 h para desprender el exceso de tejidos de la retina. La retina se pipeteó suavemente, dejando sólo la capa de vasos sanguíneos, y después se extendió sobre un portaobjetos de vidrio y se secó al aire. La retina se tiñó con solución periódica de ácido-Schiff (tinción PAS), se diferenció con ácido clorhídrico al 1% en alcohol y se volvió a teñir de azul con agua amoniacal. El portaobjetos se selló después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno, y se observó al microscopio a 400 x.

De los resultados experimentales se desprende que, en comparación con el grupo de plasminógeno (Figura 15B), los diámetros de los capilares retinianos de los ratones db/db del grupo de control al que se administró PBS de vehículo (figura 15A) eran diferentes, en los que las paredes vasculares estaban engrosadas y teñidas de oscuro, las células endoteliales vasculares (Δ) proliferaban y los pericitos (\downarrow) disminuían notablemente; sin embargo, los ratones del grupo al que se administró plasminógeno presentaban cambios patológicos notablemente reducidos. A partir del análisis cuantitativo se observó que, en comparación con los ratones del grupo de control al que se le administra PBS de vehículo, los del grupo al que se administró plasminógeno presentaban una longitud vascular libre de células significativamente reducida (Figura 15C), y los resultados del análisis estadístico mostraron una diferencia significativa. Esto indicaba que el plasminógeno puede promover significativamente la reparación de la lesión retiniana de los ratones diabéticos tardíos.

Ejemplo 16. El plasminógeno promueve la disolución de los microtrombos provocados por la diabetes mellitus

Se dividieron aleatoriamente diez ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cinco en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cinco en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 15 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. El día 16, se extrajo sangre de los globos oculares extirpados y se dejó reposar la sangre entera para obtener suero para detectar el contenido de dímero D en la sangre.

Los resultados mostraron que el contenido de dímero D en el suero de los ratones del grupo al que se administró plasminógeno aumentó significativamente después de 15 días de administración (Figura 16), lo que indica que después de la administración de plasminógeno se disolvieron significativamente los microtrombos provocados por la diabetes mellitus.

Ejemplo 17. El plasminógeno repara la lesión miocárdica en la diabetes mellitus tardía

Se dividieron aleatoriamente veintiocho ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, doce en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y dieciséis en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones

durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. El día 32, se extrajo sangre de los globos oculares y se centrifugó a 3.500 r/min durante 15-20 minutos; y el sobrenadante se usó para determinar la concentración de troponina I cardiaca.

La troponina I cardiaca (CTNI) es un marcador importante de lesión miocárdica, y su concentración sérica puede reflejar el grado de lesión miocárdica [38]. Los resultados mostraron que la concentración de troponina I cardiaca en el grupo al que se administró plasminógeno era significativamente menor que en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo, y había una diferencia estadística extremadamente significativa (Figura 17). Esto indicaba que el plasminógeno puede promover de manera extremadamente significativa la reparación de la lesión miocárdica de ratones diabéticos tardíos.

Ejemplo 18. El plasminógeno reduce la lesión de los riñones de ratones diabéticos tardíos

Se dividieron aleatoriamente ocho ratones db/db macho de 24-25 semanas de edad en dos grupos, cuatro en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cuatro en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. La detección de los índices fisiológicos finalizó el día 32, los ratones se sacrificaron y los riñones se fijaron en formalina neutra al 10% durante 24 horas. Los tejidos renales fijados se embebieron en parafina tras deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 5 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón (HRP) (Abcam) durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con TBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente durante 5 minutos. Tras la deshidratación en gradiente, la permeabilización y el sellado, las secciones se observaron al microscopio a 400 x.

Los anticuerpos de IgM desempeñan un papel importante durante la eliminación de células apoptóticas y necróticas^[39-41]. Por lo tanto, su expresión puede reflejar la lesión de tejidos y órganos.

Los resultados mostraron que la tinción positiva de IgM glomerulares en ratones del grupo al que se administró plasminógeno (Figura 18B) era más clara que la de IgM glomerulares en ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo (Figura 18A), el intervalo también era menor, y los resultados del análisis estadístico fueron coherentes con las observaciones (Figura 18C), lo que indica que la lesión glomerular mejora notablemente tras la inyección de plasminógeno, reflejando la importante función reparadora del plasminógeno en la lesión corporal de los ratones diabéticos.

Ejemplo 19. El plasminógeno promueve la reparación de la lesión hepática de ratones diabéticos

Se dividieron aleatoriamente nueve ratones db/db macho de 25-28 semanas de edad en dos grupos, tres en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y seis en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 31 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml /ratón/día a través de la vena de la cola, y se administró un volumen igual de PBS a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo. Se extrajo sangre total de los globos oculares extirpados 31 días después de la administración del plasminógeno. Una vez hubo precipitado el suero, se centrifugó a 3500 r/min durante 10 minutos a 4° C, y se tomó el sobrenadante para la detección. En este experimento, el contenido de alanina transaminasa (ALT) en el suero se detectó mediante colorimetría de Reitman-Frankel usando un kit de detección de alanina transaminasa (Nanjing Jiancheng Biological Engineering Research Institute, N° de catálogo C009-2).

La alanina transaminasa es un importante índice del estado de salud del hígado^[42,43], y el intervalo del valor de referencia normal de la alanina transaminasa es de 9-50 U/L. Los resultados de la detección mostraron que el contenido de ALT en el suero de los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo era significativamente más alto que el índice fisiológico normal, mientras que el contenido en los ratones del grupo al que se administró plasminógeno había vuelto a los niveles normales del organismo; y el contenido en los ratones del grupo al que se administró plasminógeno era significativamente menor que el de los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo, y había una diferencia estadística (Figura 19). Esto indicó que la inyección de

plasminógeno puede reparar eficazmente la lesión hepática en ratones modelo con diabetes diabética tardía.

Ejemplo 20. El plasminógeno promueve la reparación de la capacidad de respuesta de los ratones diabéticos a la algesia

5 Se dividieron aleatoriamente ocho ratones db/db macho de 8 semanas de edad en dos grupos, cuatro en el grupo de control al que se administró PBS de vehículo y cuatro en el grupo al que se administró plasminógeno, respectivamente. El día en el que se inició el experimento se registró en el Día 0, y se pesaron y agruparon los ratones. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones durante 8 días consecutivos, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró PBS de vehículo se les administró un volumen igual de PBS. Los días 0, 3, 6 y 9 después de la administración de plasminógeno, se detectó la sensibilidad de los animales a las lesiones mecánicas usando filamentos de Von-Frey (Stoelting, USA). Con 2,0 g de fuerza como fuerza inicial, se detectó primero la pata izquierda. Si se producían 2 retiradas de la pata durante 5 estimulaciones, era positivo; y si era positivo, a continuación se estimulaba el pie derecho con una fuerza menor. Si era negativo, se estimulaba el pie derecho con una fuerza mayor; por tanto, se estimulaban alternativamente los pies izquierdo y derecho durante un total de 6 estimulaciones con un intervalo de estimulación de 5 minutos y, a continuación, se calculaba el umbral de retirada de la pata del 50% de acuerdo con el método introducido en S.R. Chaplan et. al. (1994)^[32].

20 Los ratones db/db se convirtieron en ratones diabéticos a alrededor de las 4 semanas, presentaron hiperalgnesia a las 8-12 semanas, y presentaron hipoalgnesia después de las 12 semanas^[45,46]. Por lo tanto, seleccionamos ratones db/db de 8 semanas en el periodo de hiperalgnesia para el experimento.

25 Los resultados mostraron que, en comparación con los ratones del grupo de control al que se le administra PBS de vehículo, los del grupo al que se administró plasminógeno presentaban un umbral de algnesia significativamente aumentado (Figura 20). Esto indicaba que el plasminógeno puede reducir significativamente la hiperalgnesia (hipersensibilidad) provocada por la lesión nerviosa en la diabetes mellitus temprana.

30 **Referencias:**

- [1] Md. Shahidul Islam, 2013. Animal Models of Diabetic Neuropathy: Progress Since 1960s. *Journal of Diabetes Research*.
- [2] Eizirik DL, Miani M, Cardozo AK. 2013. Signalling danger: Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Diabetologia* 56:234-241.
- [3] Said G. Diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3:331-40.
- [4] Vincent AM, Callaghan BC, Smith AL, Feldman EL. 2011. Diabetic neuropathy: Cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol* 7:573-583.
- [5] Alexander CM and Werb, Z. (1991). Extracellular matrix degradation. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*, Hay ED, ed. (NewYork: Plenum Press), pp. 255-302.
- [6] Werb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A., and Harris, E.D., Jr. (1977). Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *N. Engl.J. Med.* 296, 1017-1023.
- [7] He, C.S., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., and Goldberg, G.I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 2632-2636.
- [8] Stoppelli, M.P., Corti, A., Soffientini, A., Cassani, G., Blasi, F., and Assoian, R.K. (1985). Differentiation-enhanced binding of the amino-terminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 4939-4943.
- [9] Vassalli, J.D., Baccino, D., and Belin, D. (1985). A cellular binding site for the Mr 55, 000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J. Cell Biol.* 100, 86-92.
- [10] Wiman, B. and Wallen, P. (1975). Structural relationship between "glutamic acid" and "lysine" forms of human plasminogen and their interaction with the NH₂-terminal activation peptide as studied by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 50, 489-494.
- [11] Saksela, O. and Rifkin, D.B. (1988). Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126.
- [12] Raum, D., Marcus, D., Alper, C.A., Levey, R., Taylor, P.D., and Starzl, T.E. (1980). Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208, 1036-1037
- [13] Wall Jn P (1980). Biochemistry of plasminogen. In *Fibrinolysis*, Kline DL and Reddy KKN, eds. (Florida: CRC
- [14] Sottrup-Jensen, L., Zajdel, M., Claeys, H., Petersen, T.E., and Magnusson, S. (1975). Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A* 72, 2577-2581.
- [15] Collen, D. and Lijnen, H.R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78, 3114-3124.
- [16] Alexander, C.M. and Werb, Z. (1989). Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 974-982.

- [17] Mignatti, P. and Rifkin, D.B. (1993). Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73, 161-195.
- [18] Collen, D. (2001). Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. *Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 1-9.
- 5 [19] Rifkin, D.B., Moscatelli, D., Bizik, J., Quarto, N., Blei, F., Dennis, P., Flaumenhaft, R., and Mignatti, P. (1990). Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ. Dev.* 32, 313-318.
- [20] Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., and Duffy, M.J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 72,1-22.
- 10 [21] Rifkin, D.B., Mazziere, R., Munger, J.S., Noguera, I., and Sung, J. (1999). Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107, 80-85.
- [22] Cheng HT, Dauch J R, Hayes J M, Hong Y, Feldman EL. 2009. Nerve growth factor mediates mechanical allodynia in a mouse model of .
- [23] li M, Nishimura H, Kusano KF, Qin G, Yoon YS, Wecker A, Asahara T, Losordo DW. 2005. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation* 112:93-102.
- 15 [24] Kan M, Guo G, Singh B, Singh V, Zochodne DW. 2012. Glucagon-.
- [25] Sullivan KA, Hayes J M, Wiggin TD, Backus C, Su Oh S, Lentz SI, Brosius F 3rd, Feldman EL. 2007. Mouse models of diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis* 28:276-285.
- 20 [26] Wang L, Chopp M, Szalad A, Liu Z, Bolz M, Alvarez FM, Lu M, Zhang L, Cui Y, Zhang RL, Zhang ZG. 2011. Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice. *Neuroscience* 193: 399-410.
- [27] Marder V J, Novokhatny V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 8(3): 433-444.
- 25 [28] Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, et al. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one 'mini'-plasminogen (MW, 38, 000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis [J]. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, 1978, 3: 191-209.
- [29] Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, et al. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 1(2): 307-313.
- 30 [30] Hunt J A, Petteway J r S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3): 413-419.
- [31] Yoon Choi a, Young Wook Yoon a, Heung Sik Na , Sun Ho Kim , Jin MO Chung. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain | *Pain*, 59 (1994) 369-376.
- 35 [32] S.R. Chaplan, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, *Journal of Neuroscience Methods* 53 (1994) 55-63.
- [33] Jae Kyu Ryu, Mark A. Petersen, Sara G. Murray et al. Blood coagulation protein fibrinogen promotes autoimmunity and demyelination via chemokine release and antigen presentation. *NATURE COMMUNICATIONS*, 2015, 6:8164.
- 40 [34] Dimitrios Davalos, Katerina Akassoglou. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Seminars in Immunopathology*, 2012. 34(1):43-62.
- [35] Valvi D, Mannino DM, Mullerova H, et al. Fibrinogen, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and outcomes in two United States cohorts. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2012;7:173-82.
- 45 [36] Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, Chanvorachote P, Rojanasakul Y (2006). Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 downregulation. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 1062-1069.
- [37] Wang L, Chanvorachote P, Toledo D, Stehlik C, Mercer RR, Castranova V, Rojanasakul Y (2008). Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 73, 119-127.
- 50 [38] R. Langhorn and J.L. Willeisen. Cardiac Troponins in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med* 2016;30:36-50.
- [39] Zwart B, Ciurana C, Rensink I, Manoe R, Hack CE, et al. (2004) Complement activation by apoptotic cells occurs predominantly via IgM and is limited to late apoptotic (secondary necrotic) cells. *Autoimmunity* 37: 95-102.
- 55 [40] Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, et al. (2006) Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/ reperfusion injury. *J Immunol* 177: 4727-4734.
- [41] Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB (2002) I-PLA2 Activation during Apoptosis Promotes the Exposure of Membrane Lysophosphatidylcholine Leading to Binding by Natural Immunoglobulin M Antibodies and Complement Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 655-665.
- 60 [42] Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS (Jan 1955). Transaminase activity in human blood. *The Journal of Clinical Investigation*. 34(1): 126-31
- [43] Wang CS, Chang TT, Yao WJ, Wang ST, Chou P (Apr 2012). Impact of increasing alanine aminotransferase levels within normal range on incident diabetes. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*. 111 (4): 201-8.
- 65 [44] Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R: Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes* 2003, 52:1229-1234 |
- [45] Cheng HT, Dauch JR, Hayes JM, Hong Y, Feldman EL. 2009. Nerve growth factor mediates mechanical allodynia in a mouse model of .

[46] li M, Nishimura H, Kusano KF, Qin G, Yoon YS, WeckerA, Asahara T, Losordo DW. 2005. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation* 112:93-102.

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de plasminógeno para su uso en un método de reparación de lesiones nerviosas diabéticas en un sujeto, en donde el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la lesión nerviosa diabética comprende lesión del tejido nervioso y neuroinflamación.
- 15 3. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de plasminógeno para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno relacionado con una lesión nerviosa diabética en un sujeto, en donde el trastorno relacionado con una lesión nerviosa diabética se selecciona entre dolor de extremidades, hipoestesia, entumecimiento, ardor, frialdad y dolor neuropático diabético provocado por una lesión del sistema nervioso resultante de la diabetes mellitus, en donde el plasminógeno tiene por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N° 2, 6, 8, 10 o 12, y sigue teniendo la actividad del plasminógeno.
- 20 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el dolor neuropático diabético comprende dolor espontáneo, hipoalgesia e hiperalgesia inducidas por complicaciones diabéticas.
- 25 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el plasminógeno se administra sistémica o localmente.
- 30 6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el plasminógeno se administra en combinación con otros fármacos o terapias.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los otros fármacos o terapias comprenden fármacos neurotróficos, analgésicos, fármacos para el tratamiento de la diabetes mellitus, fármacos antiinfecciosos, fármacos antihipertensivos, fármacos antihiperlipidémicos y terapias físicas como terapia electromagnética y terapia infrarroja.

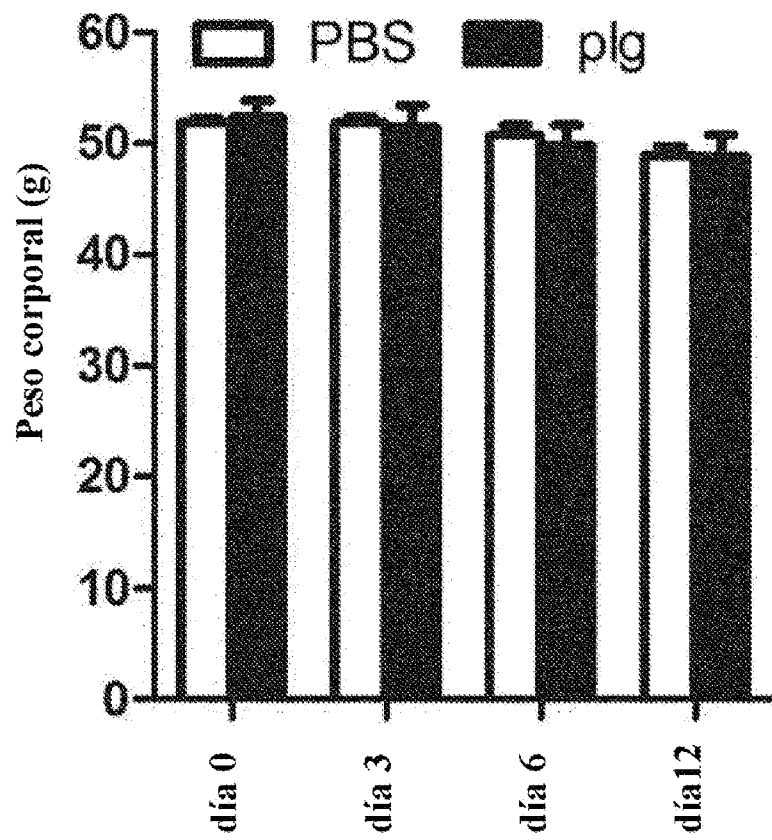


Figura 1

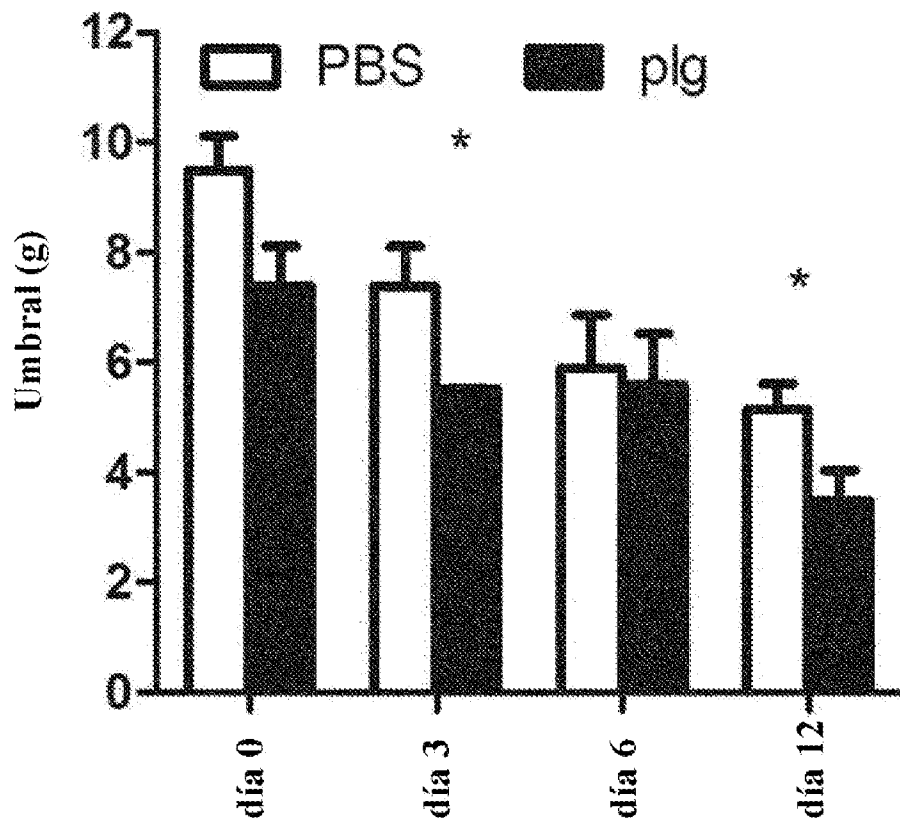


Figura 2

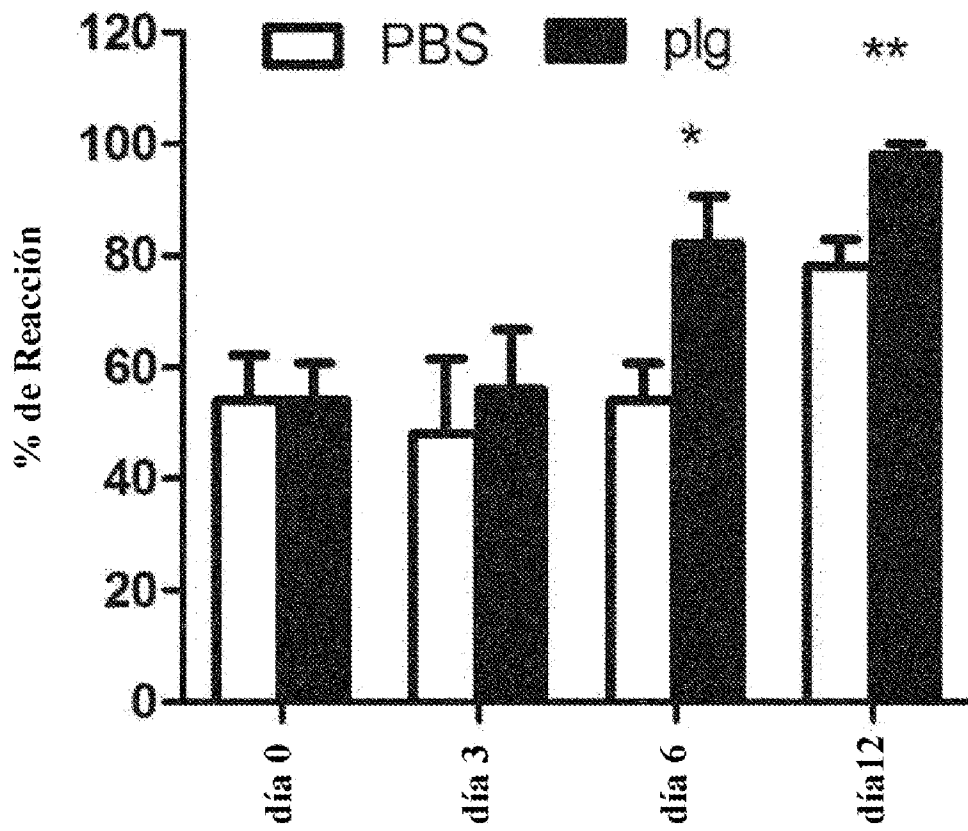


Figura 3

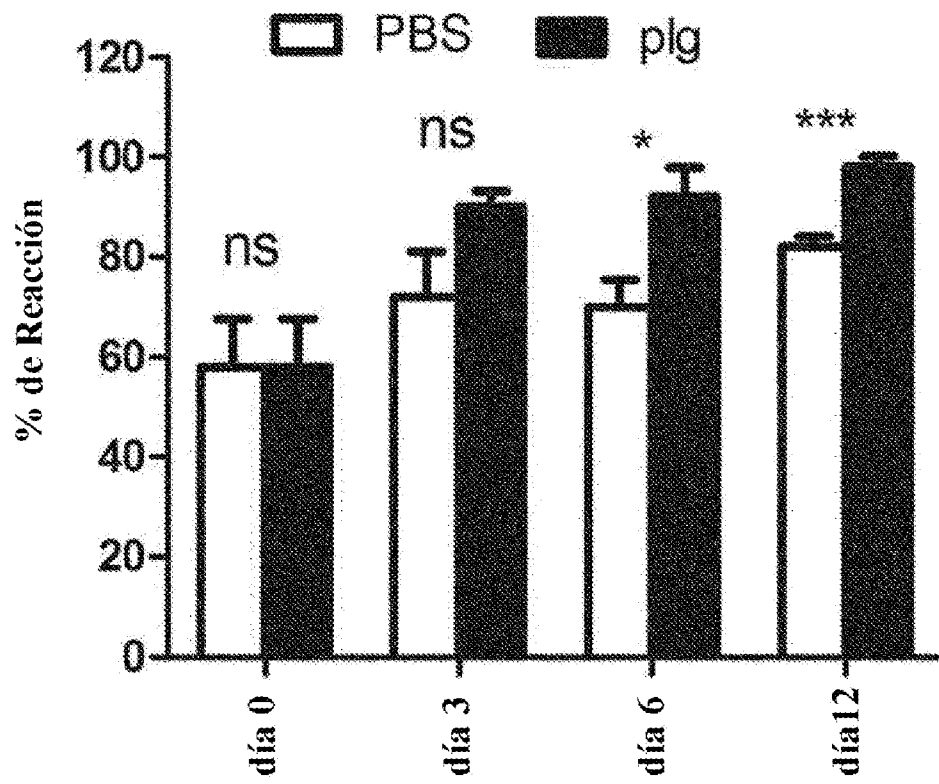


Figura 4

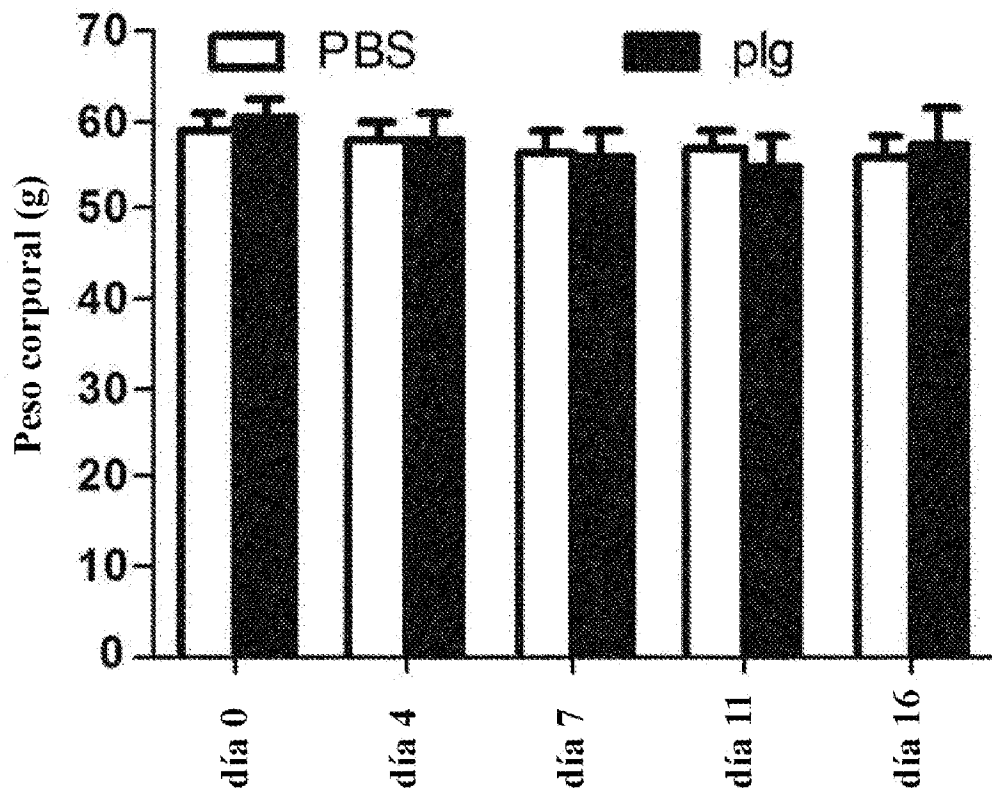


Figura 5

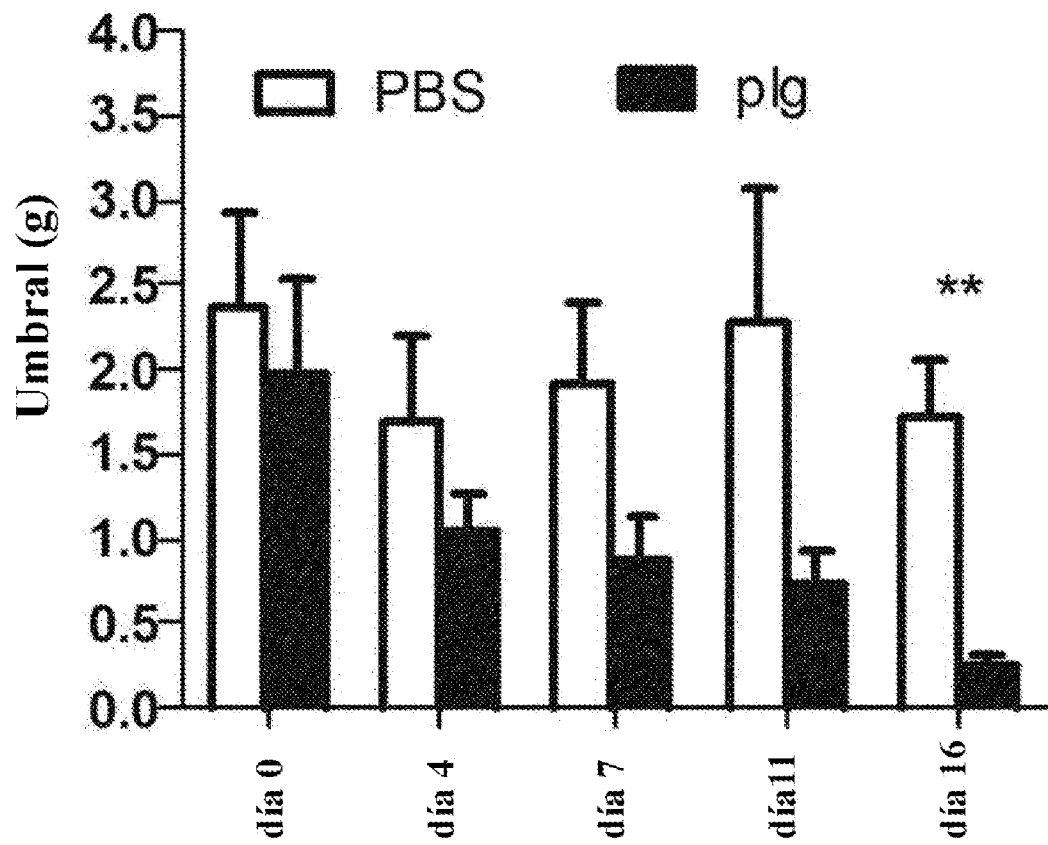


Figura 6

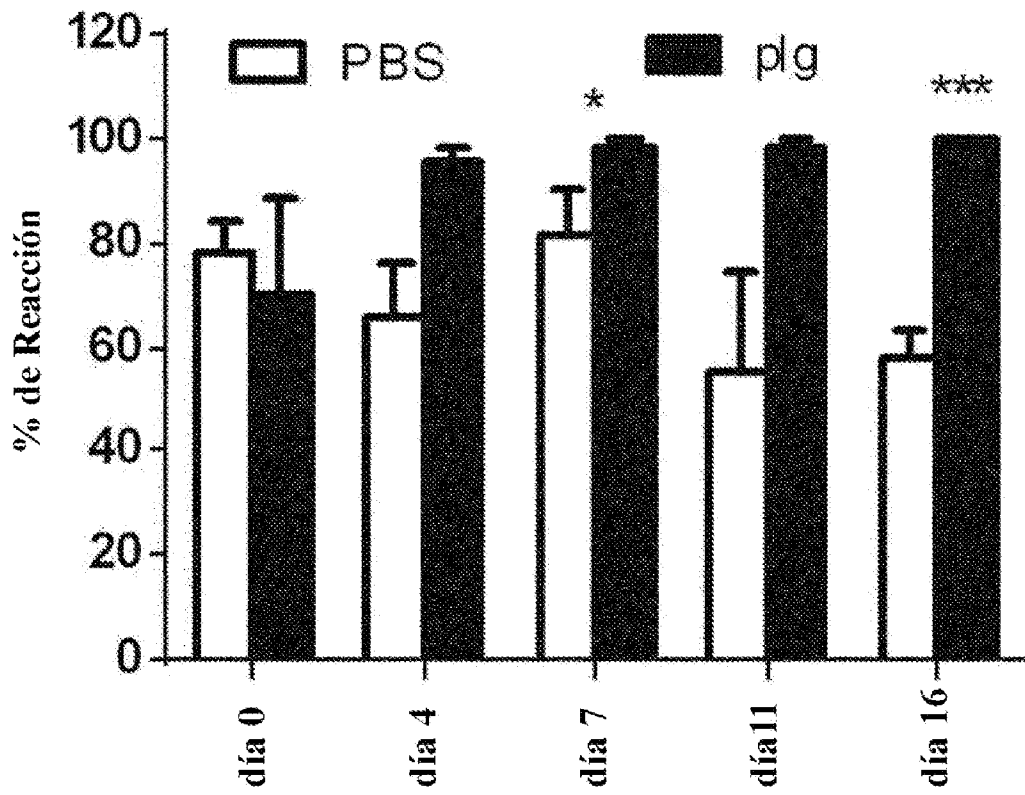


Figura 7

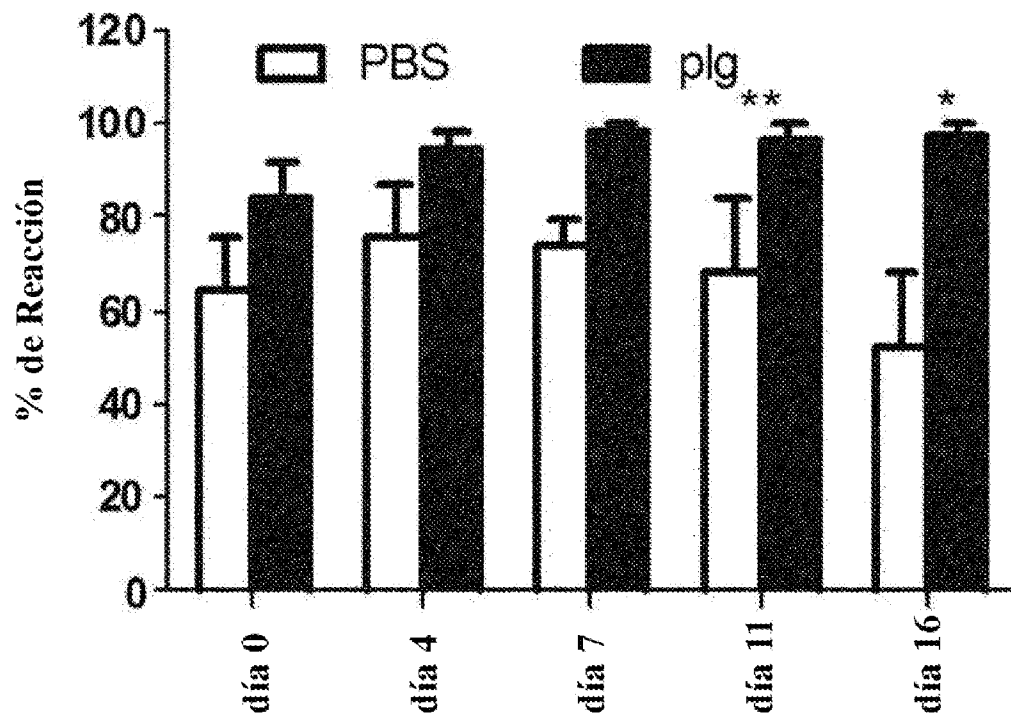


Figura 8

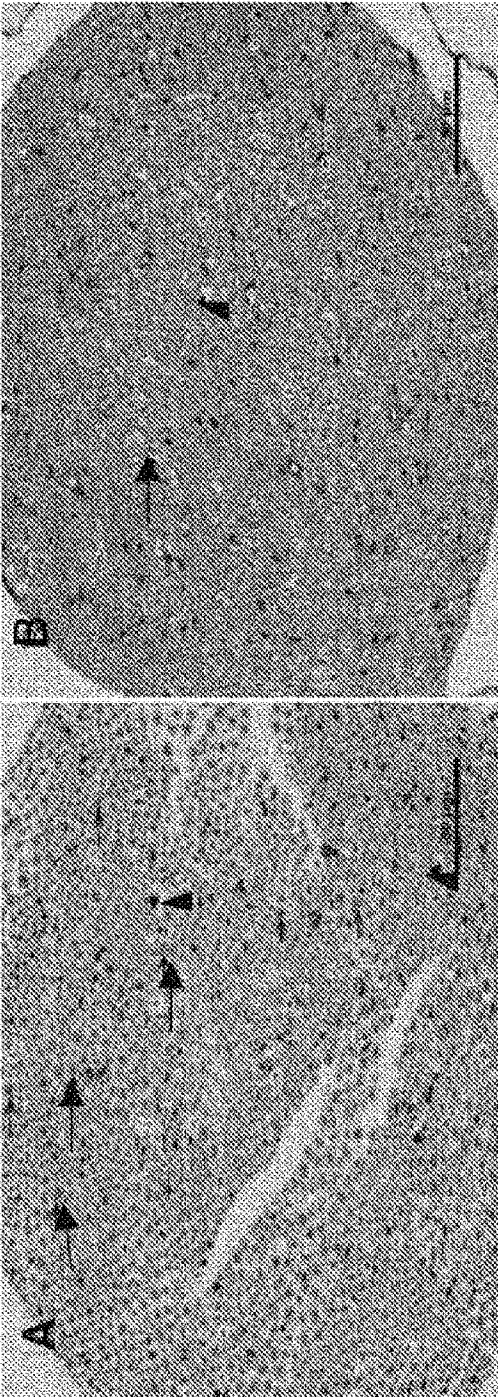


Figura 9

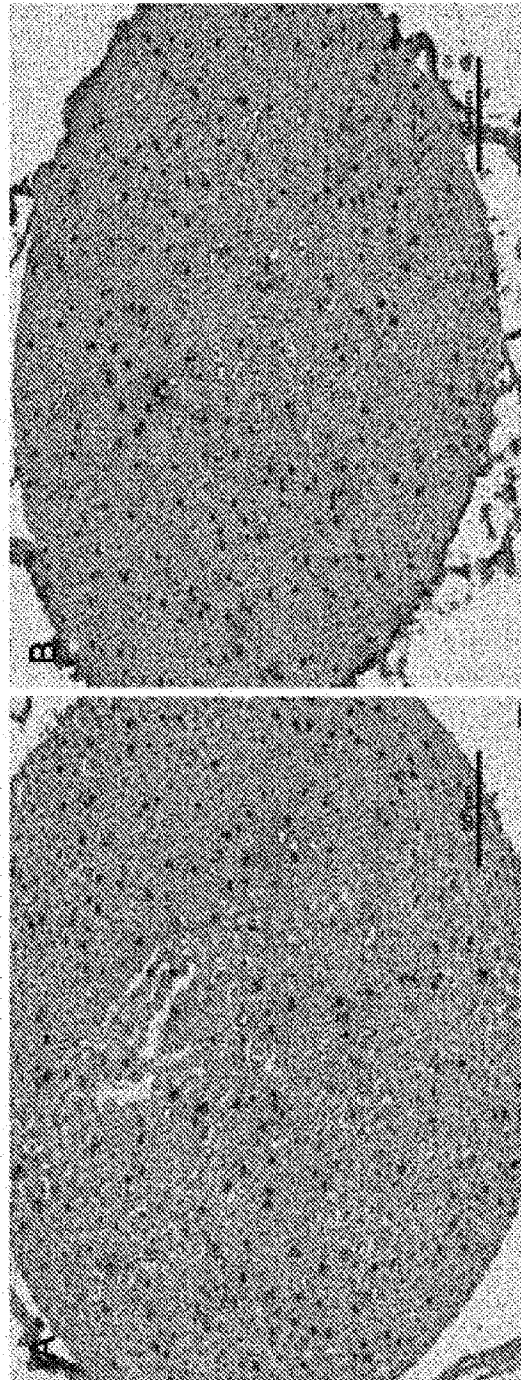


Figura 10

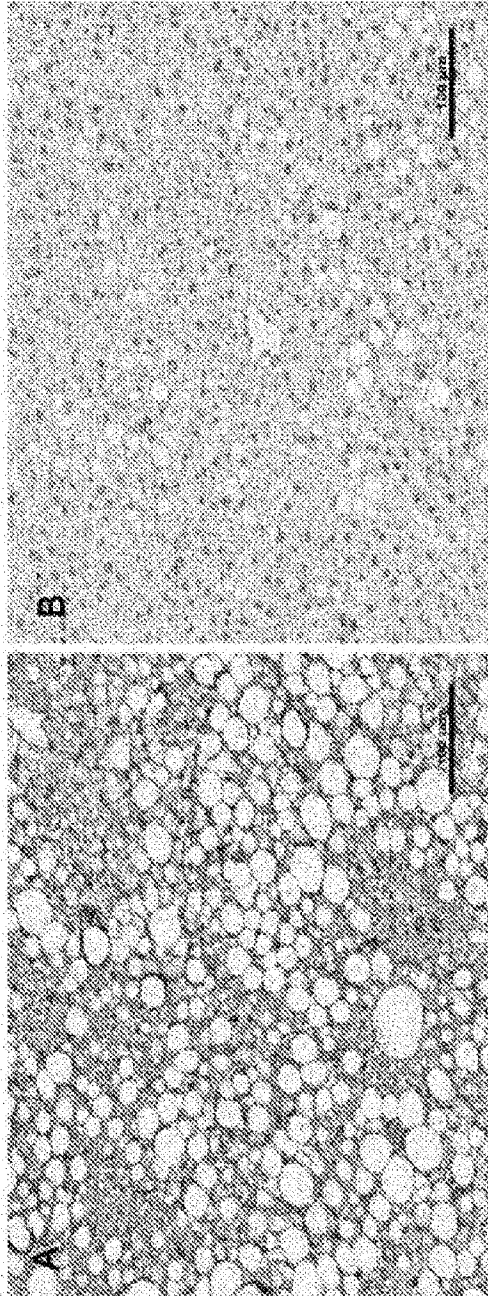


Figura 11

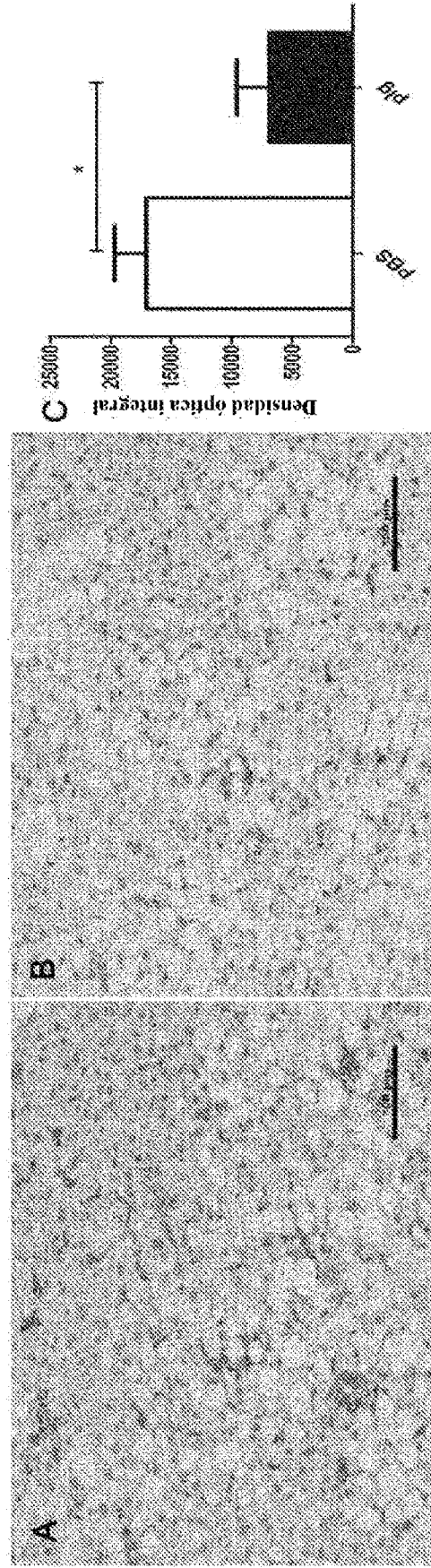


Figura 12



Figura 13

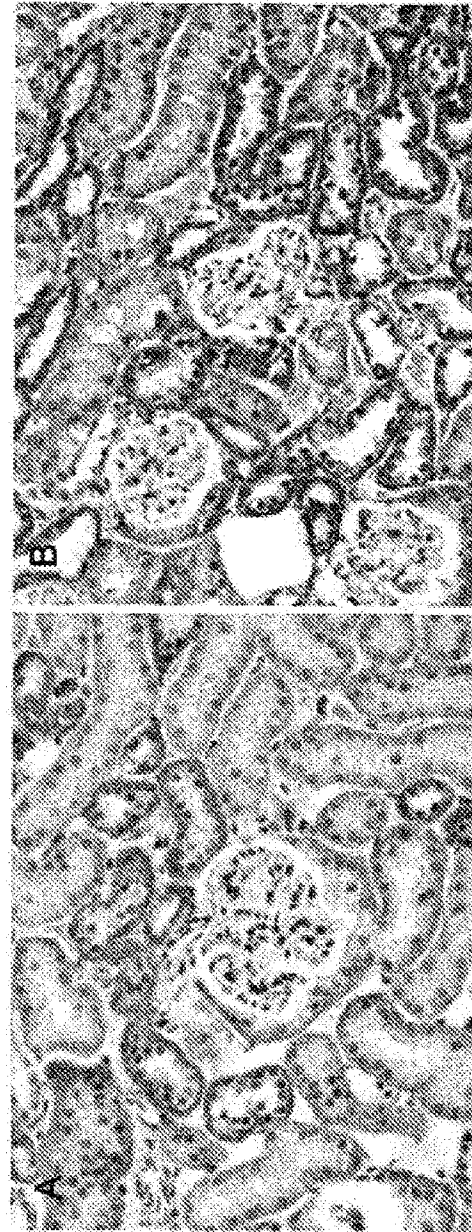
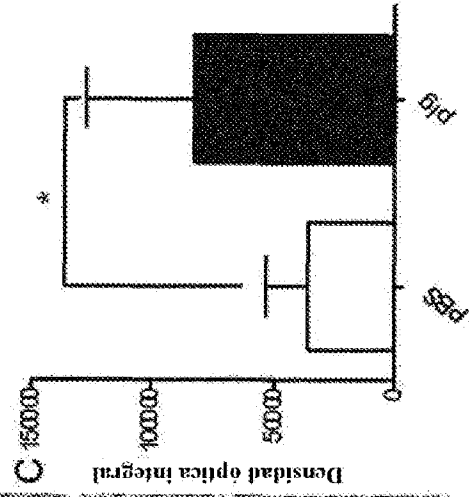


Figura 14



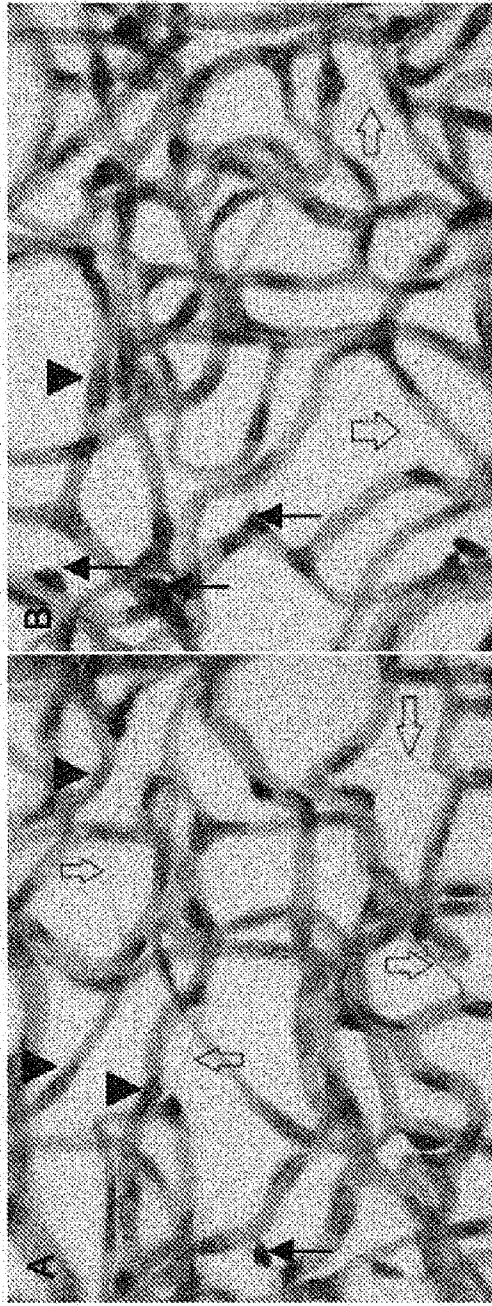
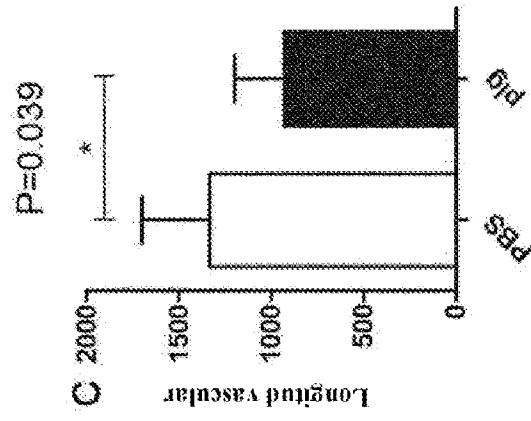


Figura 15

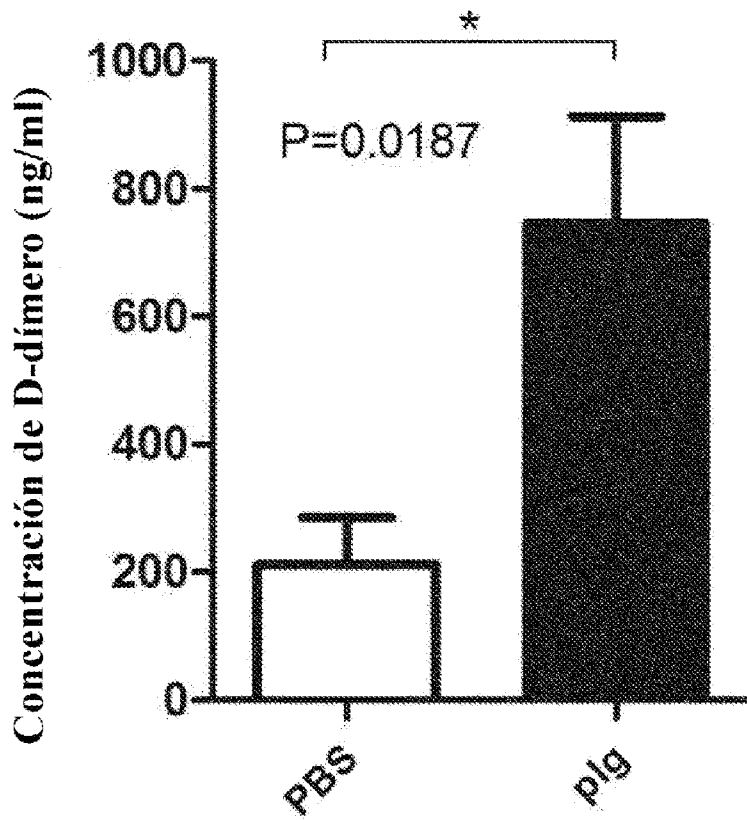


Figura 16

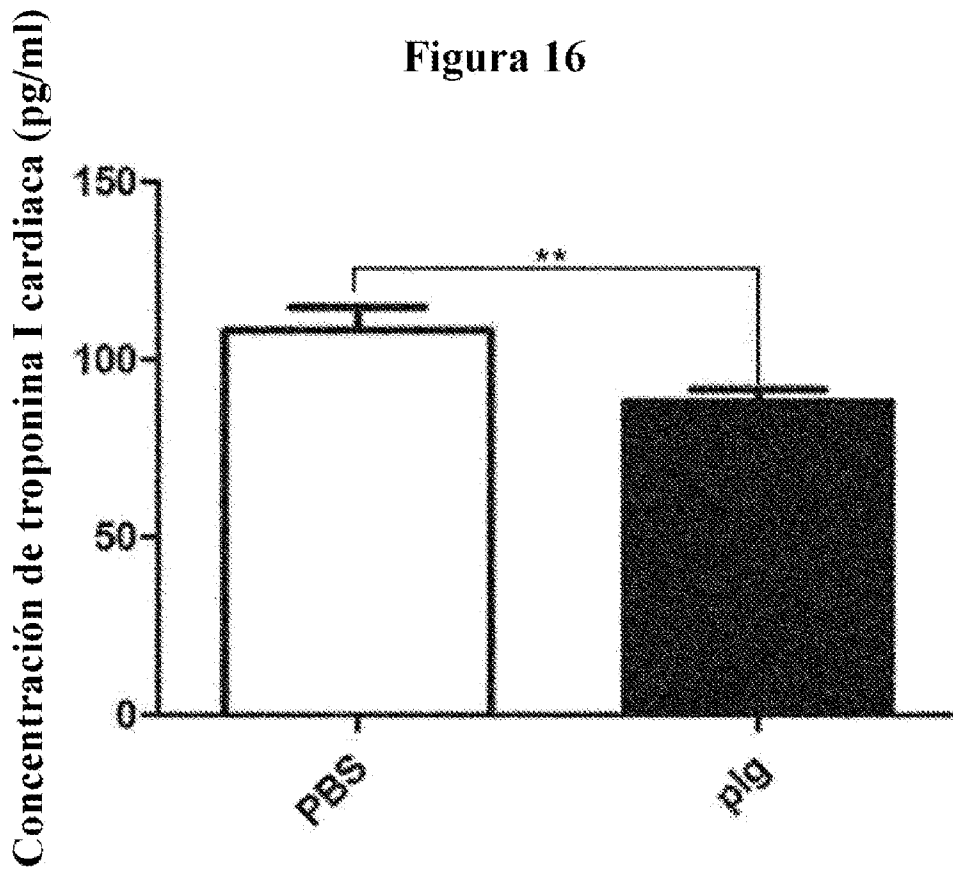


Figura 17

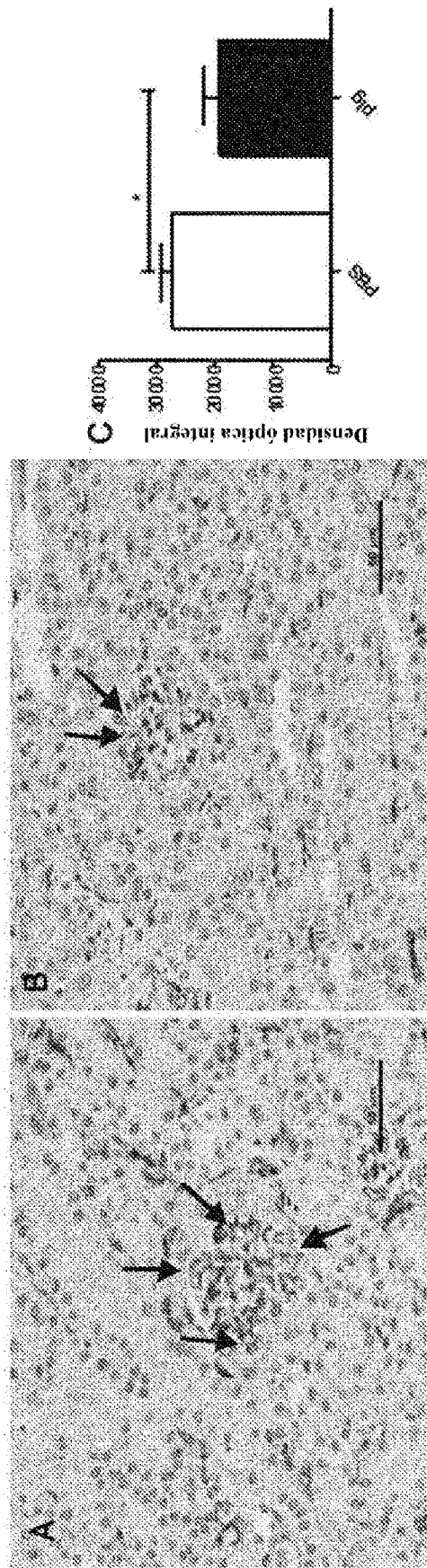


Figura 18

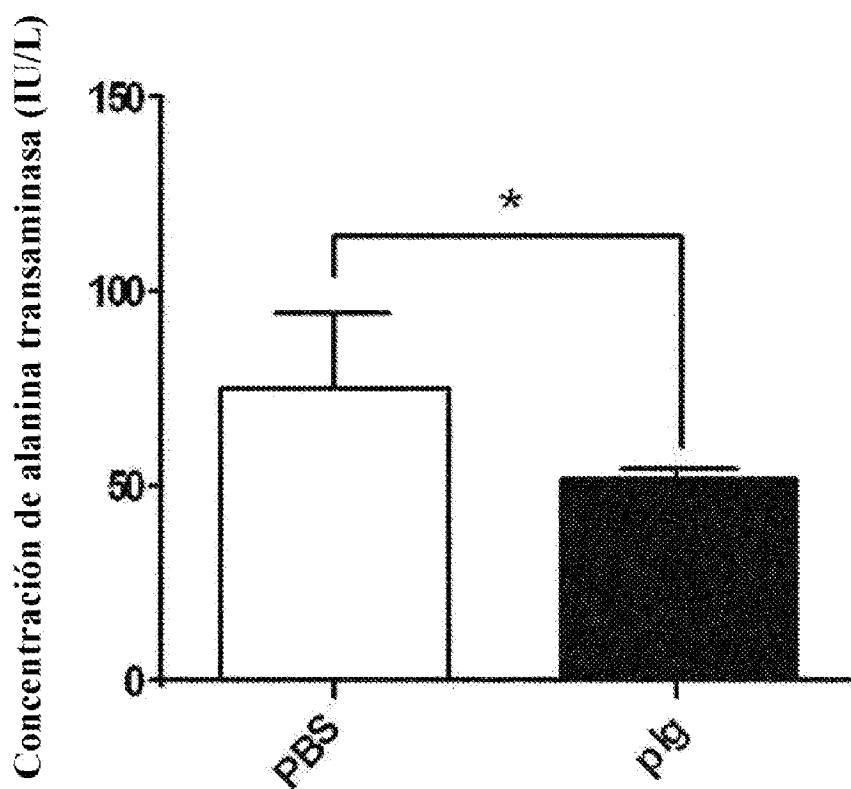


Figura 19

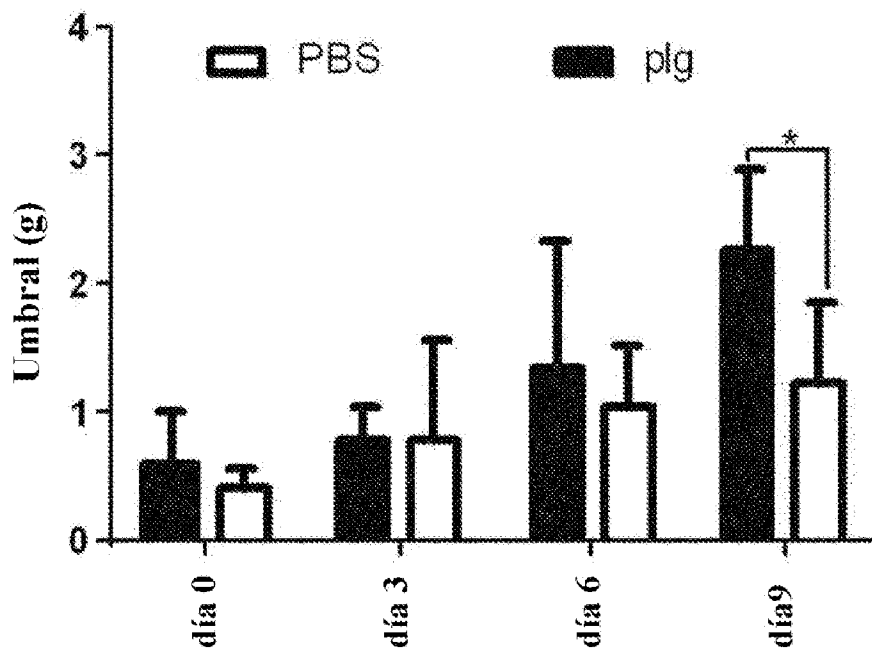


Figura 20