

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 965**

51 Int. Cl.:
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03812818 .7**
96 Fecha de presentación: **05.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1581254**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2005**

54 Título: **Composición que comprende una proteína plasmina truncada**

30 Prioridad:
06.12.2002 GB 0228409

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.04.2012

73 Titular/es:
ThromboGenics N.V.
Gaston Geenslaan 1
3001 Heverlee (Leuven), BE

72 Inventor/es:
PAKOLA, Steve y
DE SMET, Marc

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

ES 2 377 965 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

Composición que comprende una proteína plasmina truncada

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona generalmente métodos de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, en el ojo de un mamífero. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de una proteína plasmina truncada que comprende un dominio catalítico en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno o una complicación de un trastorno, en el ojo del mamífero.

Antecedentes de la invención

El ojo adulto humano es una esfera ligeramente asimétrica con un diámetro sagital aproximado de 24 a 25 mm, un diámetro transversal de 24 mm, y un volumen de aproximadamente 6,5 cc. El ojo humano se puede dividir en tres capas diferentes, concretamente, una capa externa, una capa intermedia y una capa interna. La capa externa del ojo consiste en la esclerótica, que se denomina a menudo como el "blanco del ojo", y la córnea, que cubre la parte frontal del ojo. La capa intermedia se divide en una porción anterior y una porción posterior; la porción anterior consiste en el iris pigmentado circular, las lentes del cristalino y el cuerpo ciliar, mientras que la porción posterior consiste en la capa coroide. La capa interna consiste en la retina, que es la parte sensorial del ojo. La retina es esencialmente una capa de tejido nervioso, que recorre toda la superficie posterior interior de la capa coroide y que se puede dividir en una parte óptica y una parte no óptica. La parte óptica, que participa en el mecanismo visual, contiene los bastoncillos y los conos que son los órganos efectivos de la visión.

El ojo humano se puede dividir también en tres cámaras. La cámara anterior entre la córnea y el iris, y la cámara posterior entre el iris y las lentes del cristalino, están llenas con un humor acuoso. En contraste, la cámara vítrea entre las lentes del cristalino y la retina está rellena con un líquido más viscoso, denominado vítreo (conocido también como el cuerpo vítreo o el humor vítreo). El humor vítreo en un ojo normal es un gel trasparente que ocupa aproximadamente un 80 % del volumen del globo ocular. La luz que entra en el ojo a través de la córnea, la pupila, y las lentes, se trasmite a través del vítreo a la retina.

El humor vítreo de un ojo humano normal es un gel que tiene, de manera grosera, un 99 % de agua y un 1 % de macromoléculas. Estas macromoléculas incluyen una red de fibrillas de colágeno, ácido hialurónico, glicoproteínas solubles, azúcares y otros metabolitos de bajo peso molecular. El colágeno de tipo II es el colágeno fibrilar principal del vítreo, pero el vítreo contiene también colágeno de los tipos V, IX, y XI. La porción posterior del cuerpo vítreo, la superficie hialoide posterior (conocida también como la corteza vítrea posterior), está en contacto directo con la superficie retinal interna más prominente en la base vítrea, el disco óptico, y a lo largo de los vasos retinales mayores. La adhesión normal del vítreo a la retina se realiza por las interacciones celulares y moleculares que aparecen entre la corteza vítrea posterior y la membrana limitante interna (ILM) de la retina. La ILM es esencialmente la membrana basal de las células de Mueller retinales. La ILM contiene colágeno de los tipos I y IV, glicoproteínas tales como la laminina y la fibronectina y otros glicoconjugados. Se cree que estos componentes establecen puentes y uniones de las fibras de colágeno entre el vítreo y la ILM.

Con la edad, el humor vítreo cambia de gel a líquido y de esta manera, gradualmente se contrae y se separa de la ILM de la retina. Este proceso se conoce como "desprendimiento posterior del vítreo" (PVD) y es algo que sucede habitualmente después de los 40 años. Sin embargo, se pueden inducir cambios degenerativos en el vítreo debidos a dolencias patológicas tales como diabetes, enfermedad de Eale y uveítis. Análogamente, el PVD puede aparecer más pronto en personas miopes y en aquellas que se han sometido a cirugía de cataratas. Normalmente, el vítreo experimenta una rotura limpia de la retina. Ocasionalmente, sin embargo, el vítreo se adhiere estrechamente a la retina en algunos lugares. Estos pequeños focos de uniones resistentes anormalmente firmes del vítreo pueden transmitir importantes fuerzas de tracción desde el vítreo a la retina en el sitio de unión. Esta persistente sensación de tracción del vítreo da a menudo como resultado desgarros en la retina con forma de herradura. A no ser que se reparen los desgarros retinales, el fluido vítreo puede filtrarse a través de este desgarro en o por debajo de la retina y producir un desprendimiento de la retina, una dolencia muy grave que compromete la visión. Además, la unión persistente entre el vítreo y la ILM puede dar como resultado un sangrado que se produce por la ruptura de vasos sanguíneos, lo que da como resultado el enturbiamiento y la opacificación del vítreo.

El desarrollo de un PVD incompleto influye sobre muchas enfermedades vitreoretinales entre las que se incluyen el síndrome de tracción vitreomacular, la hemorragia del vítreo, agujeros maculares, edema macular, retinopatía diabética, maculopatía diabética y desprendimiento de la retina. De esta manera, una importante meta de la cirugía vítrea es separar el vítreo de la retina de una manera que evite la tracción del vítreo.

Con el fin de retirar el vítreo del ojo, se lleva a cabo normalmente un procedimiento microquirúrgico denominado vitrectomía. En este procedimiento se elimina el vítreo del ojo con un dispositivo de corte en miniatura manipulado manualmente, mientras que de manera simultánea se sustituye el vítreo eliminado con solución salina para evitar el colapso del ojo. La retirada quirúrgica del vítreo usando este método depende mucho de la habilidad, y la retirada

completa del vítreo cortical sigue siendo una tarea difícil. Además, la vitrectomía mecánica lleva aparejada el riesgo de complicaciones tales como, la cicatrización, el lagrimeo y otros daños a la retina. Obviamente, dicho daño es muy indeseable y puede comprometer la visión del paciente tras la cirugía.

5 De esta manera, la investigación reciente se ha centrado en métodos alternativos para eliminar el vítreo de la retina. Dichos métodos han explorado el uso de enzimas y sustancias químicas que se pueden usar para inducir/promover la licuefacción del vítreo y/o el desprendimiento de la interfase vitreoretinal (PVD). Estas soluciones, que se denominan como "vitrectomía farmacológica", han incluido algunas enzimas proteolíticas tales como la alfa-quimotripsina, la hialuronidasa, la colagenasa bacteriana, la condroitinasa y la dispasa, que se han inyectado
10 intravítreamente en ensayos experimentales y/o clínicos para inducir el PVD. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no liberan el hialoide posterior de la ILM de una manera completa o exenta de complicaciones. Adicionalmente, en algunos de estos casos, el riesgo de reacciones adversas es elevado. Por ejemplo, el uso de proteasas bacterianas en sistemas mamíferos genera una respuesta inmune que conduce a la vitreoretinopatía proliferativa, que da como resultado una redensificación del complejo retinal. Se ha informado de la colagenasa para licuificar el vítreo, pero también se ha demostrado que perturba las capas externas de la retina. Finalmente, se ha informado que la alfa-quimotripsina produce toxicidad en la capa interna de la retina 15 minutos después de la inyección. Dependiendo de la concentración de la dispasa usada, se pueden desarrollar tanto retinopatía proliferativa como membranas celulares epirretinales en los ojos inyectados.

20 Dadas la inmunogenicidad y otros efectos adversos de las proteasas bacterianas, puede ser deseable la vitreolisis farmacológica usando proteasas endógenas derivadas de ser humano. La plasmina es una serina proteasa derivada de plasminógeno. El plasminógeno es un importante componente de la sangre de los mamíferos. El plasminógeno humano es una glicoproteína monocatenaria que consiste en 791 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 92.000 daltons (véase Forsgren M. y col., FEBS Lett. 213 (2): 254-60, 1987). El plasminógeno
25 natural con un ácido glutámico aminoterminal (denominado "plasminógeno Glu") se convierte mediante digestión limitada por plasmina de los enlaces peptídicos Arg₆₈-Met₆₉, Lys₇₇-Lys₇₈, o Lys₇₈-Val₇₉ en las proteínas comúnmente designadas como "plasminógeno Lys". La activación del plasminógeno mediante activadores del plasminógeno tales como uroquinasa o estreptoquinasa escinde el enlace peptídico entre la Arg₅₆₁ y la Val₅₆₂, convirtiendo la molécula de plasminógeno en una molécula bicatenaria, la forma enzimáticamente activa denominada plasmina. La plasmina
30 contiene dos polipéptidos, una cadena A pesada conectada por dos enlaces disulfuro a una cadena B ligera; la cadena B contiene el dominio catalítico de la serina proteasa. Se ha implicado la actividad catalítica de la serina proteasa de la plasmina en su capacidad para disolver los coágulos de sangre *in vivo*.

Recientemente se ha sugerido la plasmina como un auxiliar en la vitrectomía. Además, se ha sugerido la enzima plasmina autóloga (APE) como agente para la vitrectomía farmacológica. Sin embargo, existen algunas desventajas asociadas con el uso de la plasmina. En primer lugar, hasta el momento, todas las intervenciones clínicas con plasmina se han basado en el uso de la APE, cuyo aislamiento implica un proceso laborioso y que consume tiempo, que implica la extracción de sangre de un paciente, el aislamiento del plasminógeno, la activación del plasminógeno aislado a plasmina, y el ensayo de purificación y esterilidad de la enzima plasmina. Además, este procedimiento
40 puede ser costoso y la presencia de patógenos transmitidos a través de la sangre puede complicar adicionalmente este procedimiento. Igualmente, la plasmina es muy propensa a la degradación y de esta manera, no se puede almacenar durante periodos prolongados antes de su uso. Una desventaja adicional es el elevado peso molecular de la plasmina, que varía entre 65.000 y 83.000 daltons. De esta manera, la difusión de grandes moléculas de tipo plasmina desde su posición inyectada en el vítreo a la interfase vitreoretinal podría quedar obstaculizada en comparación con moléculas más pequeñas.

De acuerdo con esto, existe una necesidad en la técnica de un método de tratamiento o prevención de trastornos, o complicaciones de trastornos, para el ojo de un sujeto que superen las desventajas de la plasmina en la vitreolisis farmacológica. Específicamente, existe necesidad de métodos de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo que usen moléculas más pequeñas que la plasmina, que puedan difundirse a través del vítreo hasta la interfase vitreoretinal más rápidamente que la plasmina, y que se puedan obtener fácilmente en grandes cantidades sin el retraso y otros problemas pendientes como el aislamiento de la enzima plasmina autóloga de cada paciente individual.

55 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, en el ojo de un sujeto tal como se define en la reivindicación 1 usando una composición que comprende una proteína plasmina truncada que comprende un dominio catalítico de plasmina (TPCD). En una realización, se
60 selecciona un TPCD entre el grupo que consiste en miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada, microplasmina estabilizada recombinante, variantes de microplasmina y cualquiera de sus combinaciones.

65 La presente invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, en el ojo de un sujeto, poniendo en contacto un vítreo y/o un humor acuoso del sujeto con una

composición que comprenda un TPCD, en el que el trastorno del ojo se selecciona entre, desprendimiento de retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia del vítreo diabética, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambiopía, endoftalmitis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa y cualquiera de sus combinaciones. Los métodos de la invención se pueden practicar independientemente de la vitrectomía, o como un auxiliar a la vitrectomía.

La presente invención proporciona también métodos de tratamiento o prevención de un trastorno del ojo, o una complicación de un trastorno del ojo, de un sujeto definido en la reivindicación 9 que comprende administrar al sujeto una composición que comprende al menos dos TPCD. En una realización de este aspecto de la invención, se va a administrar a un sujeto una composición mediante la puesta en contacto de un vítreo y/o un humor acuoso con una composición que comprenda al menos dos TPCD.

La presente invención proporciona además métodos de tratamiento o prevención de un trastorno del ojo, o una complicación de un trastorno del ojo tal como se define en la reivindicación 9 que comprende proporcionar a un sujeto una primera composición que comprende al menos un TPCD y una segunda composición que comprende al menos un TPCD. En una realización de este aspecto de la invención, una primera composición que comprende al menos un TPCD y una segunda composición que comprende al menos un TPCD se van a proporcionar a un sujeto mediante la puesta en contacto con un vítreo y/o un humor acuoso. En otra realización de este aspecto de la invención, los TPCD de la primera composición que comprende al menos un TPCD y de la segunda composición que comprende al menos un TPCD son el mismo TPCD. En otra realización más de este aspecto de la invención, los TPCD de la primera composición que comprenden al menos un TPCD y de la segunda composición que comprende al menos un TPCD son TPCD diferentes. En una realización adicional de este aspecto de la invención, la primera composición que comprende al menos un TPCD y la segunda composición que comprende al menos un TPCD son para administrarse a un sujeto sustancialmente en el mismo momento. En otra realización más, la primera composición que comprende al menos un TPCD y la segunda composición que comprende al menos un TPCD son para administrarse a un sujeto en momentos diferentes.

La presente invención proporciona adicionalmente métodos de tratamiento o prevención de un trastorno en el ojo, o una complicación de un trastorno en el ojo, tal como se define en la reivindicación 1, de un sujeto mediante la administración al sujeto de una composición que comprende al menos un TPCD y al menos un segundo agente. Un segundo agente incluye cualquier sustancia que es útil, sola o en combinación con un TPCD, en el tratamiento o la prevención de un trastorno en el ojo o una complicación de un trastorno del ojo. Un segundo agente incluye cualquier sustancia que es útil tanto sola como en combinación con un TPCD, en el tratamiento o la prevención de un trastorno del ojo o una complicación de un trastorno del ojo. Un segundo agente incluye, sin limitación, hialuronidasa, dispasa, condroitinasa, colagenasa, péptidos que contienen RGD, anticuerpo dirigido contra integrina, urea, hidroxurea, tiourea, agonistas del receptor P2Y, y cualquier inhibidor angiogénico que incluye, pero no se limita a, inhibidores de VEGF e inhibidores de PIGF.

La presente invención proporciona también métodos de tratamiento o prevención de un trastorno en el ojo, o una complicación de un trastorno del ojo, tal como se define en la reivindicación 1, de un sujeto administrando al sujeto una composición que comprende al menos un TPCD antes de o después de la administración de una composición que comprende un segundo agente.

Los métodos de la invención se pueden usar para tratar o prevenir un trastorno en el ojo, o una complicación de un trastorno del ojo, de un sujeto, efectuando uno o más de los resultados entre los que se incluyen, pero no se limitan a, reducción de la viscosidad del vítreo, licuado del vítreo, inducción del desprendimiento posterior del vítreo, aclaramiento o reducción de la sangre hemorrágica en el vítreo y/o el humor acuoso, aclaramiento o reducción de las sustancias intraoculares extrañas del vítreo y/o el humor acuoso, aclaramiento o reducción de los materiales tóxicos en la retina, aumento de la difusión de un agente o una composición administrada al vítreo y/o al humor acuoso, reducción de la neovascularización extrarretinal y cualquiera de sus combinaciones.

La presente invención proporciona también métodos para llevar a cabo una vitrectomía que comprenden poner en contacto el vítreo de un sujeto con una composición que comprende un TPCD. La etapa de puesta en contacto se lleva a cabo antes de o al mismo tiempo que la vitrectomía o de manera independiente de la vitrectomía.

La presente invención proporciona también una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 32 que comprende al menos dos TPCD.

La presente invención proporciona además una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 25 que comprende al menos un TPCD y al menos un segundo agente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 proporciona las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 9) y aminoácidos (SEQ ID NO: 10) del plasminógeno

humano.

La figura 2 proporciona las secuencias de ADN (SEQ ID NO: 3) y aminoácidos (SEQ ID NO: 4) del plasminógeno humano.

5 La figura 3 proporciona las secuencias del ADN (SEQ ID NO: 7) y aminoácidos (SEQ ID NO: 8) del plasminógeno humano.

10 La figura 4 muestra el efecto del tratamiento con microplasma en ojos de porcino. El panel A es una imagen con poco aumento (11X) de la parte periférica intermedia de la retina después de la deshidratación lenta de un ojo de porcino tratado con 0,125 mg de microplasma en 0,1 ml de BSS PLUS® durante 120 minutos. En el centro de esta imagen hay una hebra vítrea. Es probable que esta hebra vítrea sea el vítreo que ha colapsado sobre la superficie retinal. La mayor parte de la superficie retinal está exenta del vítreo tal como se muestra en los paneles restantes. El panel B muestra una zona de la retina desnuda adyacente a un vaso sanguíneo (aumento 800X). Se observan pocas células sobre la superficie de la retina. La superficie irregular es la del propio vaso. Los paneles C y D son aumentos de la zona retinal de B a 1200X y 3600X aumentos respectivamente que muestran una superficie retinal uniforme desprovista en gran parte de vítreo o material celular. A 3600x solo son visibles unas pocas hebras de fibrillas. El panel E es una imagen a un aumento de 1500x que muestra esencialmente los mismos hallazgos que en el panel C en una localización retinal más central, mientras que el panel F muestra el revestimiento de estructura granular del vítreo, que ha perdido su estructura fibrilar. La apariencia de la estructura del vítreo en los ojos tratados con microplasma es muy diferente en comparación con el vítreo en los ojos del control (no se muestran los datos).

20 La figura 5 muestra que los procesos ciliares en el ojo de porcino están intactos después de 120 minutos de tratamiento con microplasma (paneles A y B).

25 La figura 6 proporciona micrografías de barrido de electrones (aumento de 3600x) de la interfase vitreoretinal en ojos humanos postmortem. La inyección intravitreal de 62,5 µg de microplasma dio como resultado el desprendimiento posterior del vítreo (PVD) que dejó vestigios discontinuos de fibrillas de colágeno que cubrían la ILM (panel A). 125 µg (panel B) y 188 µg (panel C) de microplasma produjeron PVD completo y una ILM desnuda. El panel D muestra la compresión de las fibrillas de colágenos hacia la ILM en un ojo tratado con 62,5 µg de microplasma y gas. El panel E muestra un PVD completo tras el tratamiento con 125 µg de microplasma y gas. A diferencia del PVD observado en ojos tratados con microplasma, existe una densa red de fibrillas de colágeno en el ojo del control (panel F).

30 La figura 7 proporciona micrografías de transmisión electrónica de la ILM en ojos humanos post-mortem. Señalar la ausencia de fibrillas de colágeno (flechas) en la ILM de ojos tratados con microplasma (panel A, aumento 13.600X). En contraste, las fibrillas de colágeno están todavía presentes (flechas) en la ILM en el ojo del control (panel B; aumento de 6800X).

40 La figura 8 presenta micrografías de barrido de electrones (aumento de 3600X) de la interfase vitreoretinal en ojos de gato. La inyección intravitreal de 25 µg de microplasma deja vestigios de fibrillas de colágeno en la ILM un día después del tratamiento (panel A). Tres días después del tratamiento, 25 µg de microplasma dieron como resultado un PVD completo (panel B). Se observaron vestigios de fibrillas de colágeno tres días después del tratamiento con 14,5 µg de microplasma (panel C). Se observó una ILM desnuda tres semanas después de la inyección de 14,5 µg de microplasma (panel D) y 25 µg de microplasma (panel E). En espectacular contraste, el ojo del control mostró un denso vítreo cortical unido (panel F).

45 La figura 9 presenta los resultados de los estudios con microscopio óptico de secciones semifinas de ojos de gato. Estos estudios mostraron que la citoarquitectura normal de la retina observada en los ojos del control (panel B) se observó también en ojos tratados con microplasma (panel A). El microscopio de transmisión electrónica desveló una retina interna y una ILM bien preservadas en ojos tratados con microplasma (paneles C y E) tal como se observó en los ojos del control (paneles D y F). El aumento usado para los paneles A y B fue de 250X; el aumento para los paneles C y D fue de 6000X; mientras que el aumento para los paneles E y F fue de 30.000X.

50 La figura 10 presenta los resultados de un microscopio confocal de barrido de laser con sondas de proteína ácida fibrilar glial (paneles A y B, verde) y vimentina (paneles C y D, rojo). No existe diferencia en la tinción de la GFAP y la vimentina entre los ojos tratados con microplasma (paneles A y C) y los ojos del control (paneles B y D). La inmunohistoquímica de doble marca con sondas de sinaptofisina (verde) y neurofilamentos (rojo) no muestra también diferencias entre los ojos tratados con microplasma (panel E) y los ojos del control (panel F). El aumento para los paneles A, B y C fue de 400x; el aumento para el panel D fue de 250x; y el aumento para los paneles E y F fue de 160x.

60 La figura 11 presenta una función de correlación del tiempo (TCF) del vítreo completo de porcino en comparación con una disolución de 20 nm de nanoesferas de poliestireno. En el vítreo existen dos componentes de la curva. El componente temprano (rápido) se debe a la presencia de hialuronano (HA) que se difunde libremente y presenta un

65

considerable movimiento molecular (Browniano). El componente tardío (lento) se debe al colágeno, que es más grande y que se difunde con menos libertad (más rígido), dando como resultado un movimiento Browniano más lento. En contraste, la disolución de nanoesferas de poliestireno tiene solo un componente (monodisperso) que es muy rápido debido al pequeño tamaño de las nanoesferas y su estructura perfectamente esférica que permite movimientos muy rápidos en la disolución.

La figura 12 presenta funciones normalizadas de correlación del tiempo de ojos de 5 porcinos que experimentan vitreolisis farmacológica con microplasma (μ Pli) a diferentes dosis y una disolución de 20 nm de nanoesferas de poliestireno. Se llevaron a cabo las medidas de DLS en el eje óptico, 4 mm por debajo de la interfase aire/vítreo. En el vítreo sin tratar (vehículo) existen dos componentes de la curva. El componente temprano (rápido) se debe a la presencia de hialuronano (HA) que se difunde libremente y presenta considerable movimiento molecular (Browniano). El componente tardío (lento) se debe al colágeno, que es más grande y se difunde con menos libertad (más rígido), dando como resultado un movimiento Browniano más lento. En el otro extremo, la disolución de nanoesferas de poliestireno tiene solo un componente (monodisperso) que es muy rápido debido al pequeño tamaño de las nanoesferas y su estructura perfectamente esférica que permite movimientos muy rápidos en la disolución. Con dosis crecientes de μ Pli existe una disminución en la pendiente de la TFC con la desaparición del componente lento (especies moleculares más grandes) acercándose definitivamente la TCF de las nanoesferas 20 nm puras, es decir, todas las especies de tamaño molecular más pequeño.

La figura 13 presenta fotografías representativas de ojos de porcino tras la inyección de microplasma y fluoresceína. Ambas imágenes son del mismo ojo, con la imagen derecha capturada después de la imagen izquierda, demostrando la difusión de la fluoresceína en el vítreo.

La figura 14 presenta fotografías representativas de ojos de porcino tras la inyección de plasma y fluoresceína. Ambas imágenes son del mismo ojo, con la imagen de la parte inferior capturada 20 minutos después de la imagen de la parte superior, demostrando la difusión de la fluoresceína en el vítreo en un grado inferior que el observado con los ojos tratados con microplasma (figura 13).

Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción detallada y los ejemplos que la acompañan se proporcionan con el fin de describir y explicar solo algunas realizaciones preferidas de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención de ninguna manera. A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen los mismos significados que entiende una persona normalmente experta en la materia a la cual esta invención pertenece.

Antes de definir la invención en detalle, puede ser de utilidad una comprensión de la misma que muestre las definiciones de algunos términos que se usarán a partir de ahora en la presente memoria descriptiva.

Definiciones

“Tratamiento” significa la reducción o mejora de cualquier trastorno médico en cualquier extensión, e incluye, pero no requiere, una completa cura del trastorno.

“Prevención” significa defender o proteger frente al desarrollo de un trastorno, es decir, para funcionar como un profiláctico.

“Trastorno” significa cualquier enfermedad, disfunción, síndrome, dolencia, dolor, o cualquiera de sus combinaciones. Trastorno incluye también cualquier complicación de cualquier enfermedad, disfunción, síndrome, dolencia, dolor o cualquiera de sus combinaciones.

“Sujeto” significa cualquier mamífero, particularmente un ser humano.

“Poner en contacto” significa cualquier modo de administración que de cómo resultado una interacción entre una composición y un objeto que se está poniendo en contacto (*por ejemplo*, vítreo, humor acuoso, etc.). La interacción de la composición con el objeto con el que se está poniendo en contacto puede producirse sustancialmente en el mismo momento que la administración de la composición, durante un periodo prolongado de tiempo partiendo desde aproximadamente el tiempo de administración de la composición, o retrasándose con respecto al tiempo de administración de la composición.

“Composición” significa una combinación o mezcla de una o más sustancias.

“Sustancia” significa que tiene una masa y ocupa espacio.

“Sustancia extraña” significa cualquier sustancia que un doctor en medicina, especialista clínico, veterinario o investigador determina que es perjudicial o tóxica para el ojo de un sujeto y/o por ser una sustancia que no se

encuentra normalmente en el ojo sano de un mamífero.

“Vehículo oftalmológicamente aceptable” es una sustancia con la que se puede combinar una segunda sustancia (por ejemplo, un TPCD), sin volver inadecuada a la segunda sustancia (tal como determina un doctor en medicina, especialista clínico, veterinario o investigador) para su uso previsto en el ojo de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de un vehículo oftalmológicamente aceptable incluyen disolución salina equilibrada (BSS) y BSS-PLUS®.

“Vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye, sin limitación, agua, solución salina tamponada, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), o sus mezclas adecuadas. Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables y métodos para preparar dichos vehículos y sus formulaciones se encuentran, por ejemplo, en Remington’s Pharmaceutical Sciences (20ª Edición, A. Gennaro (ed.), Lippincott, Williams & Wilkins, 2000).

“Una cantidad eficaz” significa una cantidad de una sustancia o composición que estimula una respuesta en un ojo de un ser humano u otro mamífero que está buscando un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico.

“Inducir” significa provocar o estimular la incidencia de un resultado deseado.

“Reducir” significa la disminución en cualquier extensión.

“Efectos tóxicos en el ojo” significa cualquier efecto adverso en el ojo de un sujeto que un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro especialista clínico determina que es perjudicial para el sujeto.

“Vítreo” significa el humor vítreo, denominado también como cuerpo vítreo, que ocupa la cámara entre las lentes del cristalino del ojo y la retina.

“TPCD” es un acrónimo de “proteína plasmina truncada que comprende un dominio catalítico de la plasmina”. Una “proteína plasmina truncada” significa cualquier proteína plasmina obtenida eliminando uno o más aminoácido de Val₇₉-plasmina (es decir, los aminoácidos 79-791 del plasminógeno humano), en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. Dichas deleciones de aminoácidos pueden ser en el extremo N (dando como resultado TPCD consistentes por ejemplo en los aminoácidos 444-791, 543-791, o 562-791 de la SEQ ID NO: 10) y/o en el extremo C y/o en cualquier posición o posiciones internas de los aminoácidos 79-791 de la SEQ ID NO: 10. Debe entenderse que si se prepara una proteína truncada derivada de la SEQ ID NO: 10 como una forma enzimáticamente inactiva, debe activarse usando un activador del plasminógeno para convertir este en la forma activa correspondiente de la proteína truncada. Por ejemplo, si una proteína consistente en los aminoácidos 543-791 de la SEQ ID NO: 10 se prepara de manera recombinante, es muy probable que la proteína no esté en su forma enzimáticamente activa. De esta manera, la proteína debería tratarse con un activador del plasminógeno para escindir el enlace peptídico entre la Arg₅₆₁ y la Val₅₆₂, activando por consiguiente la proteína. Los ejemplos no limitantes de un TPCD incluyen miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada, microplasmina estabilizada recombinante y variantes de microplasmina en el que, las variantes de microplasmina y miniplasmina incluyen un dominio catalítico de la plasmina.

“Proteína plasmina” significa cualquier proteína preparada o derivada de la secuencia de aminoácidos del plasminógeno humano (SEQ ID N: 10) que tiene una escisión del enlace peptídico entre la Arg₅₆₁ y la Val₅₆₂ del plasminógeno humano. Se puede llevar a cabo la escisión del enlace peptídico entre la Arg₅₆₁ y la Val₅₆₂ se puede llevar a cabo usando activadores del plasminógeno. Los ejemplos no limitantes de las proteínas plasminas incluyen Lys-plasmina, miniplasmina y microplasmina.

“Dominio catalítico de plasmina” significa una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 130-240 aminoácidos derivada de los aminoácidos 543 a 791 de la SEQ ID NO: 10 (plasminógeno humano), que incluye la tríada catalítica de la plasmina, concretamente, His₆₀₃, Asp₆₄₆ y Ser₇₄₁, en el que la secuencia de aminoácidos posee actividad serina proteasa.

“Dominio catalítico modificado de plasmina” significa un dominio catalítico de plasmina que se ha alterado cambiando la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico mediante la adición y/o la deleción y/o la sustitución de uno o más aminoácidos. Por supuesto, debe entenderse que los aminoácidos que corresponden a la tríada catalítica de plasmina, concretamente, His₆₀₃, Asp₆₄₆ y Ser₇₄₁, no se alteran. La modificación puede aumentar, disminuir, o dejar sin cambiar, la actividad catalítica tipo plasmina de la proteína. Por ejemplo, el dominio catalítico modificado de microplasmina y miniplasmina puede aumentar, disminuir o dejar sin cambiar la actividad de estas proteínas.

“TPCD modificado” es un TPCD que contiene un dominio catalítico modificado de plasmina, en el que el TPCD posee actividad catalítica de serina proteasa tipo plasmina.

“Segundo agente” significa cualquier sustancia que se puede usar, tanto por sí misma, como en combinación con un TPCD, en el tratamiento o la prevención de un trastorno del ojo o una complicación de un trastorno del ojo de un sujeto. Preferiblemente el segundo agente no previene la actividad catalítica de un TPCD.

5 “Estabilizar una proteína” significa proteger una proteína de la degradación y/o la inactivación mediante el uso de uno o más agentes estabilizantes.

Aunque se puede usar cualquier método o material similar o equivalente al descrito en la presente memoria descriptiva en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales preferidos.

10 La vitreolisis farmacológica es un método de uso de uno o más agentes proteínicos y/o químicos y/o ácidos nucleicos para tratar o prevenir un trastorno, o una complicación de un trastorno, de un ojo de un sujeto. La presente invención proporciona métodos de vitreolisis farmacológica usando al menos una proteína plasmática truncada que comprende un dominio catalítico (TPCD). Específicamente, la presente invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de los trastornos del ojo, o complicaciones de los trastornos del ojo, poniendo en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende un TPCD. Estos métodos dan como resultado resultados tales como, pero sin limitarse a, licuefacción del vítreo, desprendimiento posterior del vítreo, reducción o aclaramiento del sangrado hemorrágico procedente del vítreo y/o del humor acuoso, reducción o aclaramiento de las sustancias intraoculares extrañas procedentes del vítreo y/o del humor acuoso, disminución de la neovascularización extrarretinal, y cualquiera de sus combinaciones. Estos métodos se pueden usar tanto como un auxiliar de la vitrectomía como en ausencia de vitrectomía.

25 De acuerdo con esto, la presente invención proporciona, como un primer aspecto, un método de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto, tal como se define en la reivindicación 1, que comprende poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende un TPCD. En una realización, un TPCD tiene un peso molecular inferior de aproximadamente 40.000 daltons. En otra realización, un TPCD tiene un peso molecular de aproximadamente 26.500 daltons en forma reducida o aproximadamente de 29.000 daltons en forma no reducida. En otra realización más, un TPCD tiene un peso molecular de entre aproximadamente 20.000 y 30.000 daltons. En una realización adicional, un TPCD tiene un peso molecular inferior de aproximadamente 20.000 daltons.

30 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto tal como se define en la reivindicación 9, que comprende poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos dos TPCD.

40 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto tal como se define en la reivindicación 9, que comprende poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una primera composición que comprende al menos un TPCD y una cantidad eficaz de una segunda composición que comprende al menos un TPCD. En una realización de este aspecto de la invención, la primera composición que comprende al menos un TPCD y la segunda composición que comprende al menos un TPCD pueden comprender el mismo TPCD. En otra realización de este aspecto de la invención, la primera composición que comprende al menos un TPCD y la segunda composición que comprende al menos un TPCD pueden comprender TPCD diferentes. En una realización adicional de este aspecto de la invención, la primera y segunda composiciones se pueden administrar a un sujeto sustancialmente en el mismo momento o en diferentes momentos.

50 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto tal como se define en la reivindicación 1, que comprende poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un TPCD y al menos un segundo agente. En este aspecto de la invención, no se pretende que el segundo agente sea un TPCD.

55 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto tal como se define en la reivindicación 1, que comprende poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un TPCD antes de, en el mismo momento que, o después de poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un segundo agente.

60 En un sexto aspecto, la presente invención permite un método de licuefacción del vítreo que comprende poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un TPCD. En una realización de este aspecto de la invención, la licuefacción del vítreo disminuye la viscosidad del humor vítreo. En otras realizaciones de la invención, la licuefacción del vítreo aumenta la velocidad de aclaramiento desde la cavidad del vítreo y/o el humor acuoso de la sangre, el material depositado, las sustancias extrañas y/o los materiales tóxicos para el ojo, especialmente la retina. En otra realización de este aspecto de la invención, la

licuefacción del vítreo disminuye la neovascularización extrarretinal. En otra realización más de este aspecto de la invención, la licuefacción del vítreo aumenta la difusión de un agente o composición administrado en el vítreo y/o el humor acuoso. En una realización adicional de este aspecto de la invención, la licuefacción del vítreo ayuda a la eliminación del vítreo durante la vitrectomía normalizada o la vitrectomía con calibre 25 (o más pequeño)

5 En un séptimo aspecto, la presente invención permite un método de inducir el desprendimiento posterior del vítreo que comprende poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un TPCD.

10 En cualquiera del primero al séptimo aspectos de la invención descritos anteriormente, la etapa de puesta en contacto del vítreo y/o el humor acuoso con una composición que comprende un TPCD se puede llevar a cabo como un auxiliar de, o en ausencia de, una vitrectomía.

15 En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un método de llevar a cabo una vitrectomía que comprende la etapa de poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con una composición que comprende al menos un TPCD. La etapa de puesta en contacto se puede llevar a cabo en el mismo momento que, o antes de la vitrectomía.

20 En un noveno aspecto, la presente invención proporciona una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 32 que comprende al menos dos TPCD.

En un décimo aspecto, la presente invención proporciona una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 25 que comprende al menos un TPCD y al menos un segundo agente.

25 En una realización de todos los aspectos de la presente invención, se selecciona un TPCD entre el grupo que consiste en miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada, microplasmina estabilizada recombinante, variantes de microplasmina, y cualquiera de sus combinaciones. En otra realización de todos los aspectos de la invención, los métodos de tratamiento o prevención del trastorno del ojo anteriormente mencionado, o las complicaciones de un trastorno del ojo, y los métodos de llevar a cabo una vitrectomía dan como resultado la mejora de un trastorno del ojo mediante uno o más de los siguientes resultados; reducción de la viscosidad del vítreo, licuefacción del vítreo, inducción del desprendimiento posterior del vítreo, aclaramiento o reducción del sangrado hemorrágico procedente del vítreo, la cavidad del vítreo y/o el humor acuoso, aclaramiento o reducción de las sustancias intraoculares extrañas procedentes del vítreo, la cavidad del vítreo y/o el humor acuoso, aclaramiento o reducción de los materiales tóxicos para la retina procedentes del vítreo, la cavidad del vítreo y/o el humor acuoso, aumento de la difusión de un agente o una composición administrados en el vítreo y/o el humor acuoso, o reducción de la neovascularización retinal. El trastorno del ojo o la complicación de un trastorno del ojo que se busca tratar o prevenir de acuerdo con la invención se selecciona entre el grupo que consiste en desprendimiento de la retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia del vítreo diabética, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición fibrilar, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmitis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa, y cualquiera de sus combinaciones.

45 Un TPCD incluye cualquier proteína plasmina truncada que comprende un dominio catalítico de plasmina. Una proteína plasmina truncada abarca cualquier proteína plasmina obtenida eliminando uno o más aminoácidos de Val₇₉-plasmina (es decir, los aminoácidos 79-791 del plasminógeno humano), en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. De esta manera todos los TPCD deben contener la tríada catalítica del dominio de la serina proteasa de plasmina, concretamente His₆₀₃, Asp₆₄₆ y Ser₇₄₁. Se pueden realizar truncamientos de Val₇₉-plasmina mediante deleciones de uno o más aminoácidos en los aminoácidos 79-791 de la SEQ ID NO: 10 (plasminógeno humano). Dichas deleciones pueden ser en el extremo N, el extremo C o en una localización interna de los aminoácidos 79-791 de la SEQ ID NO: 10. Debería entenderse que si una proteína resultante de un truncamiento de los aminoácidos 79-791 de la SEQ ID NO: 10 (plasminógeno humano) se prepara en una forma enzimáticamente inactiva, la proteína debe convertirse en su forma activa usando un activador del plasminógeno, que se va a considerar un TPCD, Los activadores del plasminógeno escinden el enlace peptídico entre la Arg₅₆₁ y la Val₅₆₂, activando por consiguiente una proteína. En una realización, un TPCD incluye proteínas que consisten esencialmente en los aminoácidos 444-791 de la SEQ ID NO: 10. En otra realización, un TPCD incluye proteínas con una o más deleciones de aminoácidos en los aminoácidos 444-791 del plasminógeno humano, en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. En otra realización, un TPCD incluye proteínas que consisten esencialmente en los aminoácidos 543-791 de la SEQ ID NO: 10. En otra realización más, un TPCD incluye proteínas con una o más deleciones en los aminoácidos 543-791 del plasminógeno humano, en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. En otra realización, un TPCD incluye proteínas que consisten esencialmente en los aminoácidos 562-791 de la SEQ ID NO: 10. En otra realización, un TPCD incluye proteínas con una o más deleciones en los aminoácidos 562-791 del plasminógeno humano, en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. Las deleciones pueden ser en el extremo N, el extremo C o en una localización interna de los aminoácidos 444-791, 543-791 y 562-791 de la SEQ ID NO: 10

(plasminógeno humano), respectivamente. Las personas normalmente expertas en la técnica conocen bien los métodos para preparar deleciones de aminoácidos en una proteína (*por ejemplo*, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col. (eds.), John Wiley & Sons, 2001; y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Sambrook y Russell, 2000). Se puede determinar la actividad catalítica de un TPCD midiendo la actividad amidolítica del TPCD, usando el sustrato cromógeno S2403 (Chromogenix, Antwerp, Bélgica) (véase el ejemplo 2), cualquier otro sustrato cromógeno, o mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

Se da a conocer también el uso de un TPCD modificado. Un TPCD modificado es un TPCD con una forma modificada del dominio catalítico de plasmina, en el que el TPCD modificado posee actividad catalítica de serina proteasa de tipo plasmina. Las modificaciones del dominio catalítico incluyen inserciones y/o deleciones y/o sustituciones de aminoácidos en el dominio catalítico de la plasmina. Sin embargo, los aminoácidos que corresponden a la tríada catalítica del dominio de la serina proteasa de la plasmina, concretamente, Histidina⁶⁰³, Ácido aspártico⁶⁴⁶ y Serina⁷⁴¹ no se alteran. Preferiblemente, las modificaciones del dominio catalítico implican una o más sustitución(es) conservativa(s) que no son parte de la tríada catalítica. Las personas normalmente expertas en la técnica conocen las sustituciones conservativas de aminoácidos y los métodos de preparación de dichas sustituciones conservativas de aminoácidos (*véanse*, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, *más arriba*; y Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *más arriba*). Estas modificaciones pueden aumentar, disminuir o dejar sin cambiar la actividad catalítica del dominio original. Se puede determinar la actividad catalítica de un TPCD modificado midiendo la actividad amidolítica del TPCD, usando el sustrato cromógeno S2403 (Chromogenix, Antwerp, Bélgica) (véase el ejemplo 2) o mediante cualquier otro método conocido en la técnica.

TPCD incluye, pero no se limita a, miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada, microplasmina estabilizada recombinante, y variantes de microplasmina. Las variantes de microplasmina y miniplasmina incluyen formas más cortas de microplasmina y miniplasmina que se pueden producir mediante deleciones de aminoácidos procedentes de estas proteínas. Todas las variantes de microplasmina y miniplasmina se espera que tengan actividad catalítica de serina proteasa, incluso si no poseen el mismo nivel de actividad catalítica que la microplasmina y la miniplasmina, respectivamente. De esta manera, se requieren todas las variantes de microplasmina y miniplasmina para contener los aminoácidos 603-741 de la SEQ ID NO: 10, que contienen la tríada catalítica del dominio de la serina proteasa de plasmina, concretamente, His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶ y Ser⁷⁴¹ del plasminógeno humano. En una realización, una variante de miniplasmina incluye proteínas que contienen una o más deleciones en los aminoácidos 444-791 del plasminógeno humano, en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. En otra realización, una variante de microplasmina incluye proteínas que contienen una o más deleciones en los aminoácidos 543-791 del plasminógeno humano, en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. En otra realización más, una variante de microplasmina incluye proteínas que contienen una o más deleciones en los aminoácidos 562-791 del plasminógeno humano, en el que la proteína resultante posee la actividad catalítica de la serina proteasa. Las deleciones pueden ser en el extremo N, el extremo C o en una localización interna de los aminoácidos 444-791, 543-791 y 562-791 de la SEQ ID NO: 10. Las variantes de microplasmina y miniplasmina incluyen también, pero no se limitan a, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos en estas proteínas. Se prevé que las sustituciones de aminoácidos realizadas en microplasmina o miniplasmina sean preferiblemente sustituciones conservativas. Cualquier variante de microplasmina y miniplasmina o cualquier otro TPCD se pueden preparar mediante métodos recombinantes y activarse en la forma de plasmina activa con un activador del plasminógeno. Alternativamente, se pueden preparar variantes de microplasmina y miniplasmina o cualquier otro TPCD mediante otros medios bien conocidos en la técnica tales como, pero sin limitarse a, digestión del plasminógeno humano con elastasa o reducción parcial y alquilación de la plasmina, microplasmina o miniplasmina. Estas variantes de microplasmina, miniplasmina, o para esta materia de cualquier TPCD, se pueden evaluar para la actividad catalítica de la serina proteasa usando el sustrato cromógeno S2403 o cualquier otro sustrato cromógeno. Además, las variantes de microplasmina, miniplasmina o cualquier otro TPCD se pueden ensayar para su capacidad de inducir el PVD y/o el efecto de licuefacción del vítreo inyectando diferentes dosis de la variante en cualquier solución salina equilibrada en porcino, felino u ojos humanos post-mortem. Si un TPCD puede inducir el PVD y/o el efecto de licuefacción en el vítreo en cualquiera de estos ojos, se considera que este TPCD es útil para tratar los trastornos de los ojos de mamíferos. Preferiblemente, el TPCD no da como resultado toxicidad en el ojo inyectado. En la tabla 1 se proporcionan ejemplos no limitantes de variantes de microplasmina.

Tabla 1

Ejemplos no limitantes de variantes de microplasmina

Las variantes de microplasmina relacionadas a continuación corresponden a la secuencia y numeración de aminoácidos del plasminógeno humano, que consiste en los aminoácidos 1-791 (véase la figura 1, SEQ ID NO: 10).

542-741, 542-742, 542-743, 542-744, 542-745, 542-746, 542-747, 542-748, 542-749, 542-750, 542-751, 542-752, 542-753, 542-754, 542-755, 542-756, 542-757, 542-758, 542-759, 542-760, 542-761, 542-762, 542-763, 542-764, 542-765, 542-766, 542-767, 542-768, 542-769, 542-770, 542-771, 542-772, 542-773, 542-774, 542-775, 542-776, 542-777, 542-778, 542-779, 542-780, 542-781, 542-782, 542-783, 542-784, 542-785, 542-786, 542-787, 542-788,

597-789, 597-790, 597-791;

598-741, 598-742, 598-743, 598-744, 598-745, 598-746, 598-747, 598-748, 598-749, 598-750, 598-751, 598-752, 598-753, 598-754, 598-755, 598-756, 598-757, 598-758, 598-759, 598-760, 598-761, 598-762, 598-763, 598-764, 598-765, 598-766, 598-767, 598-768, 598-769, 598-770, 598-771, 598-772, 598-773, 598-774, 598-775, 598-776, 598-777, 598-778, 598-779, 598-780, 598-781, 598-782, 598-783, 598-784, 598-785, 598-786, 598-787, 598-788, 598-789, 598-790, 598-791;

599-741, 599-742, 599-743, 599-744, 599-745, 599-746, 599-747, 599-748, 599-749, 599-750, 599-751, 599-752, 599-753, 599-754, 599-755, 599-756, 599-757, 599-758, 599-759, 599-760, 599-761, 599-762, 599-763, 599-764, 599-765, 599-766, 599-767, 599-768, 599-769, 599-770, 599-771, 599-772, 599-773, 599-774, 599-775, 599-776, 599-777, 599-778, 599-779, 599-780, 599-781, 599-782, 599-783, 599-784, 599-785, 599-786, 599-787, 599-788, 599-789, 599-790, 599-791;

600-741, 600-742, 600-743, 600-744, 600-745, 600-746, 600-747, 600-748, 600-749, 600-750, 600-751, 600-752, 600-753, 600-754, 600-755, 600-756, 600-757, 600-758, 600-759, 600-760, 600-761, 600-762, 600-763, 600-764, 600-765, 600-766, 600-767, 600-768, 600-769, 600-770, 600-771, 600-772, 600-773, 600-774, 600-775, 600-776, 600-777, 600-778, 600-779, 600-780, 600-781, 600-782, 600-783, 600-784, 600-785, 600-786, 600-787, 600-788, 600-789, 600-790, 600-791;

601-741, 601-742, 601-743, 601-744, 601-745, 601-746, 601-747, 601-748, 601-749, 601-750, 601-751, 601-752, 601-753, 601-754, 601-755, 601-756, 601-757, 601-758, 601-759, 601-760, 601-761, 601-762, 601-763, 601-764, 601-765, 601-766, 601-767, 601-768, 601-769, 601-770, 601-771, 601-772, 601-773, 601-774, 601-775, 601-776, 601-777, 601-778, 601-779, 601-780, 601-781, 601-782, 601-783, 601-784, 601-785, 601-786, 601-787, 601-788, 601-789, 601-790, 601-791;

602-741, 602-742, 602-743, 602-744, 602-745, 602-746, 602-747, 602-748, 602-749, 602-750, 602-751, 602-752, 602-753, 602-754, 602-755, 602-756, 602-757, 602-758, 602-759, 602-760, 602-761, 602-762, 602-763, 602-764, 602-765, 602-766, 602-767, 602-768, 602-769, 602-770, 602-771, 602-772, 602-773, 602-774, 602-775, 602-776, 602-777, 602-778, 602-779, 602-780, 602-781, 602-782, 602-783, 602-784, 602-785, 602-786, 602-787, 602-788, 602-789, 602-790, 602-791

Miniplasmina y microplasmina se producen tras la activación del miniplasminógeno y el microplasminógeno mediante activadores del plasminógeno, tales como, pero sin limitarse a, estreptoquinasa, estafiloquinasa, activador del plasminógeno de tipo tejido o uroquinasa. Miniplasminógeno y microplasminógeno se derivan del plasminógeno, que es una glicoproteína de cadena sencilla que es un importante componente de la sangre de mamíferos. El plasminógeno humano es una proteína multidominio de 791 restos (SEQ ID NO: 10), compuesta por un dominio preactivación en el extremo N, dominios homólogos en rosquilla cada uno de aproximadamente 80 aminoácidos, un dominio catalítico de la serina proteasa y secuencias que conectan interdominios. Los activadores de la plasmina o el plasminógeno escinden los enlaces peptídicos entre la Arg₆₈-Met₆₉, o la Lys₇₇-Lys₇₈ o la Lys₇₈-Val₇₉ en el extremo N del plasminógeno humano, dando como resultado proenzimas más cortas denominadas Lys-plasminógenos (por ejemplo, proteínas que consisten en los aminoácidos 69-791 o 78-791 o 79-791). La escisión adicional mediante la enzima elastasa elimina los primeros cuatro dominios en rosquilla produciendo la proenzima, el miniplasminógeno (normalmente, los aminoácidos 442-791). La escisión adicional del quinto dominio en rosquilla da como resultado la proenzima, el microplasminógeno (normalmente los aminoácidos 543-791). Los dominios en rosquilla del plasminógeno contienen sitios de unión a lisina que median la unión específica del plasminógeno a sustratos tales como fibrina. Las formas de proenzima del plasminógeno se activan a su forma enzimáticamente activa mediante la escisión del enlace peptídico entre la Arg₅₆₁ y la Val₅₆₂ para dar como resultado una forma bicatenaria con puentes disulfuro de la correspondiente proteína. El producto de activación de la proteína del plasminógeno se denomina como plasmina. De esta manera, el producto de activación del Lys-plasminógeno se denomina Lys-plasmina, mientras que los productos de activación del miniplasminógeno y el microplasminógeno se denominan respectivamente como miniplasmina y microplasmina. Lys-plasmina tiene un peso molecular de aproximadamente 65.000 en su forma sin glicosilar y un peso molecular de aproximadamente 83.000 daltons en su forma completamente glicosilada, mientras que la miniplasmina tiene un peso molecular de aproximadamente 38.000 daltons, y la microplasmina tiene un peso molecular de aproximadamente 26.500 daltons en la forma reducida y de aproximadamente 29.000 daltons en la forma no reducida. De manera análoga a la plasmina, la miniplasmina y la microplasmina poseen actividad catalítica. Una ventaja de la miniplasmina y la microplasmina sobre la plasmina es su tamaño más pequeño en comparación a la plasmina. De esta manera, se espera que la microplasmina y la miniplasmina tengan velocidades de difusión más rápidas en el vítreo que la plasmina (Xu, J. y col., Pharmaceutical Research 17: 664-669, 2000).

En una realización, un TPCD tiene un peso molecular inferior de aproximadamente 40.000 daltons. En otra realización, un TPCD tiene un peso molecular de entre aproximadamente 20.000 y aproximadamente 30.000 daltons. En otra realización más, un TPCD tiene un peso molecular de aproximadamente 26.500 daltons en forma reducida y de aproximadamente 29.000. Daltons en forma no reducida. En una realización adicional, un TPCD tiene un peso molecular inferior de aproximadamente 20.000 daltons.

La microplasma se puede preparar mediante reacción autolítica entre la plasmina y el plasminógeno en una disolución muy alcalina que tenga un pH comprendido aproximadamente de 9,5 a 11,5, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 4.774.087. Alternativamente, se pueden preparar microplasma y miniplasma mediante métodos recombinantes tal como se describe en la solicitud PCT WO 02/50290. De manera breve, los ADN que codificaban el miniplasminógeno y el microplasminógeno se clonaron de manera independiente en un vector de expresión de levadura (*por ejemplo*, pPICZ α , un vector de secreción de Invitrogen Corporation) que se puede usar para expresar estas proteínas en levaduras metilotrópicas (*por ejemplo*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, y *Torulopsis*). Los clones de levaduras que producen proteínas con la actividad de miniplasma y microplasma más elevada se seleccionaron para la producción a gran escala. Estos clones se pueden hacer crecer a cualquier escala, pero normalmente se usa una escala de aproximadamente 20 litros a aproximadamente 500 litros. El miniplasminógeno o el microplasminógeno secretados se purifican en un proceso en tres etapas que comprende la cromatografía en lecho expandido con intercambio catiónico, la cromatografía hidrófoba, y la cromatografía de afinidad. El microplasminógeno y el miniplasminógeno purificados obtenidos mediante este proceso se activan a sus formas activas usando una relación molar de un activador del plasminógeno (*por ejemplo*, uroquinasa, estreptoquinasa, estafiloquinasa, la variante SY162 de estafiloquinasa, etc.). Debe señalarse que el proceso recombinante para producir miniplasma y microplasma se puede ampliar para producir cualquier TPCD. Una ventaja de usar un TPCD recombinante en comparación con una enzima plasmina autóloga es que las proteínas recombinantes se pueden preparar a partir de grandes lotes de producción que dan como resultado enzimas de actividad uniforme. Debido a que estas proteínas tienen una actividad uniforme, se pueden implementar protocolos normalizados. Una ventaja adicional es que estas proteínas podrían estar fácilmente disponibles sin el retraso y otros problemas pendientes asociados con el aislamiento y la purificación de la plasmina de cada paciente.

El TPCD obtenido mediante el proceso descrito anteriormente se puede concentrar, estabilizar y/o liofilizar. Las personas normalmente expertas en la técnica conocen bien los métodos de concentración de proteínas (*véanse por ejemplo*, Protein Purification Methods: A Practical Approach, Harris, E.L.V y Angal, S. (eds.), IRL Press, 1989; A Guide to Protein Isolation (Segunda Edición), Clive Dennison, Kluwer Academic Publications, 2003; y Protein Methods (Segunda Edición), Daniel M. Bollag, Michael D. Rozycki, Stuart J. Edelstein (eds.), Wiley, 1996).

La estabilización es un método de proteger una proteína de la degradación y/o inactivación mediante el uso de uno o más agentes estabilizantes (*por ejemplo*, poniendo en contacto un TPCD con un agente estabilizante, o purificando un TPCD en presencia de un agente estabilizante). Los agentes estabilizantes incluyen, sin limitación, ácido tranexámico, ácido hexanoico, lisina, serina, treonina, metionina, glutamina, alanina, glicina, isoleucina, valina, alanina, ácido aspártico, alcohol polihídrico, carbohidratos farmacéuticamente aceptables, glucosamina, tiamina, niacinamida, cualquier tampón ácido que comprenda ácido cítrico, ácido acético, ácido clorhídrico, ácido carboxílicos, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, o ácido benzoico, y las sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, y cualquiera de sus derivados o combinaciones. Una ventaja de usar TPCD estabilizado, producido de manera recombinante en comparación con la enzima plasmina autóloga es que esta proteínas son más estables que la enzima plasmina autóloga, que se obtiene recogiendo sangre y, purificando, preparando y almacenando la enzima plasmina sobre una base paciente por paciente. A diferencia de la enzima plasmina autóloga, que necesita usarse muy rápidamente después de su preparación, se puede usar TPCD estabilizado recombinante incluso después de un periodo de tiempo significativo desde el tiempo de la purificación.

Se puede llevar a cabo la liofilización de un TPCD de la invención inmediatamente después de la concentración de las proteínas purificadas o después de la estabilización. Las personas normalmente expertas en la técnica conocen bien los métodos de liofilización de proteínas. El TPCD liofilizado se puede almacenar en viales (*por ejemplo*, de vidrio) en cualquier cantidad, pero preferiblemente, en cantidades que se pueden reconstituir fácilmente para el uso.

La microplasma, la miniplasma, o cualquier otro TPCD liofilizado se puede reconstituir en un vehículo oftalmológicamente aceptable antes de usarse para ponerse en contacto el vítreo y/o el humor acuoso. En una realización, un vehículo oftalmológicamente aceptable es un disolvente estéril que tiene un pH y una osmolaridad que es compatible con el vítreo del sujeto. Los ejemplos no limitantes de vehículos oftalmológicamente aceptables son las soluciones salinas isotónicas, la disolución salina equilibrada (BSS) y BSS PLU®. Una disolución salina equilibrada contiene normalmente: cloruro de sodio al 0,64 %, cloruro de potasio al 0,075 %, cloruro de calcio dehidrato al 0,048 %, cloruro de magnesio hexahidrato al 0,03 %, acetato de sodio trihidrato al 0,39 %, citrato de sodio dihidrato al 0,17 %, hidruro de sodio/ácido clorhídrico para ajustar el pH, y agua.

El método de poner en contacto el vítreo y/o el humor acuso usando composiciones que comprenden un TPCD dependerá del sujeto concreto, la gravedad de la dolencia que se está tratando y la dosificación requerida para la eficacia terapéutica, y se puede determinar por un médico sobre una base paciente por paciente. Se puede utilizar cualquier método de poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso que proporcione una cantidad eficaz de un TPCD en el vítreo y/o el humor acuoso. Debe entenderse que dicho contacto con el vítreo y/o el humor acuoso no tiene que tener lugar de manera simultánea con la administración de una composición que comprende un TPCD. El contacto se puede retrasar o se puede producir durante un periodo prolongado de tiempo desde el tiempo de la administración. Un método de poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso es mediante una o más inyecciones

intraoculares directamente en el vítreo y/o el humor acuoso respectivamente. Se pueden poner también en contacto el vítreo y/o el humor acuoso mediante inyecciones subconjuntivales, intramusculares o intravenosas. Se puede proporcionar cualquiera de estas inyecciones usando una disolución líquida que comprenda un TPCD de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, sin embargo, se pueden poner en contacto el
 5 vítreo y/o el humor acuoso con un TPCD mediante cualquier otro método adecuado, que dé como resultado una distribución suficiente del TPCD en el vítreo y/o el humor acuoso para tratar o prevenir el trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto. Se puede administrar también una composición que comprende un TPCD colocando dispositivos intravitreales implantables que incluyen, pero no se limitan a, OCUSERT® (Alza Corp., Palo Alto, Calif.) y VITRASERT® (Bausch and Lomb, Inc., Rochester, N.Y.). La presente invención prevé
 10 también que se puedan poner en contacto el vítreo y/o el humor acuoso con un TPCD, usando un depósito, una formulación de liberación continua, o cualquier dispositivo implantable que suministre de esta manera un TPCD de forma continua.

Una persona normalmente experta en la técnica puede determinar fácilmente las pautas terapéuticas de un TPCD y estas variarán dependiendo del paciente y del efecto buscado. Se puede usar el TPCD a cualquier dosis, que traiga consigo efectos terapéuticos deseables, incluyendo, pero sin limitarse a licuefacción del vítreo, desprendimiento posterior del vítreo, y/o aclaramiento de la sangre, de los materiales tóxicos o sustancias extrañas procedentes de la cavidad del vítreo, sin producir toxicidad significativa en el ojo (especialmente en la retina) o en las estructuras anatómicas asociadas. Adicionalmente, se puede administrar un TPCD como una única dosis o en múltiples dosis.
 15 Una dosificación de TPCD típica está en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 0,2 mg por ojo. Si se inyecta, se puede proporcionar TPCD en un volumen de administración de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 0,3 ml de un disolvente estéril (por ejemplo, BSS o BSS PLUS® estériles) por ojo. En aquellos ejemplos en los que se lleva a cabo una vitrectomía, el TPCD se mantiene en el vítreo y/o el humor acuoso durante entre aproximadamente 15 y 120 minutos antes de la retirada del vítreo. En una realización de la invención, se
 20 administra una dosis de 0,125 mg de TPCD en 0,1 ml de BSS o BSS PLUS® estériles por ojo. En otra realización, se administra una dosis de 0,125 mg de TPCD en 0,1 ml de BSS o BSS PLUS® estériles por ojo durante aproximadamente 15-120 minutos antes de la vitrectomía.

La presente invención contempla también el uso de composiciones que comprenden más de un TPCD. De acuerdo con esto, en un aspecto de la invención, el vítreo y/o el humor acuoso se ponen en contacto con una composición que comprende un primer TPCD y un segundo TPCD. En una realización particular de este aspecto de la invención, el primer y el segundo TPCD se seleccionan entre el grupo que consiste en miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada, microplasmina estabilizada recombinante, variantes de microplasmina, y cualquiera de sus combinaciones. En otro aspecto de la invención, el vítreo y/o el humor acuoso se ponen en contacto con una primera composición que comprende al menos un TPCD y con una segunda composición que comprende al menos un TPCD. El TPCD puede ser una misma proteína o diferentes proteínas y se puede administrar sustancialmente en el mismo momento o en diferentes momentos. Además, el TPCD también se puede administrar como una composición que comprende al menos un segundo agente.
 30 Adicionalmente, el vítreo y/o el humor acuoso se pueden poner en contacto con una composición que comprende al menos un TPCD seguido por una composición que comprende al menos un segundo agente o *viceversa*. Esto puede ser necesario cuando el tiempo requerido para cada una de estas composiciones es diferente, es decir, cuando una composición necesita más tiempo para actuar en comparación con otra. Un segundo agente es cualquier proteína (pero no un TPCD), sustancia química u otra sustancia que es útil en el tratamiento o la
 35 prevención de los trastornos del ojo, o las complicaciones de un trastorno del ojo. Dichos segundos agentes se describen en las Patentes N° 4.820.516; 5.292.509; 5.866.120; 6.051.698; 6.462.071; 6.596.725; y 6.610.292. Los ejemplos no limitantes de segundos agentes que se pueden utilizar con la presente invención incluyen enzimas glicosaminoglicanasas tales como hialuronidasas, condroitinasa ABC, condroitinasa AC, condroitinasa B, condroitin 4-sulfatasa, condroitin 6-sulfatasa y B-glucuronidasa; enzimas colagenasas; dispasa; péptidos que contienen RGD tales como RGD, GRGDS, GRGDTP, equistatina y falvoridina; un anticuerpo dirigido contra integrina; antagonistas del receptor P2Y; urea, hidroxidurea, tiourea y agentes antiangiogénicos tales como, pero sin limitarse a, inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (*por ejemplo*, anticuerpos dirigidos contra VEGF, aptámeros de VEGF, receptores solubles de VEGF, etc.) e inhibidores del factor de crecimiento (PIGF) (*por ejemplo*, anticuerpos dirigidos contra P1GF, aptámeros de P1GF, receptores solubles de VEGF, etc.). La mayoría de estos segundos
 40 agentes son capaces de promover por sí mismos la licuefacción del vítreo y/o de inducir el desprendimiento posterior del vítreo. Los segundos agentes antiangiogénicos podrían ser útiles en la prevención de la neovascularización en el ojo. La expresión de VEGF y/o P1GF a partir de una retina hipóxica se piensa que da como resultado el desarrollo de la neovascularización retinal. Inhibir de esta manera, VEGF y/o P1GF podría ser un medio eficaz para prevenir la neovascularización.
 45

Una composición que comprende un TPCD es útil para efectuar la licuefacción del vítreo y/o la desinserción o el desprendimiento del vítreo de la retina y otros tejidos (*por ejemplo*, membranas epiretinales, mácula). Como resultado de esta licuefacción del vítreo y/o del desprendimiento del vítreo, las fuerzas de tracción del vítreo en la retina y otros tejidos se minimizan y la velocidad de renovación natural de los fluidos en el interior del vítreo se
 50 acelera. De acuerdo con esto, las composiciones que comprenden un TPCD son particularmente adecuadas para el tratamiento o la prevención de muchos trastornos del ojo, que se benefician de la licuefacción del vítreo, el
 55

desprendimiento posterior del vítreo, la disminución de la neovascularización extrarretinal y/o el aclaramiento acelerado de las toxinas u otras sustancias perjudiciales (*por ejemplo*, factores angiogénicos, fluidos de edemas, sangre hemorrágica, etc.) procedentes de la cámara posterior del ojo y/o de los tejidos adyacentes a la cámara posterior (*por ejemplo*, retina o mácula). Los ejemplos de dichos trastornos del ojo incluyen, pero no se limitan a, desprendimiento de retina, desgarro de retina, hemorragia del vítreo, hemorragia diabética del vítreo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmitis, retinopatía de precocidad, glaucoma y retinitis pigmentosa, y otros en los que los síntomas clínicos de estos trastornos responden a la administración de TPCD. La presente invención contempla el tratamiento de trastornos del ojo que comprenden poner en contacto el vítreo con una composición que comprende un TPCD. Se espera que dicho contacto provoque la licuefacción del vítreo y/o induzca el desprendimiento posterior del vítreo y/o el aclaramiento de la cavidad del vítreo de sangre u otras sustancias tóxicas y/o disminuya la neovascularización extrarretinal, tratando o previniendo por consiguiente el trastorno.

La presente invención permite también métodos de prevención o inhibición del comienzo de diversos trastornos del ojo que los son como resultado de, o están exacerbados por, la adhesión del vítreo a la retina y la contracción del vítreo. En una realización, los métodos son capaces de prevenir o inhibir los trastornos, o las complicaciones que son el resultado de un trastorno en el ojo de un sujeto sin eliminar el vítreo del ojo. En particular, la invención permite un proceso de tratamiento de un paciente con trastornos proliferativos o en riesgo de desarrollar trastornos proliferativos, tales como, pero sin limitarse a, un paciente diabético, induciendo el desprendimiento posterior del vítreo como una etapa profiláctica en la prevención o el retraso del comienzo de los trastornos asociados con la contracción del vítreo o la neovascularización en el vítreo. En una realización de la invención, la composición se va a introducir en el ojo de un paciente diabético para inhibir la progresión de la retinopatía diabética. Preferiblemente, la composición se va a introducir en el ojo antes de que se produzcan los trastornos proliferativos. En una realización, la composición se va a introducir en el vítreo del ojo antes del comienzo de los trastornos proliferativos y permanece en el ojo de manera indefinida sin retirar el vítreo del ojo. En otras realizaciones, la invención permite un proceso para inhibir las complicaciones en la oclusión central y en las ramas de la vena de la retina, tal como la neovascularización de la retina y el edema macular induciendo el desprendimiento posterior del vítreo en un paciente que necesita dicho tratamiento. La presente invención proporciona un proceso para tratar el agujero macular inminente o de espesor completo (tanto idiopático como traumático) induciendo el desprendimiento posterior del vítreo. Previniendo o reduciendo la incidencia del desprendimiento de retina, desgarros en la retina y la hemorragia de la retina producida por contracción del vítreo se puede conseguir inducir el desprendimiento posterior del vítreo antes de que se produzcan dichos trastornos y sin retirar el vítreo del ojo.

Muchos trastornos oftálmicos tienen un componente causante, una desestabilización de la membrana hematorretiniana. Esta desestabilización permite que diversos componentes (por ejemplo, componentes del suero, lípidos, proteínas) de los coriocapilares entren en la cámara vítrea y dañen la superficie de la retina. Esta desestabilización es también precursora de la infiltración vascular de la cámara vítrea, conocida como neovascularización. La neovascularización del vítreo es dependiente de la matriz del vítreo. De esta manera, la licuefacción del vítreo, que elimina la matriz en la forma del vítreo polimerizado, bloquea la neovascularización. En una realización, la invención proporciona un método de tratar o prevenir los trastornos del ojo anteriormente mencionados previniendo o reduciendo la incidencia de la neovascularización retinal que comprende poner en contacto el vítreo con una composición que comprende un TPCD.

Algunos trastornos oftalmológicos que incluyen la retinopatía diabética y los traumatismos dan como resultado la ruptura o fugas de los vasos sanguíneos de la retina que dan como resultado el sangrado en el vítreo (es decir, la hemorragia en el vítreo). La hemorragia en el vítreo se manifiesta normalmente como una turbidez u opacificación del vítreo y algunas veces, pero no siempre, va acompañada por el desgarro o desprendimiento de la retina. En los casos en el que la hemorragia del vítreo está acompañada por un desgarro o desprendimiento de la retina, es importante que dicho desgarro o desprendimiento de la retina se diagnostique y repare quirúrgicamente con prontitud. El fracaso en diagnosticar y reparar con prontitud el desgarro o el desprendimiento de la retina puede llevar a la necrosis de las células fotorreceptoras de la retina en la región del desgarro o del desprendimiento. La necrosis de las células fotorreceptoras de la retina puede dar como resultado la pérdida de visión. Además, dejar que el desprendimiento de retina permanezca sin reparar durante dicho periodo prolongado de tiempo puede dar como resultado una hemorragia del vítreo adicional y/o la formación de tejido fibroso en el sitio de la hemorragia. El tejido fibroso puede dar como resultado la formación de una adherencia fibrosa permanente indeseable entre el cuerpo del vítreo y la retina. En ausencia de cualquier tratamiento, la coagulación hemorrágica del vítreo puede tardar entre 6-12 meses o más en aclararse lo suficiente para permitir la visualización transvitreál de la retina. En tales casos, en los que un médico necesita reparar cualquier parte de la superficie de la retina, o en los que un médico necesita visualizar la superficie de la retina de un paciente que se impide por un vítreo opaco o coagulado, se puede necesitar llevar a cabo un procedimiento microquirúrgico conocido como vitrectomía. Este procedimiento implica la retirada de la totalidad o de una porción del vítreo con un bisturí microquirúrgico y la sustitución del vítreo con un líquido transparente u otra sustancia que permita que la cavidad ocular mantenga su forma. Las personas normalmente expertas en la técnica conocen bien los procedimientos quirúrgicos de vitrectomía estándar. En una realización, la presente invención contempla poner en contacto el vítreo con una composición que comprende al

menos un TPCD como un auxiliar a la vitrectomía. En otras realizaciones, el vítreo se pone en contacto con la composición que comprende al menos un TPCD sin llevar a cabo una vitrectomía.

5 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben tomarse como que limitan la invención en alcance a los procedimientos específicos descritos en esta memoria descriptiva. Por el contrario, se ha de entender claramente que se puede recurrir a otras realizaciones, modificaciones, y equivalentes diferentes de las mismas, que tras leer la descripción en la presente memoria descriptiva, los expertos en la técnica puedan sugerir por sí mismos sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 Ejemplo 1

Construcción del vector para la expresión del microplasminógeno humano y del miniplasminógeno humano en *Pichia pastoris*

15 (a) El vector pPICZ α A

El vector de secreción pPICZ α A adquirido de Invitrogen Corporation (Carlsbad, California) se usó para dirigir la expresión y secreción del microplasminógeno y miniplasminógeno humanos recombinantes en *Pichia pastoris*. Las características más importantes de este vector incluyen: (i) un fragmento de 942 pb que contiene el promotor de la alcohol oxidasa 1 (*AOX1*) que permite la expresión de alto nivel inducible por metanol de la proteína recombinante en *Pichia*, así como la integración en el locus cromosómico dirigida por el plásmido; (ii) la terminación de la transcripción natural y la señal de poliadenilación procedentes del gen *AOX1*; (iii) un casete de expresión que confiere resistencia a la zeocina a *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*; (iv) un origen ColE1 de replicación para la propagación y el mantenimiento del plásmido en *Escherichia coli*; (v) un epítipo c-myc y una etiqueta de polihistidina (6X His), que se puede usar para la detección y purificación; y sitios de restricción únicos (por ejemplo, Sac I, Pme I, BstXI) que permiten la linealización del vector en el locus *AOX1* para la integración eficaz en el genoma de *Pichia*.

Adicionalmente a las características anteriores, este vector contiene la señal de secreción del prepropéptido del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, permitiendo la expresión de las proteínas heterólogas como proteínas secretadas en el medio. El procesamiento de la secuencia señal correspondiente al factor α en pPICZ α se produce en dos etapas:

1. La escisión preliminar de la secuencia señal por el producto del gen *KEX2* que se produce entre la arginina y la glutamina en la secuencia Glu-Lys-Arg * Glu-Ala-Glu-Ala, en la que * es el sitio de escisión. Sin embargo, las repeticiones Glu-Ala no son siempre necesarias para la escisión por Kex2.

2. Las repeticiones Glu-Ala se escinden adicionalmente por el producto génico *STE13*. En algunos casos en los que la escisión de STE13 no es eficaz, las repeticiones Glu-Ala se mantienen en el extremo NH₂ de la proteína de interés expresada.

Se ubica en inmediatamente en la dirección 3' de la secuencia señal del factor α en el vector pPICZ α A un sitio multiclonación con secuencias de reconocimiento de los enzimas EcoR I, Sfi I, Kpn I, Xho I, Sac II y Xba I mediante genomanipulación para facilitar la clonación de los genes extraños. Además del sitio Xho I en el sitio de múltiple clonación, hay una secuencia de reconocimiento de Xho I en el extremo carboxilo de la secuencia de secreción del factor α , inmediatamente en la dirección 5' del sitio de escisión Kex2 de la Lys-Arg. Este sitio de restricción Xho I se puede usar para clonar el gen de interés ras con el sitio de escisión Kex2 usando una solución de clonación mediante la PCR y un cebador directo apropiado para reconstruir la secuencia a partir del sitio Xho I en el codón de la arginina. La proteína recombinante de interés se expresará a continuación con un extremo NH₂ natural.

50 (b) construcción del vector de expresión del microplasminógeno

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína del microplasminógeno humano (aminoácidos 543 a 791 (SEQ ID NO: 4)) se amplificó ("rescate mediante la PCR") a partir del vector Fmyc- μ Pli (Lasters y col. en Eur. J. Biochem. 244: 946, 1997) usando la mezcla Advantage de la ADNc polimerasa comercializada por Clontech (Palo Alto, California). Después de la etapa de desnaturalización de un molde de ADN de 3 minutos a 94 °C, se llevaron a cabo 30 ciclos de ciclación térmica (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 50 °C, 30 segundos a 72 °C), seguidos por una etapa final de alargamiento de 2 minutos a 72 °C. Se usaron en esta reacción los siguientes cebadores de oligonucleótidos LY-MPLG1 (de sentido directo) y LY-MPLG2 (de sentido contrario):

60 LY-MPLG1: 5'GGGGTATCT CTC GAG AAA AGA GCC CCT TCA TTT GAT TG (SEQ ID NO: 1)

LY-MPLG2: 5' GTTTTTGT TCT AGA TTA ATT ATT TCT CAT CAC TCC CTC (SEQ ID NO: 2)

El cebador LY-MPLG1 tenía una región de hibridación que correspondía a los restos 543-548 del plasminógeno humano (Ala-Pro-Ser-Phe-Asp-Cys) precedida por una extensión sin hibridación que incluía los últimos cuatro restos

de la señal correspondiente al factor α (Leu-Glu-Lys Arg). En esta extensión, los codones Leu-Glu determinan el sitio de restricción Xho I (subrayado) que permite la clonación del gen ras de interés con el sitio de escisión Kex2. El cebador LY-MPLG2 tuvo una región de hibridación que correspondía a los últimos siete restos del plasminógeno, seguidos por un codón TAA de detención y una región sin hibridación que correspondía a la secuencia de reconocimiento Xba I (subrayada).

El fragmento amplificado que tenía el tamaño esperado (~ 780 pb) se digirió por Xho I y Xba I, y se clonó direccionalmente en el vector pPICZ α A. Se preparó un fragmento del vector receptor mediante la restricción por Xho I y Xba I, y se purificó a partir de gel de agarosa usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen GmbH, Alemania). La cepa TG1 de *E. coli* (DSMZ, nº de colección 1208, Alemania) se transformó con la mezcla de ligadura, y se seleccionaron los clones resistentes a la zeocina. Basándose en el análisis de restricción, se retuvo un clon del plásmido que contenía una inserción del tamaño esperado durante la caracterización adicional. La determinación de la secuencia del vector pPICZ α -MPLG1 (clon nº 5) usando los cebadores 5'AOX y 3'AOX, que se proporcionaron en el kit de expresión de Pichia EasySelect de Invitrogen Corporation (Carlsbad, California), confirmó la inserción precisa de la región de codificación del microplasminógeno fusionada a la señal de correspondencia del factor α , así como la ausencia de mutaciones no deseadas en la región de codificación.

La secuencia de nucleótidos determinada y la secuencia de aminoácidos deducida del microplasminógeno humano usadas se representan en la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, respectivamente. En comparación con la secuencia anteriormente determinada por Forsgren y col. en FEBS Lett. 213: 254, 1987, la secuencia de nucleótidos difiere en 10 posiciones. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos era idéntica.

(c) Construcción del vector de expresión del miniplasminógeno

Se construyó un vector de secreción derivado de pPICZ α como sigue, para la expresión del miniplasminógeno, haciendo uso del vector pPICZ α -MPLG1 anteriormente descrito en la presente memoria descriptiva.

Un fragmento de ADN de 500 pb que codificaba cinco dominios en rosquilla y parte del dominio catalítico de la proteína del miniplasminógeno (aminoácidos 444 a 604 de SEQ ID NO: 10) se amplificó ("rescate mediante la PCR") a partir del vector FdTet-SN-miniPlg (Lasters y col., citado *más arriba*). Después de una etapa de desnaturalización del molde de ADN de 3 minutos a 94 °C, se llevaron a cabo 30 ciclos de ciclación térmica (10 segundos a 94 °C, 10 segundos a 50 °C, 15 segundos a 72 °C), seguidos por una etapa final de alargamiento de 2 minutos a 72 °C. Los siguientes cebadores LY-MINPLG1 (de sentido directo) y LY-MINPLG2 (de sentido contrario) se usaron en esta reacción:

LY-MINPLG1: 5'GGGGTATCT CTC GAG AAA AGA GCA CCT CCG CCT GTT GTC CTG CTT CC (SEQ ID NO: 5)

LY-MINPLG2: 5' GCA GTG GGC TGC AGT CAA CAC CCA CTC (SEQ ID NO: 6)

El cebador LY-MINPLG1 tenía una región de hibridación que correspondía a los restos 444-452 del plasminógeno (Ala-Pro-Pro-Pro-Val-Val-Leu-Leu-Pro) precedida por una extensión sin hibridación que incluía los últimos cuatro restos de correspondencia del factor (Leu-Glu-Lys-Arg). En esta extensión, los codones Leu-Glu determinan el sitio de restricción Xho (subrayado) que permite la clonación del gen ras de interés con el sitio de escisión Kex2.

El cebador LY-MINPLG2 tenía una región de hibridación que correspondía a los restos 596-604 del plasminógeno humano (Glu-Trp-Val-Leu-Thr-Ala-Ala-His-Cys). Esta región de hibridación del dominio catalítico, presente también en el vector de expresión del microplasminógeno, comprende una única secuencia de reconocimiento Pst I (subrayada).

El fragmento amplificado que tenía el tamaño esperado se digirió por Xho I y Pst I, y se clonó direccionalmente en el fragmento del vector receptor derivado de pPICZ α -MPLG1 (descrito anteriormente). El fragmento del vector receptor se preparó mediante la restricción con Xho I y Pst I, y se purificó a partir de gel de agarosa usando el kit de extracción en gel Qiaquick (Qiagen GmbH, Alemania). La cepa TG1 de *E. coli* DSMZ nº de colección 1208, Alemania) se transformó con la mezcla de ligadura, y se seleccionaron los clones resistentes a la zeocina. Basándose en el análisis de restricción, se retuvo un clon del plásmido que contenía una inserción del tamaño esperado para la caracterización adicional. La determinación de la secuencia del vector pPICZ α -KMPLG1 (clon nº 3), usando los cebadores 5'AOX y 3'AOX, confirmó la precisa inserción del fragmento amplificado fusionado con la señal correspondiente al factor α , así como la ausencia de cualquier mutación en la región clonada.

Ejemplo 2

Método de preparación de microplasma recombinante estabilizada

(a) Transformación de Pichia con pPICZ α -MPLG1

Se digirieron diez µg del vector pPICZα-MPLG1 con Pme I, que linealizó el vector en la región 5' AOX1. Se precipitó el ADN y se concentró a aproximadamente 0,33 µg/µl en agua destilada estéril, y se usaron 5 µl para transformar células X33 competentes de *Pichia pastoris* preparadas de acuerdo con el manual proporcionado en el kit de expresión de Pichia EasySelect.

5

(b) Selección de una cepa de elevada expresión

Se llevó a cabo la selección de una cepa de elevada expresión de la siguiente forma. Se seleccionaron los transformantes resistentes a zeocina en placas YPDSZ (extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 %, glucosa al 2 %, sorbitol 1 M, agar al 2 %, 100 µg/ml de zeocina). Se inocularon treinta y cuatro colonias individuales en medio BMYZ-glicerol (extracto de levadura al 1 %, peptona al 2 %, glicerol al 1 %, fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, nitrógeno base de levadura al 1,34 %, biotina al 4×10^{-5} %, 100 µg/ml de zeocina) en tubos Falcon de 50 ml y se cultivaron durante 16 horas a 30 °C. Las células se aglomeraron y se volvieron a suspender en 2 ml de medio BMYZ-metanol (igual que BMYZ-glicerol pero con metanol al 0,5 % en vez de glicerol) para inducir la expresión a partir de promotor AOX1 y se cultivaron durante 40 horas. Durante este periodo, se suministraron a los cultivos 4 pulsos de metanol al 0,5 % (después de 6, 22, 26 y 30 horas). Al final de la inducción del cultivo, se estimó la presencia del microplasmínógeno en el sobrenadante del cultivo tal como se describe en Lijnen y col. en Eur. J. Biochem. 120: 149, 1981. De manera breve, los sobrenadantes puros o diluidos 10 veces se incubaron con uroquinasa durante 30 minutos para activar el microplasmínógeno a microplasma. La actividad de la microplasma generada, tal como se determinó por su actividad amidolítica medida con el sustrato cromógeno S2403 (disponible de Chromogenix, Antwerp, Bélgica) en diferentes momentos, se comparó con la actividad de cantidades conocidas de preparaciones de plasmina o microplasma purificadas. El clon X33-MPLG1 n° 5, que mostró la actividad más elevada de la microplasma después de la activación con la uroquinasa, se seleccionó para la posterior producción a gran escala. Este clon se depositó bajo las condiciones del Tratado de Budapest con las Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (COLECCIÓN (BCCM-MUCL) el 12 de diciembre de 2001 con el Número de Acceso MUCL 43676.

10

15

20

25

(c) Fermentación

Se llevó a cabo la fermentación de X33-MPLG1 n° 5 a una escala de 50 litros en cuatro etapas de la siguiente forma. Se llevaron a cabo cultivos de células en matraces de dos litros durante 23 horas a 30 °C en 400 ml de YSG+ (6 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de peptona soja, 20 g/l de glicerol) usando un inóculo de 0,7 ml (del vial del banco de células con el número glicerol OOC17) y con una agitación de 270 rpm, dando como resultado (al término de la etapa del precultivo) una DO600 de 15. A continuación se llevó a cabo la fermentación en un dispositivo de fermentación MRP80 en 30 l de medio basal (26,7 ml/l de H₃PO₄ al 85 %, 1,05 g/l de CaSO₄.2H₂O, 18,2 g/l de K₂SO₄, 14,9 g/l de MgSO₄.7H₂O, 4,13 g/l de KOH, 40 g/l de glicerol al 100 % y 4,76 ml/l de una disolución salina de PTM1 [que comprendía 6 g/l de CuSO₄.5H₂O, 0,08 g/l de NaI, 3,36 g/l de MnSO₄.H₂O, 0,2 g/l de NaMoO₄.2H₂O, 0,02 g/l de ácido bórico, 0,82 g/l de CoCl₂.6H₂O, 20 g/l de ZnCl₂, 65 g/l de FeSO₄.7H₂O, 0,2 g/l de d-biotina y 5 ml/l de HSSO₄]), usando un inóculo de 600 ml a 30 °C con un flujo de aire de 50 l/min a presión atmosférica, oxígeno disuelto (OD) > 20 % y agitación a 200-500 rpm, manteniéndose el pH a 5,8 con amoníaco al 12,5 %. A las 24 horas y a una DO 600 de 50 (al final de la etapa discontinua), se evidenció el agotamiento del glicerol mediante un rápido aumento del oxígeno disuelto. La alimentación de glicerol (632 g/l de glicerol al 100 % y 12 ml/l de PTM1) aumentó la DO 600 hasta 258 en 24 horas. A continuación se llevó a cabo la alimentación de metanol con un flujo creciente de hasta 250 ml/h en 6 horas, que se mantuvo durante 66 horas usando 988 ml/l de metanol y 12 ml/l de PTM1 hasta alcanzar una DO 600 de 352 al término del cultivo. La fermentación de X33-MPLG1 n° 5 a una escala de 350 litros proporcionó resultados proporcionalmente similares.

30

35

40

45

(d) Purificación

A continuación se purificó la cosecha en un proceso en tres etapas que comprendía una cromatografía en lecho expandido con intercambio catiónico, cromatografía hidrófoba y cromatografía de afinidad como sigue:

50

i) Cromatografía de lecho expandido con intercambio catiónico

Se llevó a cabo la cromatografía de adsorción de lecho expandido con intercambio catiónico con Streamline SP (disponible de Pharmacia Biotechnology, N° de Cat. 17-0993-01/02) empaquetada en una columna Streamline 200 (Pharmacia Biotechnology N° de Cat 18-1100-22) con un volumen de lecho de 5.120 cm³, expandido y equilibrado aplicando un flujo ascendente de NaCl 1 M, tampón de acetato de sodio 25 mM (CH₃COONa.3 H₂O), pH 6,0, para dos volúmenes de columna seguidos de volúmenes de columna de tampón de acetato de sodio 25 mM, pH 6,0. El caldo de fermentación se diluyó en línea (7x) con agua y se pasó de manera ascendente a través del lecho expandido a un caudal de 1000 ml/min. El material poco adherido se retiró mediante lavado en flujo ascendente de tampón de acetato de sodio 25 mM pH 6,0. A continuación se bajó el adaptador de la columna hasta la superficie del lecho sedimentado a una altura de 16,3 cm. Se invirtió el flujo y se eluyeron las proteínas capturadas con 2 volúmenes de columna de NaCl 0,5 M, tampón de acetato de sodio 25 mM, pH 6,0. Se añadió sulfato de amonio sólido a la fracción Streamline eluida hasta alcanzar una saturación del 30 % (164 g de sulfato de amonio por litro de fracción Streamline eluida) y se agitó la mezcla suavemente a 4-8 °C durante 1 hora.

55

60

65

ii) Cromatografía hidrófoba

Se llevó a cabo la cromatografía hidrófoba con Hexyl TSK 650C (disponible de Tosoh-Haas N° de Cat. 19027) empacitada en una columna Vantage 180/500 (disponible de Millipore, N° de Cat. 87018001) con un volumen empacitado de 2.700 cm³ a 4-8 °C. La fracción streamline eluida se introdujo en la columna a un caudal de 38 l/hora. A continuación se lavó la columna con 1,5 volúmenes de columna de tampón de acetato de sodio 25 mM, pH 6,0, que contenía 164 g/l de sulfato de amonio y se eluyó de la columna con 7 volúmenes de columna de tampón de acetato de sodio 25 mM, pH 6,0.

iii) Cromatografía de afinidad

Se llevó a cabo la cromatografía de afinidad con Blue Sepharose 6 Fast Flow (disponible de Pharmacia Biotechnology, N° de Cat. 17-0948-02/03) empacitada en una columna Vantage 130/500 (disponible de Millipore, N° de Cat. 87013001) con un volumen empacitado de 3.186 cm³ a 4-8 °C. La fracción eluida se introdujo en la columna a un caudal de 20 l/hora, y se lavó con un volumen de columna de hidrogenofosfato de sodio 25 mM tampón (Na₂HPO₄·12 H₂O), pH 7,0. La fracción de proteína del microplasminógeno se eluyó de la columna con 5 volúmenes de columna de NaCl 0,5 M, tampón de hidrogenofosfato de disodio 25 mM, pH 7,0, y se mantuvo congelada a -20 °C. La pureza del material estuvo por encima del 98 % tal como se demostró mediante la electroforesis en gel SDS.

*(e) Activación cuantitativa y estabilización de microplasma*i) Activación cuantitativa

Se llevó a cabo la activación del microplasminógeno a microplasma a 23 °C durante 30 minutos a una relación molar de 0,5 % para una variante SY162 de estafiloquinasa en NaCl 0,5 M, tampón de hidrogenofosfato de disodio 25 mM (Na₂HPO₄·12 H₂O), pH 7,0. SY162 es una variante de estafiloquinasa con inmunogenicidad reducida que comprende 12 sustituciones de aminoácidos (K35A, E65Q, K74R, E80A, D82A, T90A, E99D, T101S, E108A, K109A, K130T y K135R) en comparación con la natural, tal como se describe por el documento WO 99/40198. Se añadió sulfato de amonio sólido a la microplasma a una concentración final de 1 M (132 g/l) y se agitó la mezcla a 4 – 8 °C durante 15 minutos.

ii) Cromatografía hidrófoba

Se llevó a cabo la cromatografía hidrófoba con Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (disponible de Pharmacia Biotechnology, N° de Cat. 17-0965-03/05) empacitada en una columna BPG 100/500 (disponible de Pharmacia Biotechnology, N° de Cat. 18-1103-01) que tenía un volumen empacitado de 1,738 cm³, equilibrada con 4 volúmenes de columna de tampón Na₂HPO₄·12 H₂O 25 mM, pH 7,0, que contenía 0,1 M del agente estabilizante, ácido tranexámico (disponible de Bournonville Pharma, Braine-L'Alleud, Bélgica) y (NH₄)₂SO₄ 1 M pH 7,0, a 4-8 °C. El producto activado se introdujo en la columna a un caudal lineal de 18 l/hora y se lavó con 4,5 volúmenes de columna con el tampón Na₂HPO₄·12 H₂O 25 mM, pH 7,0, que contenía ácido tranexámico 0,1 M y (NH₄)₂SO₄ 1 M. La microplasma se eluyó de la columna a un caudal lineal de 6 l/hora con 5 volúmenes de columna del tampón Na₂HPO₄·12 H₂O 25 mM, pH 7,0, que contenía ácido tranexámico 0,1 M y (NH₄)₂SO₄ 0,7 M, y se equilibró con solución salina tamponada con fosfato que contenía ácido tranexámico 0,1 M. Se eluyó la variante SY162 de estafiloquinasa de la columna con el tampón Na₂HPO₄·12H₂O 25 mM, pH 7,0 que contenía ácido tranexámico 0,1 M. Este procedimiento eliminó más del 99 % de la estafiloquinasa procedente del pico de la microplasma tal como se demostró con un ensayo ELISA específico.

iii) Concentración y diafiltración mediante ultrafiltración tangencial

En esta etapa, se concentró el eluato de la etapa (ii) y se intercambió el tampón por el tampón de ácido cítrico a pH bajo. Se eliminó el ácido tranexámico de la etapa (ii) durante esta etapa y se estabilizó la microplasma mediante el tampón de ácido cítrico a pH bajo.

Se llevó a cabo la ultrafiltración con 2 membranas Pellicon 2 Biomax (5 kDa, 2,5 µm, disponible de Millipore, Bedford, Massachusetts, N° de Cat. P2B005A25) a 2-8 °C. Las membranas se montaron en un Pellicon 2 Process Holder conectado a un Microgon Pump Cart System (disponible de Microgon, Laguna Hills, California). Se lavaron las membranas con agua purificada y se probó la integridad de la membrana antes del funcionamiento. Se llevó a cabo la sanitización mediante recirculación continua con NaOH 0,5 M durante 60 minutos y con NaOH 0,1 M durante 60 minutos. La etapa de sanitización limpió en profundidad la membrana para eliminar cualquier traza potencial de proteína que quedara en la membrana antes de aplicar la muestra. A continuación se enjuagaron las membranas con ácido cítrico 5 mM, pH 3,1, hasta que el permeato alcanzó un pH de 3,1. El pH del eluato de Phenyl Sepharose se ajustó a 3,1 y se concentró la proteína a 4 mg/ml mediante ultrafiltración. Se llevó a cabo la diafiltración durante 60 a 90 minutos frente a 5 volúmenes de ácido cítrico 5 mM, pH 3,1. En la tabla 2 se resumen los resultados (expresados en gramos) de tres ciclos llevados a cabo en un fermentador de 50 litros.

Tabla 2

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
Fermentador	220	240	ND
Streamline	50	79	130
Hexilo	36	37	ND
Blue	25	28	30
Fenilo	17	20	26
Diafiltración	-	-	22

(Clave: ND: no determinado)

5

iv) Filtración estéril (0,2 µm)

Esta etapa se llevó a cabo para asegurar la ausencia de contaminación microbiana.

- 10 Se añadió manitol a 2-8 °C a una concentración de 1,5 g/g de proteína y se llevó a cabo la filtración estéril a 23 °C en un filtro Millipak 100 (tamaño 500 cm²) (disponible de Millipore, N° de Cat. MPGL10CA3) y se enjuagó con aproximadamente 500 ml de ácido cítrico 5 mM, pH 3,1, con una bomba peristáltica a un caudal de 500 ml/minuto. Se recogió el filtrado en una bolsa esteril y exenta de pirógenos y se almacenó a -20 °C.

15 Ejemplo 3

Método de preparación de miniplasmina recombinante estabilizada

- 20 Aproximadamente 15 µg del vector pPICZα-KMPLG se digirieron en una reacción de 20 µl con Pme I, que linealizó el vector en la región 5' AOX1 El ADN lineal (3 µg) se usó para transformar células X33 de *Pichia pastoris* competentes preparadas de acuerdo con el manual proporcionado con el kit de Expresión de *Pichia EasySelect*.

- 25 Se llevó a cabo la selección de una cepa de elevada expresión esencialmente de la siguiente forma. Se seleccionaron los transformantes resistentes a zeocina en placas YPDSZ (tal como se define en el ejemplo 2). Se inocularon cincuenta colonias aisladas en 15 ml de medio BMYZ-glicerol (tal como se define en el ejemplo 2) en tubos Falcon de 50 ml y se cultivaron durante 16 horas a 30 °C. Se aglomeraron las células y se volvieron a suspender en 1,5 ml de medio BMYZ-metanol (tal como se define en el ejemplo 2) para inducir la expresión procedente del promotor AOX1, y se cultivaron durante 40 horas. Se suministraron regularmente 3 o 4 pulsos de metanol al 0,5 % a los cultivos durante este periodo. Al término de la inducción del cultivo, se estimó la presencia de plasminógeno en el sobrenadante del cultivo tal como se describe por Lijnen y col. (citado *más arriba*). De manera breve, se incubó el miniplasminógeno con estreptoquinasa en sobrenadantes diluidos 10 veces durante 10 minutos para formar un complejo activo. La actividad de la miniplasmina generada, tal como se determinó con el sustrato cromógeno S2403 (véase el ejemplo 2) en diferentes momentos, se comparó con la actividad de cantidades conocidas de una preparación purificada de plasminógeno. En estas condiciones, todos los clones ensayados produjeron miniplasminógeno con rendimientos que variaban entre 3 y 15 mg/l. se seleccionaron los dos clones X33-KMPLG1 n° 6 y X33-KMPLG1 n° 25, que mostraban la actividad más elevada de la plasmina para la posterior producción a gran escala. Estos dos clones se depositaron bajo las condiciones del Tratado de Budapest con las Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (COLECCIÓN BCCM-MUCL) el 4 de diciembre de 2003 y se ha acordado el Número de Acceso MUCL 45309 (clon X33-KMPLG1 n° 6) y el Número de Acceso MUCL 45308 (clon X33-KMPLG1 n° 25).

Ejemplo 4

Método de fijación novedoso

- 45 Este método se llevó a cabo para establecer una técnica de fijación que fuera fiable para investigar los efectos de los medios y de diferentes agentes en el desprendimiento posterior del vítreo (PVD) en ojos de porcino normales.

- 50 Ojos de porcino recién aislados obtenidos del matadero bien se procesaron inmediatamente o bien se dejaron asentar a temperatura ambiente durante hasta 6 horas. Se retiró la córnea para facilitar la fijación. Se fijaron los ojos en solución de Peter (glutaraldehído al 1,25 %/paraformaldehído al 1 % en tampón cacodilato 0,08 M pH 7,4) a 0 °C durante 24 a 36 horas para detener las reacciones enzimáticas. A continuación se lavaron los ojos con tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 y se deshidrataron progresivamente en concentraciones progresivamente crecientes de etanol hasta el 100 %.

55

Ni los ojos recién procesados ni los ojos que se dejaron asentar durante 6 horas mostraron ningún cambio significativo en la ultraestructura de la retina, y el vítreo permaneció unido a la superficie de la retina. De esta manera, este método proporciona un procedimiento no traumático de fijación del tejido del ojo y minimiza la posibilidad de la separación del vítreo de la superficie de la retina. Además, este procedimiento permite el estudio de la superficie completa de la retina, desde el nervio óptico a la periferia de la retina.

Ejemplo 5

Efecto de la microplasma en la interfase vitreoretinal en ojos de porcino post-mortem

Este experimento se llevó a cabo para determinar la capacidad de la microplasma de desinsertar la corteza posterior del vítreo de la membrana limitante interna de la superficie de la retina.

Se usó microplasma a las siguientes dosis: 0,0625, 0,125, 0,156, 0,25 y 0,390 mg, en un volumen de 0,1 ml de la solución de irrigación intraocular, BSS PLUS@. El pH de estas disoluciones de microplasma varió desde 7,92, para la dosis de 0,0625 mg a 6,52 para la dosis de 0,390 mg.

Las disoluciones de microplasma dadas a conocer anteriormente se inyectaron por separado en el humor vítreo de ojos obtenidos de cerdos recién sacrificados a temperatura ambiente (24 °C). Los ojos se fijaron tal como se describe en el ejemplo 4, después de 15 minutos, 60 minutos o 120 minutos tras la inyección de la microplasma. Se observó el desprendimiento posterior del vítreo después de 1 hora de tratamiento con 0,0625 mg de microplasma, mientras que el PVD fue visible entre aproximadamente 30 minutos después de la inyección de todas las dosis incluyendo y por encima de 0,125 mg de microplasma. Este desprendimiento fue más evidente alrededor de 120 minutos después de la inyección (figura 4, panel A), en todas las secciones de la superficie de la retina, excepto cerca de la base del vítreo (la zona que se extiende desde la periferia de la retina a la ora serrata en la que la adhesión del vítreo es fuerte). Además del desprendimiento posterior del vítreo (figura 4, paneles B-E), el microscopio electrónico mostró que la estructura del vítreo se alteró para tener presente menos estructura fibrilar. La estructura fibrilar se modificó a una más amorfa, con consistencia de vidrio esmerilado, que indica la licuefacción del humor vítreo (figura 4, panel F).

Dosis inferiores de 0,25 mg no dieron como resultado ninguna toxicidad ocular o retinal, tal como se determinó mediante el examen grosero o la histopatología, que incluía el microscopio electrónico. En particular, no hubo signos de autólisis. Se observó a menudo la vacuolación de las células como un signo inicial de autólisis y en las dosis inferiores de 0,390 mg, no se observó vacuolación. Los inventores examinaron también otras estructuras oculares mediante el microscopio electrónico (figura 5, paneles A y B). No se observaron alteraciones estructurales de la retina a dosis inferiores de 0,390 mg. Sin embargo, en unos pocos ojos tratados con 0,25 mg de microplasma, se distribuyeron de manera dispersa elevaciones de la retina y pequeños números de células inflamatorias en la superficie de la retina. La histología grosera del ojo tratado con dosis más altas de microplasma (0,390 mg), indicó que la interfase de la retina tuvo una apariencia blanquecina. El microscopio electrónico de este ojo desveló que existían múltiples elevaciones pequeñas en la superficie de la retina, lo que sugiere el desprendimiento localizado de la retina.

Estos experimentos muestran que la microplasma usada a una dosificación de 0,06 a 0,2 mg dio como resultado una separación consistente del hialoide posterior sin inducir ningún cambio estructural en la retina. La separación del hialoide posterior deja una superficie de la retina transparente y uniforme en la que no se reconocen fibras de colágeno usando microscopio de barrido electrónico de alta resolución (aumento de 12.000X), un aumento que es suficientemente elevado para excluir la posibilidad de fibras sin detectar.

Ejemplo 6

Desprendimiento posterior del vítreo en ojos humanos post-mortem

Este experimento se llevó a cabo para determinar si la microplasma podría inducir eficazmente la separación vitreoretinal en ojos humanos.

Métodos

(a) Dosificación y tratamiento de ojos humanos post-mortem

Veintiséis globos oculares humanos sin patología conocida del ojo se obtuvieron del banco de ojos de Múnich. Estos globos oculares se extrajeron de 13 donantes, cuyas edades variaron de 34 a 69 años, en las 19 horas después de su muerte. Tras cosechar la córnea usando un trépano con un diámetro de 14 mm, se incubaron los 26 globos oculares en una cámara de hidratación a 37 °C durante 15 minutos. A continuación se inyectaron 0,2 ml de microplasma en la cavidad del vítreo de treinta ojos. Específicamente, se diluyeron 1,25 mg de microplasma con 4 ml, 2 ml, o 1,5 ml de la disolución de irrigación intraocular, BSS PLUS@ para conseguir las concentraciones de 0,3125 mg/ml, 0,625 mg/ml, y 0,9375 mg/ml, respectivamente. Se inyectó un volumen total de 0,2 ml de estas

disoluciones en la cavidad del vítreo, dando como resultado una dosis final de 62,5 µg, 125 µg, y 188 µg de microplasma, respectivamente, en el interior del ojo. Los 13 ojos similares, que sirvieron como controles, recibieron una inyección de 0,2 ml de disolución salina equilibrada (BSS PLUS®).

- 5 De los 13 ojos tratados con microplasma, 9 ojos se trataron con una inyección intravítrea solo de microplasma. Se inyectó una dosis de 62,5 µg de microplasma (pH 7,4) en la cavidad del vítreo de dos ojos; se inyectó una dosis de 125 µg de microplasma (pH 7,2) en la cavidad del vítreo de 5 ojos; y se administró una dosis de 188 µg de microplasma (pH 7,2) en 2 ojos. De los 4 ojos restantes, dos se trataron con 62,5 µg de microplasma y 0,6 ml de hexafluoruro de azufre (SF₆) y dos se trataron con 125 µg de microplasma y 0,6 ml de hexafluoruro de azufre (SF₆). Se llevó a cabo tratamiento adicional con SF₆ debido a los informes previos de que la plasma induce solo el PVD en combinación con vitrectomía o inyección de gas. En la tabla 3 se resumen la dosificación y el tratamiento discutidos anteriormente.

15 Tabla 3

Número de ojos	Dosis de microplasma en µg	Tratamiento
2	62,5	Inyección intravítrea
5	125	Inyección intravítrea
2	188	Inyección intravítrea
2	62,5	Inyección intravítrea y tamponada con gas (0,6 ml de SF ₆)
2	125	Inyección intravítrea y tamponada con gas (0,6 ml de SF ₆)

- 20 Tras el tratamiento, se incubaron todos los ojos a 37 °C durante 30 minutos. Después de este tiempo, los globos oculares se colocaron en paraformaldehído al 4 %, y 0,1 ml de fijador (paraformaldehído al 4 %) se inyectó también en la cavidad del vítreo para detener la acción enzimática en el interior del ojo. Los globos oculares que se trataron con microplasma y SF₆ se fijaron con el polo posterior en posición hacia arriba.

(b) Microscopio de barrido y de transmisión electrónica

- 25 A continuación los globos se cortaron por la mitad a lo largo de la porción plana, y se descartó el segmento anterior. Un trépano de la córnea de 12,5 mm de diámetro se movió lentamente a través del vítreo y se perforó el polo posterior. A continuación se obtuvieron especímenes de retinas para el microscopio de barrido y de transmisión electrónica del polo posterior usando un trépano de la córnea de 4 mm de diámetro.

- 30 Los discos retinales para el microscopio de barrido electrónico se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 2 % (fijador de Dalton), se deshidrataron en etanol, se secaron al punto crítico, se revistieron en oro por sublimación catódica, y se fotografiaron usando un microscopio electrónico ISM-35 CF (JEOL®, Tokio, Japón).

- 35 Los especímenes para el microscopio de transmisión electrónica se fijaron posteriormente en fijador de Dalton, se deshidrataron, y se sumergieron en EPON™. Las secciones semifinas se tiñeron con azul de toluidina al 2 %. Las secciones ultrafinas se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se analizaron usando un microscopio electrónico Zeiss EM 9 (Zeiss, Jena, Alemania).

- 40 Dos observadores evaluaron independientemente las micrografías electrónicas. Cada observador evaluó el grado de separación vítreo retinal decidiendo si una red continua o discontinua de fibrillas de colágeno cubría la membrana limitante interna (ILM), o si fibrillas de colágeno individuales o dispersas estuvieron presentes en la ILM, o si la ILM estaba desprovista de cualquier fibrillas de colágeno (ILM desnuda).

Resultados

- 45 *(a) Microscopio de barrido electrónico*

- 50 El microscopio de barrido electrónico (SEM) de ojos humanos post-mortem inyectados con 62,5 µg de microplasma desveló un desprendimiento posterior del vítreo que dejaba una red discontinua de fibrillas de colágeno que cubrían la ILM (figura 6, panel A) El SEM de los ojos inyectados con 125 µg (figura 6, panel B) y 188 µg (figura 6, panel C) de microplasma respectivamente desveló una ILM desnuda consistente con la separación vitreoretinal completa. Estas dosis más altas dieron como resultado una ultraestructura similar a la de la interfase vitreoretinal.

- 55 En los ojos inyectados con 62,5 µg de microplasma y SF₆, se observaron restos del vítreo cortical que cubrían la ILM (figura 6, panel D). Sin embargo, en ojos inyectados con 125 µg de microplasma seguido por tamponados con

gas, se observó una separación vitreorretinal completa consistente con una ILM desnuda (figura 6, panel E).

En contraste con los ojos tratados con microplasma descritos anteriormente, los ojos del control no presentaron desprendimiento posterior del vítreo tal como se determinó mediante el SEM (figura 6, panel F). En la tabla 4 se resumen estos resultados.

Tabla 4

Dosis de microplasma en µg	Tratamiento	Grado de vítreo cortical residual	
		Ojos tratados	Ojos del control
62,5	Inyección intravítrea	++	+++
125	Inyección intravítrea	-	+++
188	Inyección intravítrea	-	+++
62,5	Inyección intravítrea y tamponado con gas	++	+++
125	Inyección intravítrea y tamponado con gas	-	+++

[Clave: +++ red continua de fibrillas de colágeno; ++ red discontinua de fibrillas de colágeno; + fibrillas de colágeno dispersas; - sin fibrillas de colágeno, ILM desnuda]

(b) microscopio de transmisión electrónica

La morfología intrarretinal de todos los ojos tratados con microplasma no cambió en comparación con los ojos del control. La ultraestructura de la ILM se preservó bien en los ojos tratados con microplasma (figura 7, panel A), en comparación con el ojo del control (figura 7, panel B).

Conclusión

Estos datos indican que la inyección intravítrea de microplasma puede inducir una escisión entre la corteza del vítreo y la membrana limitante interna del ojo humano sin vitrectomía o cualquier otra intervención quirúrgica. 125 µg de microplasma escinden la unión vitreorretinal humana en 30 minutos. En términos de acción enzimática, 125 µg de microplasma es la dosis equivalente de 2 U de plasmina (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania), que produjo la separación vitreorretinal completa en ojos de cerdos sacrificados y en ojos de donantes humanos. Estos datos muestran también que la aplicación de una burbuja de gas en el vítreo de un ojo tratado con microplasma no afecta la dosis necesaria para escindir la unión vitreorretinal.

Ejemplo 7

Análisis *in vivo* de desprendimiento posterior del vítreo inducido por microplasma

El objetivo de estos experimentos fue determinar la utilidad de la microplasma para el PVD *in vivo*.

Métodos

(a) El modelo felino

Los anatomistas y fisiólogos han estudiado extensamente la retina de felinos convirtiendo a ésta en un modelo útil para evaluar la seguridad farmacológica inducida por el PVD. Igual que en la retina humana, la retina del gato está dominada por bastoncillos y tiene una circulación intrarretinal, fuera de la fóvea. Esto difiere de la retina de conejo, que no tiene vasos intrarretinales. La retina interna del conejo está perfundida por vasculatura que descansa en la superficie de su vítreo, y esto limita el valor de los estudios experimentales en el conejo que se centran principalmente en la interfase vitreorretinal. Durante años, el modelo felino ha proporcionado datos de elevada calidad sobre las respuestas celulares de la retina al desprendimiento. De esta manera, los inventores han usado un modelo felino para estudiar la utilidad de la microplasma efectuando el PVD *in vivo*.

Cinco gatos domésticos adultos de edades comprendidas entre 12 y 23 meses se anestesiaron con una inyección intramuscular de 0,5 ml de ketamina (Ketaset, Park-Davis, Eastleigh, Reino Unido) y 0,3 ml de medetomida (Dormitor, Pfizer, Reino Unido). Los gatos anestesiados recibieron una inyección intravítrea de 14,5 µg o 25 µg de microplasma, mientras que el ojo compañero de cada gato recibió una inyección de disolución salina equilibrada (BSS-PLUS®) y sirvieron como controles. De los 5 gatos usados en este estudio, 3 gatos recibieron una inyección intravítrea de 25 µg de microplasma. Uno de estos gatos se sacrificó después de un día de recibir la inyección; el segundo se sacrificó después de 3 días y el tercero se sacrificó después de 3 semanas. Los dos gatos restantes se inyectaron con 14,5 µg de microplasma. De estos, uno se sacrificó después de 3 días mientras que el otro se

sacrificó después de 3 semanas.

(b) Microscopio electrónico de barrido y transmisión

5 Se retiraron los globos oculares de los gatos sacrificados, se fijaron y se procesaron para el microscopio electrónico tal como se ha descrito para los ojos humanos post-mortem en el ejemplo 6: Se evaluaron las micrografías electrónicas de manera independiente por dos observadores. Cada observador evaluó el grado de separación vítreorretinal decidiendo si una red continua o discontinua de fibrillas de colágeno cubría la ILM, o si fibrillas de colágeno individuales o dispersas estaban presentes en la ILM, o si la ILM se encontraba desprovista de cualquier
10 fibrilla de colágeno.

(c) Microscopio confocal

15 Los especímenes del ojo se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se orientaron en agarosa al 5 % (Sigma, St Louis MO, EE.UU.) preparada en PBS. Se cortaron secciones de cien micrómetros de espesor usando un vibratomo (Technical Products International, Polysciences, Warrington, PA, EE.UU.) y se incubaron en suero normal de burro (1:20; Dianova, Hamburgo, Alemania) en PBS que contenía albumina de suero bovino al 0,5 % (BSA; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EE.UU.), Triton X-100 al 0,1 % (Roche Boehringer, Mannheim, Alemania) y azida de sodio al 0,1 % (Sigma-Aldrich, Múnich, Alemania) (esta disolución de PBS que contenía BSA, Triton y azida se denomina PBTA) durante la noche a 4 °C en un dispositivo mecánico rotador. Tras la eliminación del suero de bloqueo, se añadieron anticuerpos primarios en seis conjuntos de parejas: proteína ácida fibrilar antiglial (GFAP; 1:500; DAKO, Hamburgo, Alemania) con anticólageno IV (1:50; DAKO); antivimentina (1:50; DAKO) con antifibronectina (1:400; DAKO); antisinaptofisina (1:50; DAKO) con antineurofilamento (1:25; DAKO); antilaminina (1:25; DAKO) con anti-CD 68 (1:50; DAKO); opsina antirrojo/verde (1: 100; Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) con antirrotopsina (1:200; Santa Cruz Biotech); opsina antiazul (1: 100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, EE.UU.) con antirrotopsina (1:200; Santa Cruz Biotech). En la tabla 5 se relaciona la especificidad de los anticuerpos usados.

Tabla 5

Anticuerpo	Especificidad
Proteína ácida fibrilar antiglial (GFAP) Antivimentina	Proteínas filamentosas intermedias de células de Müller
Antineurofilamento	Neurofilamentos en células ganglionares y en células horizontales
Antisinaptofisina	Vesículas sinápticas en capas plexiformes
Opsina antirrojo/verde. Opsina antiazul	Conos
Antirrotopsina	Bastoncillos
Antifibronectina Antilaminina	Fibronectina Laminina
Anticolágeno IV	Colágeno de tipo IV
Anti-CD68	Macrófagos

30 Después de incubación durante la noche a 4 °C, las secciones se enjuagaron en PBTA y se incubaron de nuevo durante la noche a 4 °C con el anticuerpo secundario. Se usaron anticuerpos secundarios de burro dirigidos contra ratón y de burro dirigidos contra conejo para cada combinación de anticuerpos primarios, conjugados con Cy2 o Cy3 (Dianova, Hamburgo, Alemania). Todos los anticuerpos secundarios se usaron a una dilución de 1: 100, y todos los anticuerpos se diluyeron en PBTA. A continuación se enjuagaron las secciones, se montaron en N-propil galato en glicerol y se visualizaron en microscopio confocal de barrido con laser (LSM 510, Zeiss, Alemania).

Resultados

40 *(a) Microscopio de barrido electrónico*

Un día después de la inyección intravitreal de 25 µg de microplasma, fibrillas de colágeno dispersas cubrieron la ILM (figura 8, panel A). Tres días después del tratamiento, 25 µg de microplasma dieron como resultado una separación vítreorretinal completa (figura 8, panel B); no hubo restos de fibrillas de colágeno que se mantuvieran en la interfase vítreorretinal. El ojo que recibió 14,5 µg de plasma desveló fibrillas de colágeno dispersas que cubrían la ILM 3 días después de la inyección (figura 8, panel C). 21 días después del tratamiento, con 14,5 µg (figura 8, panel D) y 25 µg de microplasma (figura 8, panel E), se observó una ILM desnuda. Todos los ojos del control similares tuvieron una densa red de fibrillas de colágeno que cubrían la retina (figura 8, panel F). En la tabla 6 se resumen estos datos.

50

Tabla 6

Dosis de microplasma en µg	Duración del tratamiento en días	Grado de vítreo cortical residual	
		Ojos tratados	Ojos del control
14,5	3	+	+++
14,5	21	-	+++
25	1	+	+++
25	3	-	+++
25	21	-	+++

[Clave: +++ red continua de fibrillas de colágeno; ++ red discontinua de fibrillas de colágeno; fibrillas de colágeno dispersas; - sin fibrillas de colágeno, ILM desnuda]

(b) Microscopio óptico y de transmisión electrónica

5 Con respecto a la citoarquitectura de la retina, no se observaron diferencias entre los ojos tratados con microplasma (figura 8, panel A) y los ojos del control (figura 9, panel B). La ultraestructura de la retina interna y de la ILM de los ojos tratados con microplasma (figura 9, paneles C y E) se preservaron bien en comparación con la retina interna y la ILM de los ojos del control (figura 9, paneles D y F).

(c) Microscopio de laser confocal

10 En los ojos tratados con microplasma y en los ojos del control, la porción del extremo inferior de las células de Müller se marcó claramente con anti-GFAP (figura 10, paneles A y B) y antivimentina (figura 10, paneles C y D). No se extendió la tinción de los procesos de las células de Müller más allá de la capa nuclear interna. No se observó tinción significativa con anticólageno IV y antifibronectina (no se muestran los datos). Esto puede estar relacionado con la especificidad de las especies de estos anticuerpos. La ILM se tiñó mediante antilaminina. Pocos macrófagos estuvieron presentes en los ojos tratados y los ojos del control. Los axones y las dendritas de las células ganglionares, las células horizontales, y la capa plexiforme interna y externa se marcaron claramente mediante antineurofilamentos y antisinaptofisina (figura 10, paneles E y F). La capa fotorreceptora se marcó mediante antineurofilamentos. No hubo diferencia entre los ojos tratados con microplasma (paneles A, C, E) y los ojos del control (figura 10, paneles B, D y F) en cualquier punto temporal del estudio, con respecto a cualquiera de los anticuerpos usados.

Discusión

25 Para evaluar el efecto de escisión de la microplasma en la interfase vitreoretinal in vivo, los inventores administraron dos dosis diferentes en la cavidad del vítreo de cinco gatos adultos. La primera dosis que los inventores usaron fue de 25 µg de microplasma, que es un quinto de la dosis que se encontró suficiente para inducir el PVD completo en ojos humanos post-mortem. De manera notable 25 µg de microplasma son equivalentes a 0,4 U de plasmina (Sigma), y clínicamente, se han aplicado 0,4 U de plasmina autóloga a la cavidad del vítreo de ojos humanos con agujeros maculares y retinopatía diabética. La segunda dosis de 14,5 µg de microplasma es equivalente a una dosis de 25 µg de microplasma en el ojo humano, si se ajusta para el volumen más pequeño del vítreo del ojo de gato (de manera grosera un 60 % del volumen del vítreo del ojo humano).

35 Tres días después de una aplicación intravitreal de 25 µg de microplasma en el ojo de gato, se produjo una separación vitreoretinal completa, mientras que un día después del tratamiento seguían presentes algunas fibrillas de colágeno en la interfase vitreoretinal. Esto indica que el efecto de la microplasma continúa más allá de las 24 horas y permanece en llamativo contraste con la rápida inactivación de la plasmina en sangre por su antagonista natural, la alfa-2-antiplasmina. Una razón para la longevidad de la actividad de la microplasma puede ser que la alfa-2-antiplasmina se satura por otro sustrato, o que la microplasma tiene una afinidad diferente por la antiplasmina antagonista en comparación con la plasmina. Otra posible razón podría ser que las rutas aguas abajo de la microplasma (por ejemplo, la activación de las colagenasas o la matriz de las metaloproteinasas) permanecen activas después que la microplasma se inactiva por la alfa-2-antiplasmina.

45 La citoarquitectura de la retina de los ojos tratados con microplasma no cambió en comparación con los ojos del control. En términos ultraestructurales, no hubo diferencias en la anatomía de la retina entre los ojos tratados con microplasma y los ojos del control. La ILM y la retina se preservaron bien en todos los especímenes. Adicionalmente los inventores no observaron ningún signo de reacción inflamatoria tras la inyección de microplasma. Específicamente, el microscopio electrónico y el microscopio de laser confocal no muestran ninguna evidencia de infiltración celular inflamatoria de la retina.

En el modelo felino, el desprendimiento de la retina produce una proliferación significativa de células de Müller y una regulación en exceso masiva de proteínas filamentosas intermedias en su citoplasma, tales como la proteína ácida

fibrilar glial (GFAP) y la vimentina. Esta respuesta de las células de Müller se conoce ampliamente como gliosis, y se supone que juega un papel clave en las respuestas celulares complejas de la retina al desprendimiento. En la retina normal, las células de Müller parecen quiescentes y expresan cantidades muy pequeñas de GFAP y vimentina. Sin embargo, incluso la vitrectomía sin inducción del desprendimiento de retina ha demostrado producir regulación en exceso de GFAP. Un trabajo reciente del grupo de los inventores demostró una marcada regulación en exceso de las proteínas filamentosas intermedias tras el intento de despegar la ILM en ojos de gatos (datos sin publicar). Estos datos apuntan a la elevada reactividad de las células de Müller en cualquier forma de trauma quirúrgico.

En el presente estudio, los inventores no observan ningún cambio en la reactividad de las células de Müller tras la inducción del PVD por la microplasmina. Además, no hubo diferencias entre los ojos tratados y los ojos del control con respecto a cualquier anticuerpo aplicado. El estado quiescente de las células de Müller en cualquier punto temporal del estudio en asociación con la estructura sin cambiar y la inmunorreactividad de la retina proporciona una evidencia experimental que apunta a la seguridad de la microplasmina en la inducción del PVD.

En conclusión, estos estudios muestran que la microplasmina es eficaz en la inducción del PVD *in vivo*. Adicionalmente, estos estudios indican que la microplasmina parece segura en que no se observaron alteraciones de la retina al nivel ultraestructural.

Ejemplo 8

Evaluación de los efectos de la microplasmina en vítreo de porcino mediante el uso de dispersión dinámica de luz

Este estudio se llevó a cabo para evaluar los efectos de la microplasmina (μ Pli) para caracterizar los efectos biofísicos de la μ Pli en el vítreo fresco de porcino post-mortem *in vitro* e *in situ* usando la técnica no invasiva de la dispersión dinámica de luz (DLS). La DLS proporciona información acerca de la dinámica de partículas y macromoléculas en disoluciones y suspensiones midiendo las fluctuaciones de tiempo en la intensidad de la luz dispersada.

En un experimento de DLS se observa un modelo moteado en fluctuación constante en el campo lejano cuando la luz pasa a través de un conjunto de pequeñas partículas suspendidas en un fluido (véase, Chu B., *Laser light scattering: Basic principles and practice*, Academic Press, Nueva York, 1991). Este modelo moteado es el resultado de la interferencia entre las rutas de la luz y fluctúa a medida que las partículas llevan a cabo movimientos aleatorios en el medio de dispersión en una escala temporal de $\geq 1 \mu$ s debido a las colisiones entre las mismas y las moléculas del fluido (movimiento browniano). En ausencia de interacciones partícula-partícula (dispersiones diluidas), la luz dispersada de las pequeñas partículas fluctúa rápidamente mientras que la luz dispersada desde las grandes partículas fluctúa más lentamente.

El equipo DLS construido para los estudios de los inventores proporciona información dinámica tal como el coeficiente de difusión, el tamaño, la intensidad de la dispersión, y la polidispersidad (medida de la heterogeneidad). En general, un aumento en los tamaños de partículas (desde nanómetros a unos pocos micrómetros) y un aumento en el número o la densidad de estas partículas da como resultado un aumento en la intensidad de la luz dispersada. La polidispersidad es una medida del número de grupos distintos de especies con diferente(s) tamaño(s). En una medida de la DLS se pueden identificar hasta tres grupos que difieren en el tamaño debido a que se difunden a diferentes escalas de tiempo (pequeñas partículas que se mueven más rápidamente y más grande que se mueven más lentamente). Por lo tanto, un cambio en la intensidad de la luz dispersada y en la polidispersidad puede complementar los datos del tamaño de partículas. Si después de la intervención farmacológica, los tamaños de partículas del vítreo disminuyen y la intensidad de la dispersión aumenta, entonces existe probablemente un creciente número de especies moleculares de tamaño más pequeño en la disolución, debido tanto a la rotura de especies moleculares más grandes, y/o, como en el caso de estos experimentos, una entrada de nanoesferas de poliestireno 20 nm que se excluyeron previamente debido a la estructura inherente del vítreo. Si la polidispersidad disminuye, entonces la explicación más probable es que exista una creciente homogeneidad en la población de especies moleculares en la muestra, indicadora de nuevo de la entrada de nanoesferas de poliestireno 20 nm que se excluyeron previamente. Las características más atractivas de la DLS son que no es invasiva, y cuantitativa, trabaja eficazmente para que los tamaños de partículas varíen desde unos pocos nm a unos pocos μ m, requiere pequeños volúmenes de muestras, y trabaja razonablemente bien para las dispersiones polidispersas o de múltiple tamaño (hasta de 2-3 componentes). Los datos presentados en la presente memoria descriptiva se analizaron usando las rutinas de distribución de tamaño acumuladas y exponenciales obtenidas de Brookhaven Instruments NY. Estos esquemas se han revisado por Stock y Ray (Stock R.S. y Ray W. H., *J. Polym. Sci.* 23: 1393, 1985). Como ejemplo, la figura 11 muestra una medida de la DLS típica en términos de una función de autocorrelación del tiempo o TCF para el vítreo completo de porcino (sistema polidisperso) y una disolución de nanoesferas de poliestireno de 20 nm de diámetro (sistema monodisperso).

Materiales y métodos

(a) *Fabricación de un equipo DLS para estudios del vítreo*

Se fabricó una nueva sonda DLS compacta de fibra óptica (Patente de los Estados Unidos N° 5.973.779) para los estudios del vítreo descritos en la presente memoria descriptiva. Comprende una pareja de lentes Selfoc GRIN con una anchura de la celda lenticular de 0,25, y tiene una profundidad de penetración de ~ 16 mm y un ángulo de dispersión de 160°. Una sonda de fibra óptica que comprende dos fibras ópticas monomodo y dos lentes GRIN proporciona un medio compacto y remoto de estudiar las características dinámicas de las macromoléculas en el ojo. Dos fibras ópticas monomodo, alojadas cada una en un marco de acero inoxidable, se montan en carcasas independientes de acero inoxidable. Se deja intencionalmente un hueco de aire entre el alojamiento de la fibra y el alojamiento de las lentes con el fin de producir un punto muy bien enfocado en el volumen de dispersión. Las dos fibras ópticas en sus alojamientos se alinean y fijan en una posición desviada del eje con las microlentes. Los dos alojamientos se colocaron en el interior de un tercer alojamiento (externo) fabricado de acero inoxidable, y el extremo posterior del alojamiento se cubrió con un tubo termocontráctil. Los dos extremos libres de las fibras ópticas se terminaron con conectores machos de tipo FC/PC para una fácil conexión al laser y al módulo fotodetector.

Los componentes principales de la configuración del experimento consisten en una sonda DLS de fibra óptica compacta (descrita anteriormente), un ordenador (Gateway PC 500S) que contiene una tarjeta correlacionadora digital (BI-9000 Brookhaven Instruments NY), y un laser de estado sólido de 1 mW con una longitud de onda de 635 nm (OZ Optics, Canadá), y un detector de cascada mediante fotodiodos (Perkin Elmer, Canadá). La sonda está montada en un conjunto óptico conectado mediante etapas de traducción controlado manualmente para acceder y dirigir la sonda a una localización deseada en el ojo.

Cada función de autocorrelación temporal (TCF) tarda 20 segundos en recopilarse (excepto para los estudios de cubeta filtrada que tarda 1 minuto). El tiempo de retraso de 5 microsegundos se mantiene constante para todas las medidas. Antes de comenzar el estudio del vítreo, el instrumento se ensayó enérgicamente para determinar su estabilidad, fiabilidad, y reproducibilidad usando dispersiones acuosas de patrones de poliestireno (nanoesferas de látex de 20 nm de diámetro).

(b) Dispersión dinámica de la luz del vítreo y problemas de viscosidad

La DLS es capaz de proporcionar una cuantificación objetiva de manera no invasiva del diámetro promedio de partículas suspendidas en una disolución, en este caso en el vítreo. Para calcular los tamaños de partículas de manera precisa es saber, tanto como, o suponer la viscosidad del disolvente. Tal como se ha mencionado anteriormente, no es posible actualmente medir de manera precisa la viscosidad de un fluido no Newtoniano, de esta manera, deben realizarse suposiciones. Dado que el vítreo tiene aproximadamente un 99 % de agua, es razonable adscribir la viscosidad del agua al vítreo. Para probar la validez de esta suposición, se realizan medidas de la DLS en el gel completo del vítreo, la subfracción del vítreo que no pasa a través de un filtro (gel), la subfracción del vítreo que pasa a través del filtro (sin gel), y la subfracción del vítreo que pasa a través de un filtro Millipore de 0,22 μm (el vítreo líquido). Estos estudios se llevaron a cabo en cubetas ópticas y se añadieron nanoesferas de poliestireno de 20 nm que difundían como un trazador de un diámetro conocido que es muy uniforme. Las medidas de la DLS en el vítreo completo y en todas las diferentes subfracciones dieron como consecuencia resultados similares que indicaban que la microviscosidad del vítreo es por tanto muy cercana a la del agua pura. La microviscosidad en el vítreo se refiere a la viscosidad del agua atrapada en la que las moléculas de hialuronano (HA) y los haces de colágenos están suspendidos. El movimiento browniano de las moléculas de HA es mucho más rápido que el de los haces de colágeno que tienen un tamaño bastante grandes en comparación con las moléculas de HA. En los espectros DLS, la información molecular del HA está incorporada en tiempos de retraso más rápidos (cortos) y el colágeno en tiempos de retraso más lentos (más largos). La información derivada se muestra en la(s) distribución(es) del tamaño de partículas.

(c) Reactivos

Se prepararon todas las disoluciones usando BSS PLUS® (ALCON Labs, Ft. Worth, TX). Se usó microplasma a una concentración de 4 mg/ml de disolución madre. Se añadieron nanoesferas de poliestireno (Bangs Laboratories, Fishers, IN) de 20 nm de diámetro y se suspendieron en agua desionizada doblemente destilada a una relación fija en todas las muestras, asegurando un número uniforme de nanoesferas en todas las muestras.

(d) Modelo a cielo abierto

Ojos frescos de porcino sin fijar (n=11) se sometieron a disección del segmento anterior mediante una incisión en la porción planar y una disección precisa del diafragma de la lente/iris desviada del vítreo anterior. Esta disección se llevó a cabo tan cerca de la cápsula de la lente posterior como fue posible, sin realizar incisión en este tejido. Los ojos se mantuvieron en un soporte con el segmento posterior hacia abajo.

Los especímenes se trataron con los controles y μPli a dosis de 0,08, 0,125, 0,4, 0,6 y 0,8 mg a temperatura ambiente colocando las disoluciones (300 μl) que contenían 60 μl de una disolución de nanoesferas de poliestireno 20 nm sobre la superficie anterior del cuerpo del vítreo expuesto. Se llevó a cabo la DLS en un único punto a lo largo del eje óptico central localizado 1, 2 y 4 mm por debajo de la interfase vítreo/aire. Cada 15 minutos se obtuvo una lectura de la DLS durante una duración de 90 a 360 minutos.

(e) Modelo de ojo cerrado

Se usó una aguja 30G para inyectar 300 μ l de disoluciones experimental y control que contenían nanoesferas de poliestireno y μ Pli a dosis de 0,0125, 0,025, 0,05, 0,125, 0,25, 0,5, 0,6, y 0,8 mg mediante una incisión por punción en la porción plana de ojos de porcino intactos (n = 39). Se incubaron los ojos en un soporte que mantuvo la córnea encima y el segmento posterior abajo (imitando la posición supina) a 37 grados Celsius durante tanto 30 como 120 minutos. Antes de colocar el ojo en el baño de agua a temperatura controlada (evitando en todo momento cualquier contacto entre el espécimen y el agua), y cada 15 minutos a partir de ese momento, se giró el ojo alrededor del eje óptico durante 10-15 segundos. Tras la incubación, los ojos se sometieron a escisión del segmento anterior mediante una incisión en la porción planar. Se llevó a cabo la DLS en diversos puntos (promedio 18,6, s.d. =11,8) a lo largo del eje óptico y a lo largo del eje horizontal (promedio = 30,8, s.d. = 18,0) a una profundidad de 4 mm por detrás de la interfase vítreo/aire.

15 Resultados*(a) Morfología molecular del vítreo de porcino*

Las medidas de la DLS del vítreo completo (intacto) obtenidas en múltiples puntos a lo largo del eje óptico de la copa ocular (segmento anterior diseccionado) demuestran hallazgos muy similares en todos los puntos desde 1,25 mm a 4,75 mm por debajo de la interfase aire-vítreo. Estos hallazgos son también similares a los obtenidos en el vítreo completo resecado colocado en una cubeta, en el vítreo residual retenido después de la filtración, y en la subfracción del vítreo que pasó a través del filtro. Todas las distribuciones mostraron el tamaño de partículas casi idéntico. El grupo de tamaños de partículas más grande (a la derecha) tiene un tamaño promedio de aproximadamente 1000 nm y representa colágeno principalmente. La distribución del tamaño de partículas más pequeña (a la izquierda) representa principalmente hialuronano (HA). Este modelo de distribución del tamaño de partículas fue el mismo en los ojos que recibieron la inyección de nanoesferas de poliestireno.

(b) Modelo a cielo abierto

La figura 12 muestra la TCF obtenida desde un punto 4 mm por debajo de la interfase aire/vítreo en 5 ojos de porcino diferentes y a partir de una disolución de nanoesferas de poliestireno 20 nm, para comparación. Se puede observar que cuando la dosis de μ Pli aumenta existe una disminución en la pendiente de la TCF con la desaparición del componente lento (especies moleculares más grandes) con una aproximación final a la TCF de las nanoesferas puras de 20 nm, es decir, todas las especies moleculares de tamaño más pequeño.

Los resultados de las medidas de la DLS (n=5) a una profundidad de 1 mm tras el tratamiento con diversas disoluciones a temperatura ambiente: tanto el placebo como 0,08 mg produjeron esencialmente el mismo rendimiento. Con una dosis de 0,125 mg se produjo una reducción de aproximadamente un tercio en el tamaño de partículas promedio global después de 210 minutos. Se produjo una reducción de aproximadamente un 80 % en el tamaño de partículas promedio después de 60 minutos y una casi completa reducción de los tamaños de partículas promedio (solo se detectaron nanoesferas de poliestireno de 20 nm) con la dosis de 0,6 mg.

A una medida de profundidad de 2 mm por detrás de la interfase aire/vítreo (n=3) se produjo una reducción de aproximadamente un tercio en el tamaño de partículas promedio global después de 180 minutos (no se muestran los datos). Incubar el espécimen a 37 grados Celsius y mantener esta temperatura durante las medidas de la DLS dio como resultado una reducción del 40 % en el tamaño de partículas promedio global tras el tratamiento con 0,5 mg de μ Pli durante 60 minutos en dos ojos separados en dos momentos diferentes. Las medidas de la intensidad total y las medidas de polidispersidad de todos estos especímenes apoyaron y corroboraron las determinaciones del tamaño de partículas.

(c) Modelo de ojo cerrado

Después de una incubación de 30 minutos a 37 grados Celsius con dosis de μ Pli que varían desde 0,0125 a 0,8 mg se produjeron cambios significativos a lo largo de los ejes ópticos y horizontales. En el eje óptico se produjo una disminución de siete veces en el tamaño de partículas promedio normalizado para la dosis más alta de 0,8 mg. La dosis de 0,125 mg dio como resultado una disminución en el tamaño de partículas promedio normalizado de aproximadamente un tercio después de 30 minutos. La dosis más baja de 0,0125 mg no parece tener ningún efecto significativo. A lo largo del intervalo completo de dosis, la disminución en el tamaño de partículas fue inversamente proporcional a la dosis de μ Pli (coeficiente de correlación = 0,93). Los datos se ajustaron a un ajuste de rutina lineal (línea recta). La intensidad total normalizada y las gráficas de polidispersidad apoyan la fiabilidad de estos datos. Las distribuciones del tamaño de partículas demuestran un cambio significativo a la izquierda en la distribución de tamaños de partículas con dosis crecientes de μ Pli. Esto sugiere que μ Pli es eficaz en la significativa debilitación y rotura de diversos enlaces químicos y en la lisis de la estructura macromolecular del vítreo. Se detectaron cambios similares a lo largo del eje horizontal.

Se produjeron también cambios significativos después de una incubación de 2 horas a 37 grados Celsius con dosis de μPli que variaron desde 0,0125 a 0,6 mg. A la dosis más alta, se produjo una disminución del 87,5 % en el tamaño de partículas promedio normalizados a lo largo del eje óptico. La intensidad de la dispersión normalizada y las gráficas de polidispersidad normalizadas corroboran estos datos. Las distribuciones del tamaño de partículas mostraron un cambio a la izquierda con dosis crecientes, que alcanzó proporciones significativas con las dosis más altas. Las medidas de la DLS a lo largo del eje horizontal a una profundidad de 4 mm mostraron resultados similares, con una disminución aproximada del 85 % en los tamaños de partículas promedios normalizados y los hallazgos que los apoyan sobre la intensidad de la dispersión normalizada y las gráficas de polidispersidad.

La comparación de los resultados a los 30 minutos y a las 2 horas demuestra un grado más extenso de rotura del tamaño de partículas con una incubación más larga. Considerar que a una dosis de 0,6 mg, el diámetro de partículas promedio normalizado fue aproximadamente del 20 % en la incubación a los 30 minutos de incubación y aproximadamente el 10 % a las 2 horas de incubación. De esta manera, hubo aproximadamente una disminución mayor de dos veces en el tamaño de partículas con una incubación más larga.

El parámetro primario que se deriva de las medidas de la DLS es el coeficiente de difusión. Un cambio en el coeficiente de difusión indica un cambio en la estructura macromolecular del vítreo en respuesta al tratamiento con μPli . Con las dosis crecientes de μPli existe un aumento en el coeficiente de difusión del vítreo. A lo largo del intervalo de dosis de μPli , los coeficientes de difusión fueron directamente proporcionales a la dosis de μPli . De esta manera, con dosis crecientes de μPli hubo una disminución de los coeficientes de difusión y, de manera similar a las determinaciones del tamaño de partículas, esta correlación fue estadísticamente significativa ($r = 0,93$).

Discusión

En este experimento, se usó la DLS para evaluar de manera no invasiva la estructura molecular en el vítreo midiendo los tamaños de partículas, la intensidad de la dispersión, y la polidispersidad. Los resultados mostraron que existen perfiles similares de la DLS en diversas localizaciones en el interior del vítreo completo. Los efectos más pronunciados de la microplasma fueron en el vítreo completo incubado a 37 grados C durante 30 min, especialmente a dosis más altas. Hubo una disminución sustancial en el tamaño de partículas promedio normalizado y se estableció una relación dosis-respuesta estadísticamente significativa. Esto sugiere que μPli podría ser útil como un auxiliar para la cirugía vitreorretinal, puesto que un marco de tiempo de 30 minutos es razonable para el efecto de un fármaco que no interfiere con las prácticas quirúrgicas actuales. En conexión con los datos en los ejemplos anteriores que sugieren que μPli induce dehiscencia en la interfase vitreorretinal, este fármaco parece conseguir los dos componentes deseados para la vitreólisis farmacológica: el desprendimiento posterior del vítreo y la rotura de las macromoléculas en el vítreo con el consiguiente aumento en los coeficientes de difusión del vítreo y la licuefacción en último extremo.

Ejemplo 9

Microplasma como auxiliar de la vitrectomía quirúrgica

Un paciente que presenta enfermedad vitreorretinal en el que está indicada la vitrectomía quirúrgica se trata con una inyección de microplasma antes del procedimiento de vitrectomía quirúrgica. El paciente se somete a un examen oftálmico completo para establecer un valor inicial de la salud ocular. El examen oftálmico incluye oftalmoscopia indirecta, biomicroscopio de lámpara de hendidura, examen periférico de la retina, medidas de la presión intraocular, sintomatología de agudeza visual (sin ayuda y con la mejor corrección), fotografía del fondo de ojo, angiografía de fluoresceína, electroretinografía, y medidas de barrido A.

Tanto hasta 30 minutos o hasta 1 día antes del comienzo de la vitrectomía, se inyectó en el ojo que se iba a tratar 0,025 a 0,125 mg de microplasma en 0,2 ml de la disolución de irrigación intraocular, BSS PLUS® u otra disolución de irrigación para promover la licuefacción del vítreo y/o inducir el desprendimiento posterior del vítreo.

Promoviendo la licuefacción del vítreo y/o el desprendimiento posterior del vítreo, la vitrectomía quirúrgica puede llevarse a cabo de manera más rápida y más fácil con menos trauma iatrogénico y riesgo de complicaciones quirúrgicas. Permitir la retirada más completa del vítreo puede disminuir también el riesgo de complicaciones postoperatorias tales como la vitreoretinopatía proliferativa.

Ejemplo 10

Tratamiento de la retinopatía diabética con microplasma

En este ejemplo, un paciente diabético que manifiesta retinopatía diabética se trata mediante inyección intravítrea de microplasma.

El paciente diabético se somete a un examen oftálmico completo para establecer un valor inicial de la salud ocular. El examen oftálmico incluye oftalmoscopia indirecta, biomicroscopio de lámpara de hendidura, examen periférico de la retina, medidas de la presión intraocular, sintomatología de agudeza visual (sin ayuda y con la mejor corrección), fotografía del fondo de ojo, angiografía de fluoresceína, electroretinografía, y medidas de barrido A.

5 Tras el examen preliminar, se proporcionó una inyección de microplasma al ojo del paciente afectado. Si están afectados ambos ojos, se pueden tratar por separado. Se inyectó el ojo que se iba a tratar con una dosis que variaba de 0,005 mg a 0,125 mg de microplasma en 0,05 a 0,2 ml de BSS PLUS® u otra disolución de irrigación intravítreamente para promover la licuefacción del vítreo.

10 Después del tratamiento, los ojos del paciente se examinaron periódicamente. La extensión de la retinopatía diabética presentada por el paciente se vigiló de manera continua a través de exámenes periódicos de la retina y angiogramas de fluoresceína para vigilar la extensión de las cuentas venosas, IRMA, isquemia de la retina, desprendimiento por tracción de la retina, hemorragia del vítreo, necesidad de vitrectomía, u otras complicaciones de la retinopatía diabética.

15 **Ejemplo 11**

20 Efecto de la microplasma en comparación con la plasma sobre la velocidad de difusión de la fluoresceína en ojos de cerdo post-mortem

La microplasma tiene aproximadamente un tercio del peso molecular de la plasma de longitud completa. Debido a su tamaño más pequeño, se espera que la microplasma se difunda más rápidamente en el vítreo que la plasma (Xu, J. y col., *citado más arriba*). Podría esperarse que la difusión más rápida conduzca a un efecto farmacológico más rápido. Se llevó a cabo el presente estudio con el fin de confirmar que la microplasma se difunde más rápidamente que la plasma, y que la microplasma es capaz de alterar el gel del vítreo.

25 Métodos

30 Se usaron ojos de porcino recién aislados obtenidos del matadero. En el primer experimento, se inyectó un ojo con microplasma (0,125 mg) y el ojo parejo con el vehículo del control (BSS-PLUS®). Tras mantener ambos ojos a temperatura ambiente durante 2 horas, se inyectaron a continuación ambos ojos con fluoresceína y se incubaron 30 minutos más. Se tomaron fotografías en los tiempos 0, 10, 20 y 30 minutos.

35 En el segundo experimento, se inyectaron los ojos con 0,125 mg (N=2) de microplasma o plasma 1U (suministrada por Sigma, N=2), y se incubaron a 37 grados Celsius durante 2 horas. A continuación se inyectaron los 4 ojos con fluoresceína y se incubaron durante 30 minutos más, con fotografías tomadas en los tiempos 0, 10, 20, y 30 minutos.

40 Resultados

En el primer experimento, en el ojo del control, no se observó virtualmente difusión de fluoresceína en el interior del vítreo (no se muestran los datos). Sin embargo, en el ojo tratado con microplasma, se observó una clara difusión de fluoresceína (no se muestran los datos).

45 En el segundo experimento, los ojos tratados con microplasma tuvieron una difusión de fluoresceína del 14 % y del 16 %, respectivamente, durante 20 minutos (figura 13), mientras que el ojo tratado con plasma tuvo una difusión de fluoresceína de menos del 10 % (figura 14).

50 Discusión

La microplasma demostró una clara difusión de la fluoresceína en comparación con el vehículo del control. Además, tal como se predijo basándose en el peso molecular de la microplasma, esta difusión de la fluoresceína fue de una mayor extensión que la observada con la administración de plasma de longitud completa. Estos hallazgos apoyan la predicción teórica de que la microplasma se difunde más rápidamente que la plasma. Estos hallazgos pueden tener beneficio clínico, permitiendo un efecto farmacológico más rápido.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende una proteína plasmina truncada que comprende un dominio catalítico de plasmina (TPCD) en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno, o una complicación de un trastorno, de un ojo de un sujeto, en el que el trastorno del ojo se selecciona entre el grupo que consiste en desprendimiento de la retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia diabética del vítreo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmitis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa, y cualquiera de sus combinaciones.
2. El uso de la reivindicación 1, en la que el TPCD tiene un peso molecular de menos de 40.000 daltons, entre 20.000 y 30.000 daltons, 26.500 daltons en forma reducida o 29.000 daltons en forma no reducida, o menos de 20.000 daltons.
3. El uso de la reivindicación 1, en la que dicho TPCD se selecciona entre el grupo que consiste en miniplasmina, miniplasmina estabilizada, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada recombinante, microplasmina, microplasmina estabilizada, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada recombinante, y una variante de microplasmina.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el tratamiento o la prevención da como resultado uno de los siguientes; reducción de la viscosidad del vítreo, licuefacción del vítreo, inducción del desprendimiento posterior del vítreo, aclaramiento o reducción de la sangre hemorrágica del vítreo y/o el humor acuoso, aclaramiento o reducción de las sustancias extrañas intraoculares procedentes del vítreo y/o el humor acuoso, aumento de la difusión de un agente o una composición administrados al vítreo y/o al humor acuoso, y disminución de la neovascularización extrarretinal, o cualquiera de sus combinaciones.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición es una disolución líquida.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el sujeto es un ser humano.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que, el tratamiento o la prevención se lleva a cabo en ausencia de vitrectomía, o en la que el tratamiento o la prevención se lleva a cabo como un auxiliar de la vitrectomía.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición comprende una cantidad eficaz de TPCD que se va a administrar por ojo en el intervalo de 0,005 mg a 0,2 mg.
9. Uso de una composición que comprende al menos dos TPCD en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto, en el que el trastorno del ojo se selecciona entre el grupo que consiste en desprendimiento de la retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia diabética del vítreo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmitis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa, y cualquiera de sus combinaciones.
10. El uso de la reivindicación 9, en la que al menos dos TPCD se seleccionan entre el grupo que consiste en miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada, microplasmina estabilizada recombinante, variantes de microplasmina y cualquiera de sus combinaciones.
11. Un kit para uso en un método de tratamiento o prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto un vítreo y/o un humor acuoso con una primera composición, y una segunda composición en la que el trastorno del ojo se selecciona entre el grupo que consiste en desprendimiento de retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia diabética del vítreo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmitis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa, y cualquiera de sus combinaciones, en el que el kit comprende una primera composición que comprende al menos un TPCD y una segunda composición que comprende al menos un TPCD.
12. El kit para uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que la primera composición que comprende al menos un TPCD y las segundas composiciones que comprenden al menos un TPCD se seleccionan entre el grupo que consiste en miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada,

microplasma estabilizada recombinante, variantes de microplasma y cualquiera de sus combinaciones.

5 13. El kit para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que la primera composición que comprende al menos un TPCD y la segunda composición que comprende al menos un TPCD se administran al sujeto en sustancialmente el mismo momento o en diferentes momentos.

14. Uso de una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos un TPCD en la preparación de un medicamento para uso en la realización de una vitrectomía en un sujeto.

10 15. El uso de la reivindicación 14, en el que dicho medicamento se usa antes de la vitrectomía, o se usa al mismo tiempo que la vitrectomía.

15 16. El uso de la reivindicación 14 o 15, en el que el TPCD se selecciona entre el grupo que consiste en miniplasma, miniplasma recombinante, miniplasma estabilizada, miniplasma estabilizada recombinante, variantes de miniplasma, microplasma, microplasma recombinante, microplasma estabilizada, microplasma estabilizada recombinante, variantes de microplasma y cualquiera de sus combinaciones.

17. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el sujeto es un ser humano.

20 18. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que se realiza la vitrectomía para tratar o prevenir un trastorno, o una complicación de un trastorno de un ojo, en el que el trastorno del ojo se selecciona entre el grupo que consiste en desprendimiento de retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia diabética del vítreo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmítis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa, y cualquiera de sus combinaciones.

25

30 19. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que se lleva a cabo la vitrectomía con un objetivo seleccionado entre el grupo que consiste en reducir la viscosidad del vítreo, licuificar el vítreo, inducir el desprendimiento posterior del vítreo, aclarar o reducir la sangre hemorrágica procedente del vítreo, aclarar o reducir las sustancias extrañas intraoculares procedentes del vítreo, aclarar o reducir los materiales tóxicos en la retina, aumentar la difusión de un agente o una composición administrados en el vítreo y/o el humor acuoso, disminuyendo la neovascularización extrarretinal y cualquiera de sus combinaciones.

35

20. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que el medicamento es una disolución líquida.

40 21. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en el que se va a administrar una cantidad eficaz de TPCD por ojo en el intervalo de 0,005 mg a 0,2 mg.

45 22. Una composición que comprende una proteína plasmína truncada que comprende un dominio catalítico de la plasmína (TPCD) para el uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, de un ojo de un sujeto, en el que el trastorno del ojo se selecciona entre el grupo que consiste en desprendimiento de retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia diabética del vítreo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmítis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa, y cualquiera de sus combinaciones.

50 23. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en la que el TPCD tiene un peso molecular de menos de 40.000 daltons, entre 20.000 y 30.000 daltons, 26.500 daltons en forma reducida o 29.000 daltons en forma no reducida, o menos de 20.000 daltons.

55 24. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 22, en la que dicho TPCD se selecciona entre el grupo que consiste en miniplasma, miniplasma estabilizada, miniplasma recombinante, miniplasma estabilizada recombinante, microplasma, microplasma estabilizada, microplasma recombinante, microplasma estabilizada recombinante, y una variante de microplasma.

60 25. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 que comprende además al menos un segundo agente.

65 26. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el segundo agente se selecciona entre el grupo que consiste en hialuronidasa, dispasa, condroitinasa, colagenasa, péptidos que contienen RGD, anticuerpo dirigido contra integrina, urea, hidroxiiurea, tiourea, antagonistas del receptor P2Y, inhibidores angiogénicos, inhibidores de VEGF, inhibidores de P1GF y cualquiera de sus combinaciones.

27. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en la que el tratamiento o la prevención dan como resultado uno de los siguientes; reducir la viscosidad del vítreo, licuificar el vítreo, inducir el desprendimiento posterior del vítreo, aclarar o reducir la sangre hemorrágica procedente del vítreo, aclarar o reducir las sustancias extrañas intraoculares procedentes del vítreo, aclarar o reducir los materiales tóxicos en la retina, aumentar la difusión de un agente o una composición administrados en el vítreo y/o el humor acuoso, disminuyendo la neovascularización extrarretinal y cualquiera de sus combinaciones.
28. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, en la que la composición es una disolución líquida.
29. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, en la que el sujeto es un ser humano.
30. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en la que el tratamiento o la prevención se llevan a cabo en ausencia de vitrectomía, o en la que el tratamiento o la prevención se llevan a cabo como un auxiliar a la vitrectomía.
31. La composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 30, en la que la composición comprende una cantidad eficaz de TPCD que se va a administrar por ojo en el intervalo de 0,005 mg a 0,2 mg.
32. Una composición que comprende al menos dos TPCD para el uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno, o una complicación de un trastorno, del ojo de un sujeto, en la que el trastorno del ojo se selecciona entre el grupo que consiste en desprendimiento de retina, desgarro de la retina, hemorragia del vítreo, hemorragia diabética del vítreo, retinopatía diabética proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, degeneración macular relacionada con la edad, agujeros maculares, tracción vitreomacular, membrana epirretinal, exudados maculares, edema macular cistoide, deposición de fibrina, oclusión de la vena de la retina, oclusión de la arteria de la retina, hemorragia subretinal, ambliopía, endoftalmitis, retinopatía de precocidad, glaucoma, retinitis pigmentosa, y cualquiera de sus combinaciones.
33. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 32, en la que al menos dos TPCD se seleccionan entre el grupo que consiste en miniplasmina, miniplasmina recombinante, miniplasmina estabilizada, miniplasmina estabilizada recombinante, variantes de miniplasmina, microplasmina, microplasmina recombinante, microplasmina estabilizada, microplasmina estabilizada recombinante, variantes de microplasmina y cualquiera de sus combinaciones.
34. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o 14 a 21, el kit para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 33 en la que dicho TPCD es una microplasmina humana.
35. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 o la composición para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 32 o 33, en el que uno de dichos al menos dos TPCD es una microplasmina humana.
36. El uso, el kit para el uso, o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 34 o 35, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha microplasmina humana consiste en los aminoácidos 543 a 791 de la SEQ ID NO: 10 de la figura 1 en la que el enlace peptídico entre la Arg 561 y la val 562 se escinde mediante un activador del plasminógeno.
37. El uso, el kit para el uso, o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 34 o 35, en el que dicha microplasmina humana es un microplasminógeno activado en el que dicho microplasminógeno está codificado por la SEQ ID NO: 3 de la figura 2.
38. El uso, el kit para el uso, o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37, en el que dicha microplasmina humana está producida mediante expresión recombinante en una levadura metilotrófica.
39. El uso, el kit para el uso, o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 38, en el que dicha levadura metilotrófica es *Pichia pastoris*.

FIGURA 1

gag Glu 1	cct Pro	ctg Leu	gat Asp	gac Asp 5	tat Tyr	gtg Val	aat Asn	acc Thr	cag Gln 10	ggg Gly	gct Ala	tca Ser	ctg Leu	ttc Phe 15	agt Ser	48
gtc Val	act Thr	aag Lys	aag Lys 20	cag Gln	ctg Leu	gga Gly	gca Ala	gga Gly 25	agt Ser	ata Ile	gaa Glu	gaa Glu	tgt Cys 30	gca Ala	gca Ala	96
aaa Lys	tgt Cys	gag Glu 35	gag Glu	gac Asp	gaa Glu	gaa Glu	ttc Phe 40	acc Thr	tgc Cys	agg Arg	gca Ala	ttc Phe 45	caa Gln	tat Tyr	cac His	144
agt Ser	aaa Lys 50	gag Glu	caa Gln	caa Gln	tgt Cys	gtg Val 55	ata Ile	atg Met	gct Ala	gaa Glu	aac Asn 60	agg Arg	aag Lys	tcc Ser	tcc Ser	192
ata Ile 65	atc Ile	att Ile	agg Arg	atg Met	aga Arg 70	gat Asp	gta Val	gtt Val	tta Leu	ttt Phe 75	gaa Glu	aag Lys	aaa Lys	gtg Val	tat Tyr 80	240
ctc Leu	tca Ser	gag Glu	tgc Cys	aag Lys 85	act Thr	ggg Gly	aat Asn	gga Gly	aag Lys 90	aac Asn	tac Tyr	aga Arg	ggg Gly	acg Thr 95	atg Met	288
tcc Ser	aaa Lys	aca Thr	aaa Lys 100	aat Asn	ggc Gly	atc Ile	acc Thr	tgt Cys 105	caa Gln	aaa Lys	tgg Trp	agt Ser	tcc Ser 110	act Thr	tct Ser	336
ccc Pro	cac His	aga Arg 115	cct Pro	aga Arg	ttc Phe	tca Ser	cct Pro 120	gct Ala	aca Thr	cac His	ccc Pro	tca Ser 125	gag Glu	gga Gly	ctg Leu	384
gag Glu	gag Glu 130	aac Asn	tac Tyr	tgc Cys	agg Arg	aat Asn 135	cca Pro	gac Asp	aac Asn	gat Asp	ccg Pro 140	cag Gln	ggg Gly	ccc Pro	tgg Trp	432
tgc Cys 145	tat Tyr	act Thr	act Thr	gat Asp	cca Pro 150	gaa Glu	aag Lys	aga Arg	tat Tyr	gac Asp 155	tac Tyr	tgc Cys	gac Asp	att Ile	ctt Leu 160	480
gag Glu	tgt Cys	gaa Glu	gag Glu	gaa Glu 165	tgt Cys	atg Met	cat His	tgc Cys	agt Ser 170	gga Gly	gaa Glu	aac Asn	tat Tyr	gac Asp 175	ggc Gly	528
aaa Lys	att Ile	tcc Ser	aag Lys 180	acc Thr	atg Met	tct Ser	gga Gly	ctg Leu 185	gaa Glu	tgc Cys	cag Gln	gcc Ala	tgg Trp 190	gac Asp	tct Ser	576
cag Gln	agc Ser	cca Pro 195	cac His	gct Ala	cat His	gga Gly	tac Tyr 200	att Ile	cct Pro	tcc Ser	aaa Lys	ttt Phe 205	cca Pro	aac Asn	aag Lys	624

ES 2 377 965 T3

aac Asn	ctg Leu 210	aag Lys	aag Lys	aat Asn	tac Tyr	tgt Cys 215	cgt Arg	aac Asn	ccc Pro	gat Asp	agg Arg 220	gag Glu	ctg Leu	cgg Arg	cct Pro	672
tgg Trp 225	tgt Cys	ttc Phe	acc Thr	acc Thr	gac Asp 230	ccc Pro	aac Asn	aag Lys	cgc Arg	tgg Trp 235	gaa Glu	ctt Leu	tgc Cys	gac Asp	atc Ile 240	720
ccc Pro	cgc Arg	tgc Cys	aca Thr	aca Thr 245	cct Pro	cca Pro	cca Pro	tct Ser	tct Ser 250	ggg Gly	ccc Pro	acc Thr	tac Tyr	cag Gln 255	tgt Cys	768
ctg Leu	aag Lys	gga Gly	aca Thr 260	ggg Gly	gaa Glu	aac Asn	tat Tyr	cgc Arg 265	ggg Gly	aat Asn	gtg Val	gct Ala	ggt Val 270	acc Thr	ggt Val	816
tcc Ser	ggg Gly	cac His 275	acc Thr	tgt Cys	cag Gln	cac His	tgg Trp 280	agt Ser	gca Ala	cag Gln	acc Thr	cct Pro 285	cac His	aca Thr	cat His	864
aac Asn	agg Arg 290	aca Thr	cca Pro	gaa Glu	aac Asn	ttc Phe 295	ccc Pro	tgc Cys	aaa Lys	aat Asn	ttg Leu 300	gat Asp	gaa Glu	aac Asn	tac Tyr	912
tgc Cys 305	cgc Arg	aat Asn	cct Pro	gac Asp	gga Gly 310	aaa Lys	agg Arg	gcc Ala	cca Pro	tgg Trp 315	tgc Cys	cat His	aca Thr	acc Thr	aac Asn 320	960
agc Ser	caa Gln	gtg Val	cgg Arg	tgg Trp 325	gag Glu	tac Tyr	tgt Cys	aag Lys	ata Ile 330	ccg Pro	tcc Ser	tgt Cys	gac Asp	tcc Ser 335	tcc Ser	1008
cca Pro	gta Val	tcc Ser	acg Thr 340	gaa Glu	caa Gln	ttg Leu	gct Ala	ccc Pro 345	aca Thr	gca Ala	cca Pro	cct Pro	gag Glu 350	cta Leu	acc Thr	1056
cct Pro	gtg Val	gtc Val 355	cag Gln	gac Asp	tgc Cys	tac Tyr	cat His 360	ggg Gly	gat Asp	gga Gly	cag Gln	agc Ser 365	tac Tyr	cga Arg	ggc Gly	1104
aca Thr	tcc Ser 370	tcc Ser	acc Thr	acc Thr	acc Thr	aca Thr 375	gga Gly	aag Lys	aag Lys	tgt Cys	cag Gln 380	tct Ser	tgg Trp	tca Ser	tct Ser	1152
atg Met 385	aca Thr	cca Pro	cac His	cgg Arg	cac His 390	cag Gln	aag Lys	acc Thr	cca Pro	gaa Glu 395	aac Asn	tac Tyr	cca Pro	aat Asn	gct Ala 400	1200
ggc Gly	ctg Leu	aca Thr	atg Met	aac Asn 405	tac Tyr	tgc Cys	agg Arg	aat Asn	cca Pro 410	gat Asp	gcc Ala	gat Asp	aaa Lys	ggc Gly 415	ccc Pro	1248
tgg Trp	tgt Cys	ttt Phe	acc Thr 420	aca Thr	gac Asp	ccc Pro	agc Ser	gtc Val 425	agg Arg	tgg Trp	gag Glu	tac Tyr	tgc Cys 430	aac Asn	ctg Leu	1296

ES 2 377 965 T3

aaa Lys	aaa Lys	tgc Cys 435	tca Ser	gga Gly	aca Thr	gaa Glu	gcg Ala 440	agt Ser	gtt Val	gta Val	gca Ala	cct Pro 445	ccg Pro	cct Pro	gtt Val	1344
gtc Val	ctg Leu 450	ctt Leu	cca Pro	gat Asp	gta Val	gag Glu 455	act Thr	cct Pro	tcc Ser	gaa Glu 460	gaa Glu	gac Asp	tgt Cys	atg Met	ttt Phe	1392
ggg Gly 465	aat Asn	ggg Gly	aaa Lys	gga Gly	tac Tyr 470	cga Arg	ggc Gly	aag Lys	agg Arg	gcg Ala 475	acc Thr	act Thr	gtt Val	act Thr	ggg Gly 480	1440
acg Thr	cca Pro	tgc Cys	cag Gln	gac Asp 485	tgg Trp	gct Ala	gcc Ala	cag Gln	gag Glu 490	ccc Pro	cat His	aga Arg	cac His	agc Ser 495	att Ile	1488
ttc Phe	act Thr	cca Pro	gag Glu 500	aca Thr	aat Asn	cca Pro	cgg Arg	gcg Ala 505	ggt Gly	ctg Leu	gaa Glu	aaa Lys	aat Asn 510	tac Tyr	tgc Cys	1536
cgt Arg	aac Asn	cct Pro 515	gat Asp	ggg Gly	gat Asp	gta Val	ggt Gly 520	ggt Gly	ccc Pro	tgg Trp	tgc Cys	tac Tyr 525	acg Thr	aca Thr	aat Asn	1584
cca Pro	aga Arg 530	aaa Lys	ctt Leu	tac Tyr	gac Asp	tac Tyr 535	tgt Cys	gat Asp	gtc Val	cct Pro	cag Gln 540	tgt Cys	gcg Ala	gcc Ala	cct Pro	1632
tca Ser 545	ttt Phe	gat Asp	tgt Cys	ggg Gly	aag Lys 550	cct Pro	caa Gln	gtg Val	gag Glu	ccg Pro 555	aag Lys	aaa Lys	tgt Cys	cct Pro	gga Gly 560	1680
agg Arg	gtt Val	gtg Val	ggg Gly	ggg Gly 565	tgt Cys	gtg Val	gcc Ala	cac His	cca Pro 570	cat His	tcc Ser	tgg Trp	ccc Pro	tgg Trp 575	caa Gln	1728
gtc Val	agt Ser	ctt Leu	aga Arg 580	aca Thr	agg Arg	ttt Phe	gga Gly	atg Met 585	cac His	ttc Phe	tgt Cys	gga Gly	ggc Gly 590	acc Thr	ttg Leu	1776
ata Ile	tcc Ser	cca Pro 595	gag Glu	tgg Trp	gtg Val	ttg Leu	act Thr 600	gct Ala	gcc Ala	cac His	tgc Cys	ttg Leu 605	gag Glu	aag Lys	tcc Ser	1824
cca Pro	agg Arg 610	cct Pro	tca Ser	tcc Ser	tac Tyr	aag Lys 615	gtc Val	atc Ile	ctg Leu	ggt Gly	gca Ala 620	cac His	caa Gln	gaa Glu	gtg Val	1872
aat Asn 625	ctc Leu	gaa Glu	ccg Pro	cat His	gtt Val 630	cag Gln	gaa Glu	ata Ile	gaa Glu	gtg Val 635	tct Ser	agg Arg	ctg Leu	ttc Phe	ttg Leu 640	1920
gag Glu	ccc Pro	aca Thr	cga Arg	aaa Lys 645	gat Asp	att Ile	gcc Ala	ttg Leu	cta Leu 650	aag Lys	cta Leu	agc Ser	agt Ser	cct Pro 655	gcc Ala	1968

ES 2 377 965 T3

gtc Val	atc Ile	act Thr	gac Asp 660	aaa Lys	gta Val	atc Ile	cca Pro	gct Ala 665	tgt Cys	ctg Leu	cca Pro	tcc Ser	cca Pro 670	aat Asn	tat Tyr	2016
gtg Val	gtc Val	gct Ala 675	gac Asp	cgg Arg	acc Thr	gaa Glu	tgt Cys 680	ttc Phe	atc Ile	act Thr	ggc Gly	tgg Trp 685	gga Gly	gaa Glu	acc Thr	2064
caa Gln	ggt Gly 690	act Thr	ttt Phe	gga Gly	gct Ala	ggc Gly 695	ctt Leu	ctc Leu	aag Lys	gaa Glu	gcc Ala 700	cag Gln	ctc Leu	cct Pro	gtg Val	2112
att Ile 705	gag Glu	aat Asn	aaa Lys	gtg Val	tgc Cys 710	aat Asn	cgc Arg	tat Tyr	gag Glu	ttt Phe 715	ctg Leu	aat Asn	gga Gly	aga Arg	gtc Val 720	2160
caa Gln	tcc Ser	acc Thr	gaa Glu	ctc Leu 725	tgt Cys	gct Ala	ggg Gly	cat His	ttg Leu 730	gcc Ala	gga Gly	ggc Gly	act Thr	gac Asp 735	agt Ser	2208
tgc Cys	cag Gln	ggt Gly	gac Asp 740	agt Ser	gga Gly	ggt Gly	cct Pro	ctg Leu 745	ggt Val	tgc Cys	ttc Phe	gag Glu	aag Lys 750	gac Asp	aaa Lys	2256
tac Tyr	att Ile	tta Leu 755	caa Gln	gga Gly	gtc Val	act Thr	tct Ser 760	tgg Trp	ggt Gly	ctt Leu	ggc Gly	tgt Cys 765	gca Ala	cgc Arg	ccc Pro	2304
aat Asn	aag Lys 770	cct Pro	ggt Gly	gtc Val	tat Tyr	gtt Val 775	cgt Arg	ggt Val	tca Ser	agg Arg	ttt Phe 780	ggt Val	act Thr	tgg Trp	att Ile	2352
gag Glu 785	gga Gly	gtg Val	atg Met	aga Arg	aat Asn 790	aat Asn	taa	SEQ ID NO: 9 SEQ ID NO: 10								2400

FIGURA 2

																gcc Ala	cct Pro	1632
tca Ser 545	ttt Phe	gat Asp	tgt Cys	ggg Gly	aag Lys 550	cct Pro	caa Gln	gtg Val	gag Glu	ccg Pro 555	aag Lys	aaa Lys	tgt Cys	cct Pro	gga Gly 560			1680
agg Arg	gtt Val	gtg Val	ggg Gly	ggg Gly 565	tgt Cys	gtg Val	gcc Ala	cac His	cca Pro 570	cat His	tcc Ser	tgg Trp	ccc Pro	tgg Trp 575	caa Gln			1728
gtc Val	agt Ser	ctt Leu	aga Arg 580	aca Thr	agg Arg	ttt Phe	gga Gly	atg Met 585	cac His	ttc Phe	tgt Cys	gga Gly 590	ggc Gly	acc Thr	ttg Leu			1776
ata Ile	tcc Ser	cca Pro 595	gag Glu	tgg Trp	gtg Val	ttg Leu	act Thr 600	gct Ala	gcc Ala	cac His	tgc Cys	ttg Leu 605	gag Glu	aag Lys	tcc Ser			1824
cca Pro	agg Arg 610	cct Pro	tca Ser	tcc Ser	tac Tyr	aag Lys 615	gtc Val	atc Ile	ctg Leu	ggt Gly	gca Ala 620	cac His	caa Gln	gaa Glu	gtg Val			1872
aat Asn 625	ctc Leu	gaa Glu	ccg Pro	cat His	gtt Val 630	cag Gln	gaa Glu	ata Ile	gaa Glu	gtg Val 635	tct Ser	agg Arg	ctg Leu	ttc Phe	ttg Leu 640			1920
gag Glu	ccc Pro	aca Thr	cga Arg	aaa Lys 645	gat Asp	att Ile	gcc Ala	ttg Leu	cta Leu 650	aag Lys	cta Leu	agc Ser	agt Ser	cct Pro 655	gcc Ala			1968
gtc Val	atc Ile	act Thr	gac Asp 660	aaa Lys	gta Val	atc Ile	cca Pro	gct Ala 665	tgt Cys	ctg Leu	cca Pro	tcc Ser	cca Pro 670	aat Asn	tat Tyr			2016
gtg Val	gtc Val	gct Ala 675	gac Asp	cgg Arg	acc Thr	gaa Glu	tgt Cys 680	ttc Phe	atc Ile	act Thr	ggc Gly	tgg Trp 685	gga Gly	gaa Glu	acc Thr			2064
caa Gln	ggt Gly 690	act Thr	ttt Phe	gga Gly	gct Ala	ggc Gly 695	ctt Leu	ctc Leu	aag Lys	gaa Glu	gcc Ala 700	cag Gln	ctc Leu	cct Pro	gtg Val			2112
att Ile 705	gag Glu	aat Asn	aaa Lys	gtg Val	tgc Cys 710	aat Asn	cgc Arg	tat Tyr	gag Glu	ttt Phe 715	ctg Leu	aat Asn	gga Gly	aga Arg	gtc Val 720			2160
caa Gln	tcc Ser	acc Thr	gaa Glu	ctc Leu 725	tgt Cys	gct Ala	ggg Gly	cat His	ttg Leu 730	gcc Ala	gga Gly	ggc Gly	act Thr	gac Asp 735	agt Ser			2208

ES 2 377 965 T3

tgc Cys	cag Gln	ggt Gly	gac Asp 740	agt Ser	gga Gly	ggt Gly	cct Pro	ctg Leu 745	gtt Val	tgc Cys	ttc Phe	gag Glu	aag Lys 750	gac Asp	aaa Lys	2256
tac Tyr	att Ile	tta Leu 755	caa Gln	gga Gly	gtc Val	act Thr	tct Ser 760	tgg Trp	ggt Gly	ctt Leu	ggc Gly	tgt Cys 765	gca Ala	cgc Arg	ccc Pro	2304
aat Asn	aag Lys 770	cct Pro	ggt Gly	gtc Val	tat Tyr	gtt Val 775	cgt Arg	gtt Val	tca Ser	agg Arg	ttt Phe 780	gtt Val	act Thr	tgg Trp	att Ile	2352
gag Glu 785	gga Gly	gtg Val	atg Met	aga Arg	aat Asn 790	aat Asn	taa	SEQ ID NO: 3 SEQ ID NO: 4								2400

FIGURA 3

											gca Ala	cct Pro 445	ccg Pro	cct Pro	gtt Val	1344
gtc Val	ctg Leu 450	ctt Leu	cca Pro	gat Asp	gta Val	gag Glu 455	act Thr	cct Pro	tcc Ser	gaa Glu	gaa Glu 460	gac Asp	tgt Cys	atg Met	ttt Phe	1392
ggg Gly 465	aat Asn	ggg Gly	aaa Lys	gga Gly	tac Tyr 470	cga Arg	ggc Gly	aag Lys	agg Arg	gcg Ala 475	acc Thr	act Thr	gtt Val	act Thr	ggg Gly 480	1440
acg Thr	cca Pro	tgc Cys	cag Gln	gac Asp 485	tgg Trp	gct Ala	gcc Ala	cag Gln	gag Glu 490	ccc Pro	cat His	aga Arg	cac His	agc Ser 495	att Ile	1488
ttc Phe	act Thr	cca Pro	gag Glu 500	aca Thr	aat Asn	cca Pro	cgg Arg	gcg Ala 505	ggt Gly	ctg Leu	gaa Glu	aaa Lys	aat Asn 510	tac Tyr	tgc Cys	1536
cgt Arg	aac Asn	cct Pro 515	gat Asp	ggt Gly	gat Asp	gta Val	ggt Gly 520	ggt Gly	ccc Pro	tgg Trp	tgc Cys	tac Tyr 525	acg Thr	aca Thr	aat Asn	1584
cca Pro	aga Arg 530	aaa Lys	ctt Leu	tac Tyr	gac Asp	tac Tyr 535	tgt Cys	gat Asp	gtc Val	cct Pro	cag Gln 540	tgt Cys	gcg Ala	gcc Ala	cct Pro	1632
tca Ser 545	ttt Phe	gat Asp	tgt Cys	ggg Gly	aag Lys 550	cct Pro	caa Gln	gtg Val	gag Glu	ccg Pro 555	aag Lys	aaa Lys	tgt Cys	cct Pro	gga Gly 560	1680
agg Arg	gtt Val	gtg Val	ggg Gly	ggg Gly 565	tgt Cys	gtg Val	gcc Ala	cac His	cca Pro 570	cat His	tcc Ser	tgg Trp	ccc Pro	tgg Trp 575	caa Gln	1728
gtc Val	agt Ser	ctt Leu	aga Arg 580	aca Thr	agg Arg	ttt Phe	gga Gly	atg Met 585	cac His	ttc Phe	tgt Cys	gga Gly 590	ggc Gly 590	acc Thr	ttg Leu	1776
ata Ile	tcc Ser	cca Pro 595	gag Glu	tgg Trp	gtg Val	ttg Leu 600	act Thr 600	gct Ala	gcc Ala	cac His	tgc Cys	ttg Leu 605	gag Glu	aag Lys	tcc Ser	1824
cca Pro	agg Arg 610	cct Pro	tca Ser	tcc Ser	tac Tyr	aag Lys 615	gtc Val	atc Ile	ctg Leu	ggt Gly	gca Ala 620	cac His	caa Gln	gaa Glu	gtg Val	1872
aat Asn 625	ctc Leu	gaa Glu	ccg Pro	cat His	gtt Val 630	cag Gln	gaa Glu	ata Ile	gaa Glu	gtg Val 635	tct Ser	agg Arg	ctg Leu	ttc Phe	ttg Leu 640	1920

ES 2 377 965 T3

gag Glu	ccc Pro	aca Thr	cga Arg	aaa Lys 645	gat Asp	att Ile	gcc Ala	ttg Leu	cta Leu 650	aag Lys	cta Leu	agc Ser	agt Ser	cct Pro 655	gcc Ala	1968
gtc Val	atc Ile	act Thr	gac Asp 660	aaa Lys	gta Val	atc Ile	cca Pro	gct Ala 665	tgt Cys	ctg Leu	cca Pro	tcc Ser	cca Pro 670	aat Asn	tat Tyr	2016
gtg Val	gtc Val	gct Ala 675	gac Asp	cgg Arg	acc Thr	gaa Glu	tgt Cys 680	ttc Phe	atc Ile	act Thr	ggc Gly	tgg Trp 685	gga Gly	gaa Glu	acc Thr	2064
caa Gln	ggt Gly 690	act Thr	ttt Phe	gga Gly	gct Ala	ggc Gly 695	ctt Leu	ctc Leu	aag Lys	gaa Glu	gcc Ala 700	cag Gln	ctc Leu	cct Pro	gtg Val	2112
att Ile 705	gag Glu	aat Asn	aaa Lys	gtg Val	tgc Cys 710	aat Asn	cgc Arg	tat Tyr	gag Glu	ttt Phe 715	ctg Leu	aat Asn	gga Gly	aga Arg	gtc Val 720	2160
caa Gln	tcc Ser	acc Thr	gaa Glu	ctc Leu 725	tgt Cys	gct Ala	ggg Gly	cat His	ttg Leu 730	gcc Ala	gga Gly	ggc Gly	act Thr	gac Asp 735	agt Ser	2208
tgc Cys	cag Gln	ggt Gly	gac Asp 740	agt Ser	gga Gly	ggt Gly	cct Pro	ctg Leu 745	gtt Val	tgc Cys	ttc Phe	gag Glu	aag Lys 750	gac Asp	aaa Lys	2256
tac Tyr	att Ile	tta Leu 755	caa Gln	gga Gly	gtc Val	act Thr	tct Ser 760	tgg Trp	ggt Gly	ctt Leu	ggc Gly	tgt Cys 765	gca Ala	cgc Arg	ccc Pro	2304
aat Asn	aag Lys 770	cct Pro	ggt Gly	gtc Val	tat Tyr	gtt Val 775	cgt Arg	gtt Val	tca Ser	agg Arg	ttt Phe 780	gtt Val	act Thr	tgg Trp	att Ile	2352
gag Glu 785	gga Gly	gtg Val	atg Met	aga Arg	aat Asn 790	aat Asn	taa	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 8								2400

FIGURA 4

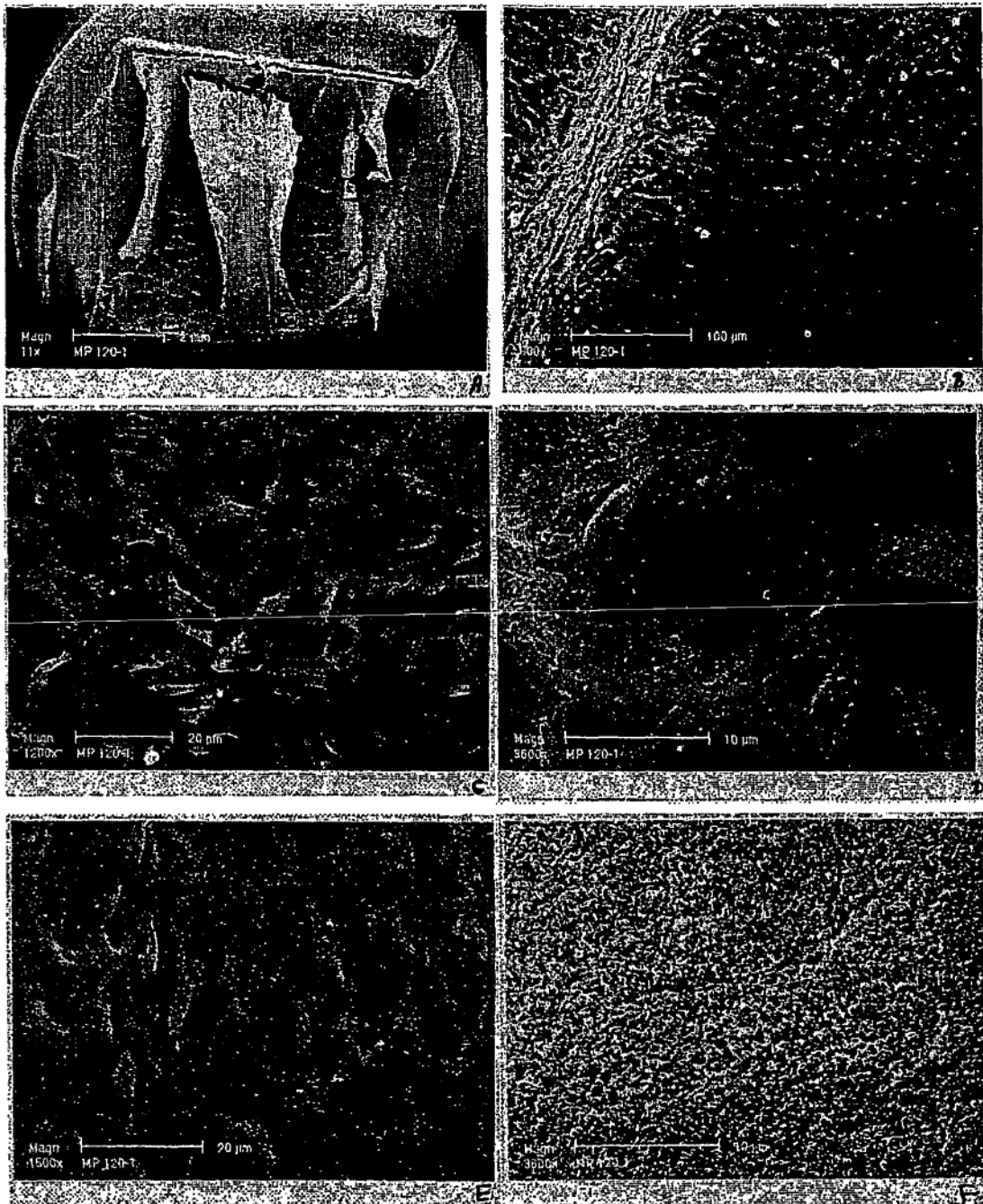


FIGURA 5

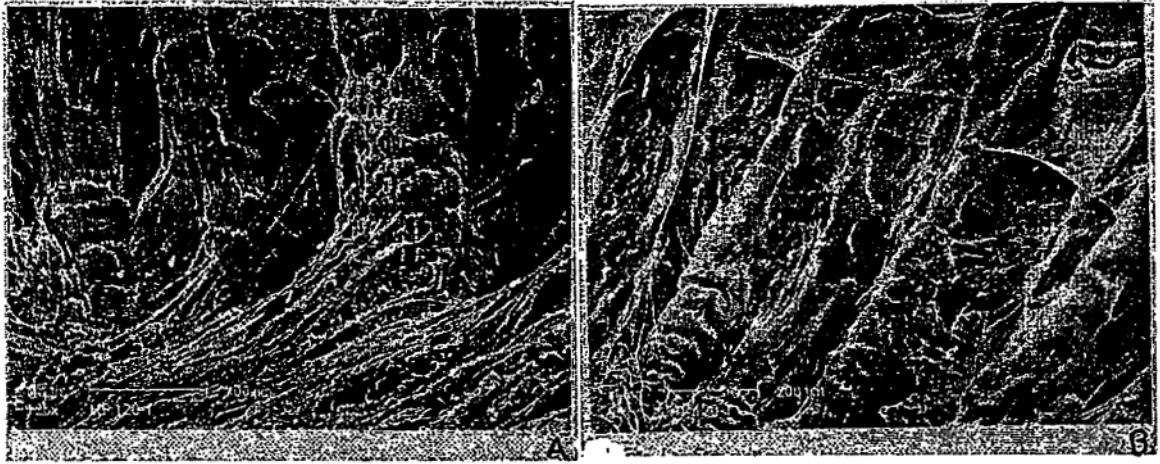


FIGURA 6

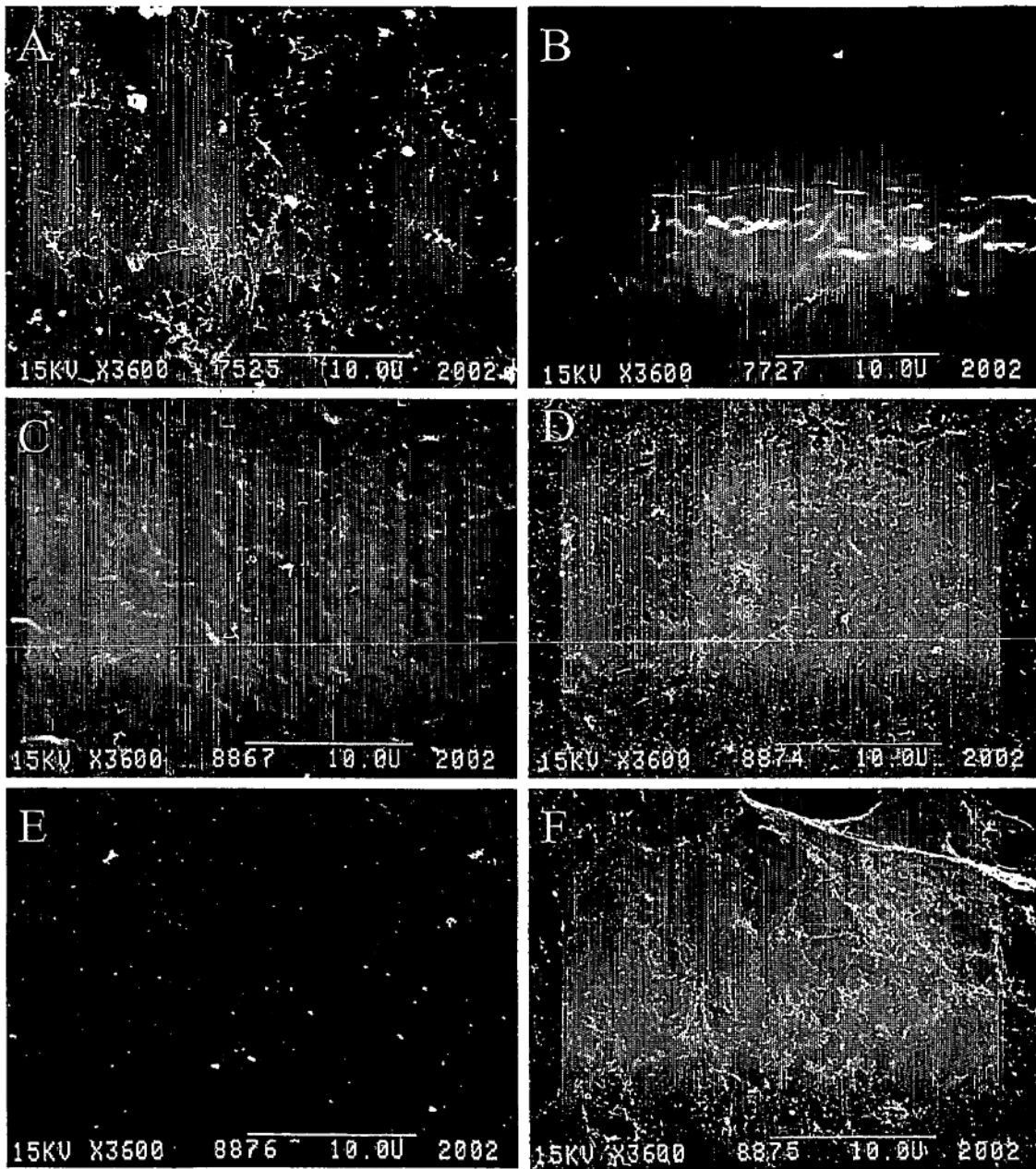


FIGURA 7



FIGURA 8

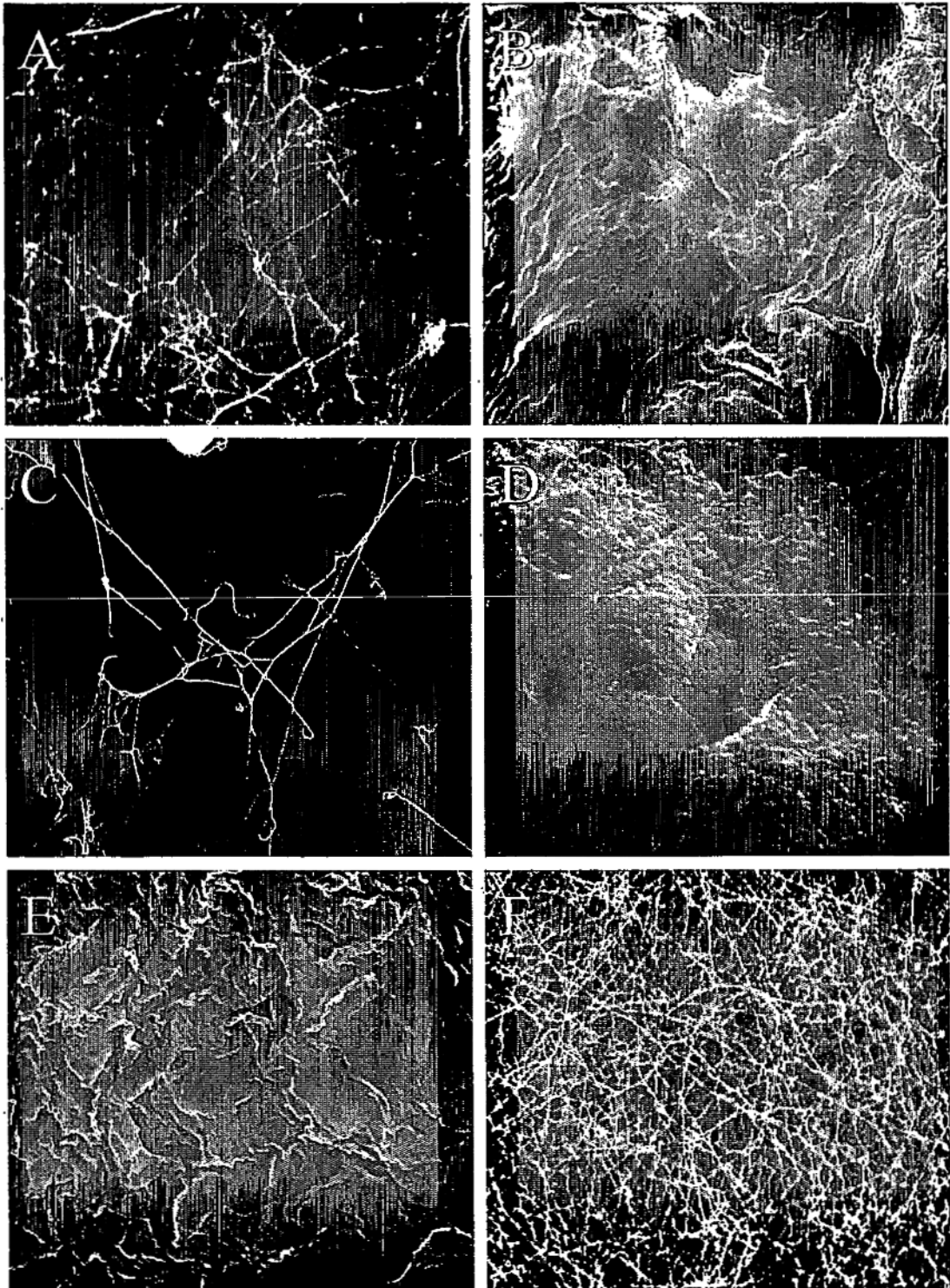


FIGURA 9

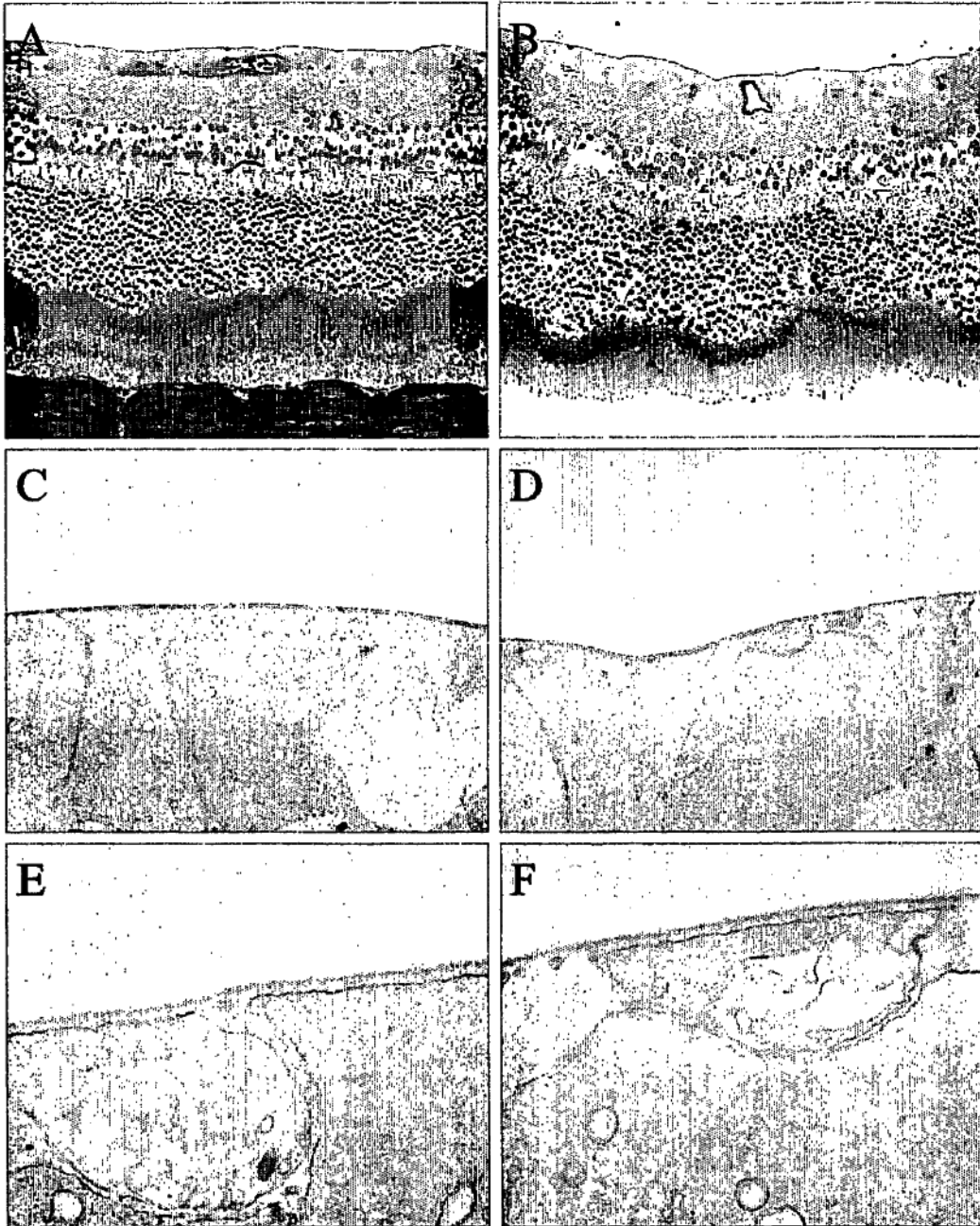


FIGURA 10

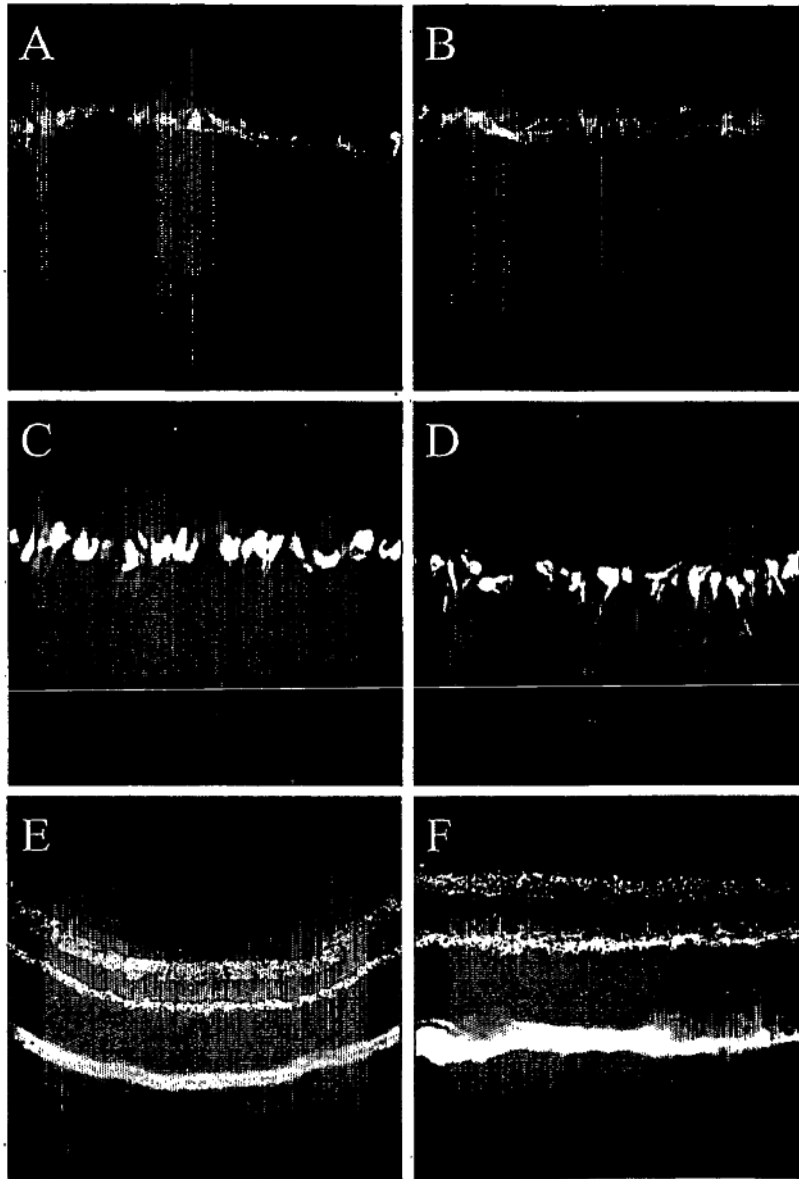


FIGURA 11

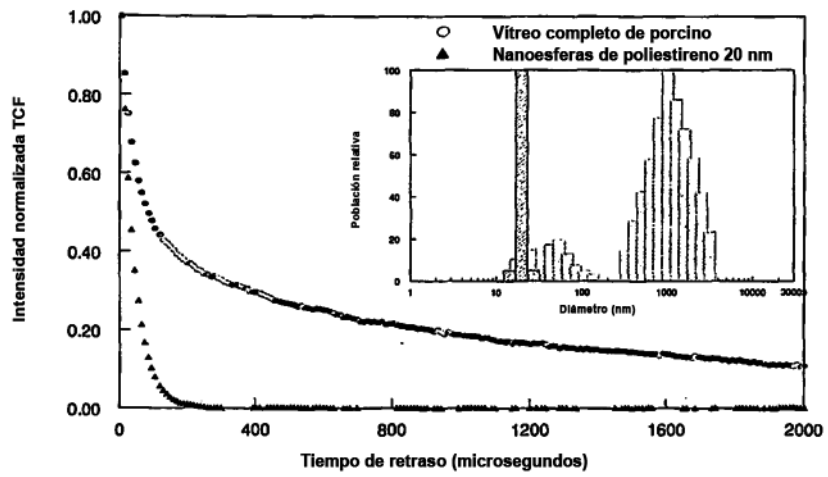


FIGURA 12

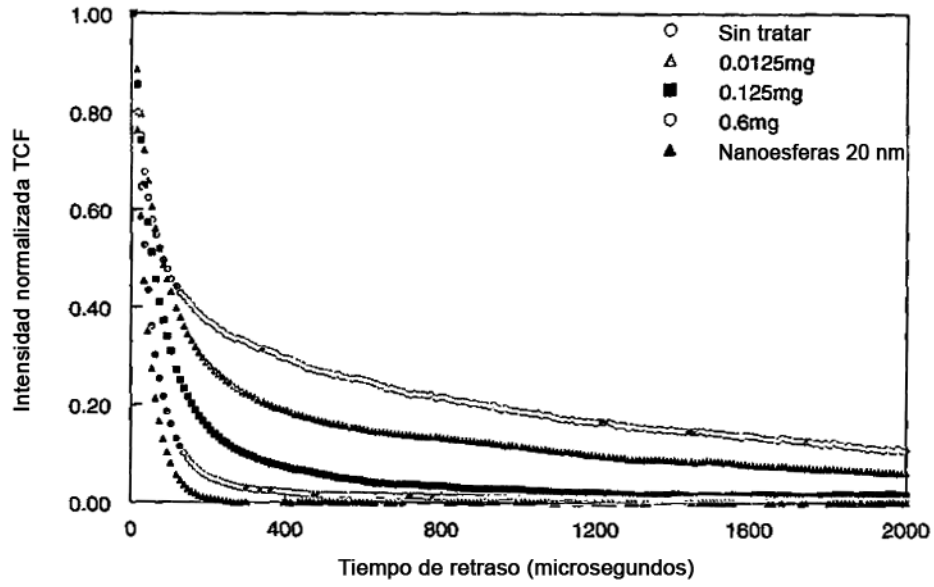


FIGURA 13

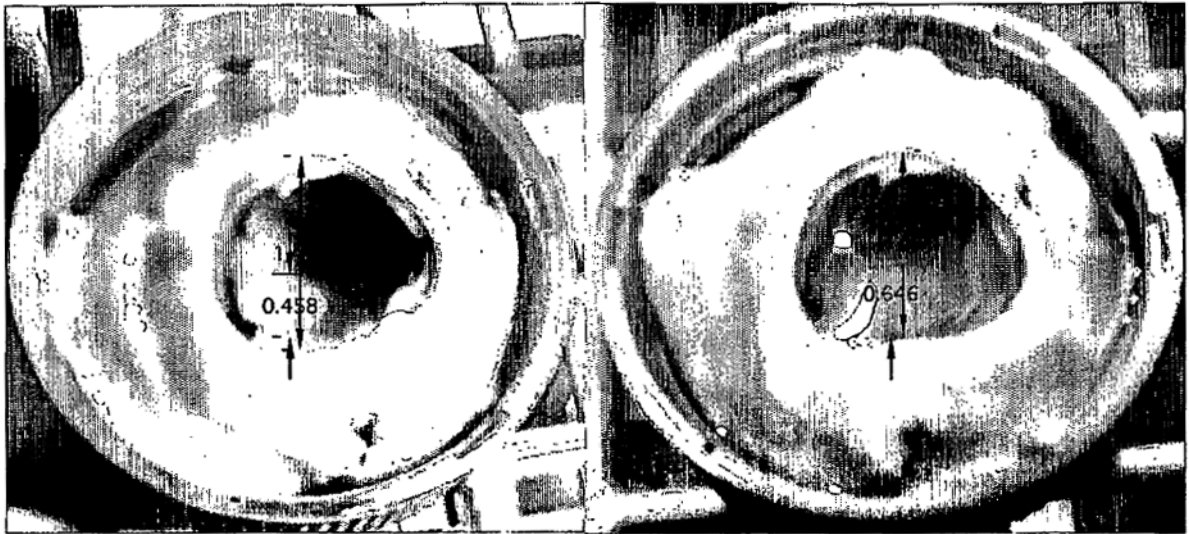


FIGURA 14

