

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 797**

51 Int. Cl.:
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
C12N 9/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06126236 .6**
96 Fecha de presentación: **06.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1790354**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Método de mejora de la cicatrización de heridas**

30 Prioridad:
06.09.2001 US 317643 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2012

73 Titular/es:
**OMNIO HEALER AB
VILLAVÄGEN 1
903 36 UMEA, SE**

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

74 Agente/Representante:
No consta

ES 2 387 797 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).

DESCRIPCION

Método de mejora de la cicatrización de heridas

Campo de la invención

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

Antecedentes

10 La cicatrización de heridas lenta o inapropiada compromete la calidad de vida de un gran número de personas. Un tipo particular de cicatrización de heridas en la que pueden producirse problemas es la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica (tímpano). Aunque la mayoría de las perforaciones cicatrizarán espontáneamente, y se cierran por el epitelio escamoso queratinizante en proliferación que avanza por delante de un tejido conjuntivo que crece hacia dentro, algunas perforaciones no cicatrizan, dando como resultado frecuentemente una pérdida de audición u otras complicaciones. Todavía es una cuestión abierta por qué algunas perforaciones cicatrizan, mientras que otras permanecen patentes. Además, cada año en los Estados Unidos más de 1,25 millones de personas padecen quemaduras, y 6,5 millones tienen úlceras cutáneas crónicas provocadas por presión, estasis venosa o diabetes mellitus.

15 La cicatrización de heridas es un proceso de remodelación tisular dinámico que implica la formación de una matriz rica en fibrina y fibronectina en la zona de la herida, la infiltración de neutrófilos y macrófagos, la proliferación de queratinocitos epidérmicos en los bordes de la herida y su migración a través de la matriz provisional, la formación de tejido de granulación que contiene vasos recién desarrollados y células inflamatorias en migración y fibroblastos, y la contracción de la herida. Estudios de cicatrización de heridas de la piel sugieren que las proteasas desempeñan importantes papeles en varias etapas. Está bien documentado que la degradación de la matriz extracelular (MEC) que tiene lugar durante la cicatrización de heridas y otros procesos de remodelación de la MEC depende de la acción de una variedad de enzimas proteolíticas secretadas por células inflamatorias, así como por elementos celulares del tejido estromal. Se cree que muchas proteinasas diferentes contribuyen a la remodelación de la matriz durante la cicatrización de heridas (Saksela y Rifkin, Annu. Rev. Cell Biol. 4, 93-126 (1988)). Sin embargo, los mecanismos precisos responsables de este proceso, y cómo se regulan, no se entienden bien.

El sistema de activación del plasminógeno

20 El sistema de activación del plasminógeno es un sistema enzimático versátil, controlado temporalmente en el que el plasminógeno se activa a la enzima proteolítica plasmina mediante cualquiera de los dos activadores fisiológicos del plasminógeno (PA), el activador del plasminógeno de tipo tisular (tPA) y el activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA). La activación de este sistema se inicia por la liberación de tPA o uPA por células específicas en respuesta a señales externas y conduce a una actividad proteolítica extracelular expresada localmente (Vassalli *et al.* J. Exp. Med. 159, 1653-1668 (1984); Saksela y Rifkin, 1988, citado anteriormente). El sistema de PA también se regula por inhibidores específicos dirigidos contra PA y plasmina, incluyendo el inhibidor de PA tipo 1 (PAI-1), el inhibidor de PA tipo 2 (PAI-2), la proteasa nexina 1 (PN-1) y α 2-anti-plasmina (Saksela y Rifkin, 1988, citado anteriormente; Ny *et al.*, Thromb Res. 71 (1):1-45 (1993)). Todos estos inhibidores, que pertenecen a la familia serpina, son inhibidores suicidas que se escinden por la proteasa relacionada (Wilczynska *et al.*, J Biol Chem. 270(50):29652-5 (1995); Wilczynska *et al.*, Nat Struct Biol. 4(5):354-7 (1997)). La característica más importante del sistema de PA es la amplificación lograda por la conversión de plasminógeno que da como resultado la formación de plasmina.

25 Se ha encontrado que están presentes PA en los bordes de las heridas, junto con varios tipos de metaloproteinasas de la matriz (MMP), incluyendo colagenasa intersticial (MMP-1), estromelisin-1 (MMP-3) y las formas latentes de gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa-B (MMP-9). La expresión de tanto PA como MMP se induce mediante citocinas y mediadores inflamatorios, lo que indica que los dos sistemas enzimáticos pueden actuar conjuntamente. Se sabe que las MMP se sintetizan como enzimas precursoras latentes que pueden activarse mediante proteólisis limitada, pero el mecanismo exacto mediante el que tiene lugar esta activación *in vivo* se desconoce en gran medida. La plasmina es uno de los factores que se propone que está implicado en la activación de algunas subclases de metaloproteinasas (Lijnen, Thromb Haemost 86(1):324-33 (2001)).

30 Varios informes han indicado que la expresión o activación de MMP, inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), PA e inhibidores de PA están alterados en procesos de cicatrización de heridas, y también ha habido indicaciones de que la plasmina desempeña un papel en la cicatrización de heridas cutáneas (Romer *et al.*, Nat. Med. 2:287-292 (1996)). Además, las patentes estadounidenses n.ºs 5.925.350 y 6.033.664 con-

cedidas a Verheijen describen el uso de uPA o tPA para mejorar la cicatrización de heridas de cicatrización lenta o que no cicatrizan. En estos estudios, se ha observado que el mecanismo de mejora no estaba asociado con la actividad fibrinolítica o la eliminación de tejido necrótico. También se han propuesto estrategias específicas para mejorar la cicatrización de la membrana timpánica, usando la aplicación tópica de altas concentraciones de hialuronano (Laurent *et al.*, Arch Otolaryngol Head Neck Surg 114:1435-1441 (1988)) o factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Fina *et al.*, Laryngoscope 103(7):804-809 (1993)).

Aunque la comprensión de la cicatrización de heridas y los diversos mecanismos que la regulan está mejorando, y se han propuesto estrategias de tratamiento prometedoras, la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica u otras heridas de cicatrización lenta o que no cicatrizan sigue siendo un problema médico así como social. Por tanto, hay una necesidad en la técnica de medios nuevos y mejorados para acelerar los procesos de cicatrización de heridas, tales como la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica, quemaduras y úlceras cutáneas, la eliminación de cualquier tejido necrótico y la minimización de la formación de cicatrices. La invención aborda estas y otras necesidades en la técnica.

15 Sumario de la invención

La presente invención proporciona la reivindicación 1. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano y el plasminógeno es plasminógeno humano. La composición puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable, y puede estar en forma de una disolución acuosa u otro vehículo de administración adecuado. El plasminógeno puede administrarse de manera sistémica. La composición puede promover la cicatrización acelerando la cicatrización, reduciendo el tejido necrótico y reduciendo la formación de tejido cicatricial en la zona de la herida. En una realización, la administración de plasminógeno se repite al menos una vez, preferiblemente al menos una vez cada día.

La invención también proporciona un medio de reducción de la formación de cicatrices a partir de una herida en cicatrización en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende una composición que contiene una cantidad eficaz de plasminógeno para reducir la formación de cicatrices. El plasminógeno, por ejemplo, puede reducir la deposición de fibrina. El sujeto es preferiblemente un sujeto humano y el plasminógeno es preferiblemente plasminógeno humano.

La invención también proporciona un medio de aceleración de la cicatrización de heridas en un paciente que necesita tal tratamiento, que comprende una composición que contiene una cantidad eficaz de plasminógeno para promover la cicatrización de la herida. Opcionalmente, la herida es una herida crónica. El sujeto puede ser un sujeto humano, en cuyo caso el plasminógeno es preferiblemente, aunque no necesariamente, plasminógeno humano.

La invención también proporciona un medio de reducción del tejido necrótico en una herida en cicatrización en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende una composición que contiene una cantidad eficaz de plasminógeno para reducir la formación de tejido necrótico. Opcionalmente, el plasminógeno reduce la deposición de fibrina. En una realización, el sujeto es un sujeto humano y el plasminógeno es plasminógeno humano.

Las características anteriores y muchas otras ventajas de la invención se entenderán mejor mediante referencia a la siguiente descripción detallada cuando se toma conjuntamente con los dibujos adjuntos.

40 Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1A y 1B. Transcurso de tiempo de (A) la reacción inflamatoria en la cavidad del oído medio y (B) retracción de la perforación, tras la perforación de la membrana timpánica en ratas de tipo natural. Se administraron cincuenta μ l de plasminógeno (50 μ g (1 mg/ml) -■-; o 0,5 mg (10 mg/ml) -▲-) o disolución control (PBS, -▼-) tras la perforación, y después de eso cada 24 horas.

45 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la cicatrización de heridas. La invención puede aplicarse también a enfermedades y estados caracterizados por degeneración o mala cicatrización de estructuras de la matriz extracelular, particularmente el tejido queratinizado tal como, por ejemplo, la membrana timpánica. Otros procesos de cicatrización de heridas anómalos incluyen úlceras diabéticas, queloides, cicatrices hipertróficas y la aplicación de sustitutos de la piel.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que, en ausencia de plasminógeno, el proceso de cicatrización de heridas no progresa apropiadamente, lo que muestra que el plasminógeno desempeña un

papel central en la cicatrización de heridas, particularmente en el caso de perforaciones de la membrana timpánica (véanse los ejemplos y la tabla 1). Tal como se muestra mediante los ejemplos, la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica se alteraba drásticamente y era anómala en ratones que carecían de plasminógeno en comparación con controles de tipo natural y otros modelos transgénicos (véase la tabla 1). En ratones deficientes en plasminógeno, las perforaciones de la membrana timpánica no cicatrizaban apropiadamente durante el periodo de prueba de 144 días durante el cual se monitorizó la cicatrización, dando como resultado una membrana timpánica anómala. Se encontró también que los ratones deficientes en plasminógeno reversionaban a un proceso de cicatrización normal tras la inyección de plasminógeno humano (véanse los ejemplos 2 y 5), y que las ratas de tipo natural presentaban una cicatrización potenciada de la membrana timpánica tras la administración de plasminógeno (ejemplo 6). Además, los experimentos mostraron que uPA, pero no tPA, puede desempeñar también algún papel en la cicatrización de heridas normales, porque parecía necesitarse uPA para la eliminación de deposiciones de fibrina (ejemplo 3 y 4). Sin embargo, en ningún modelo animal era la falta de cicatrización normal más evidente que en ratones deficientes en plasminógeno, lo que indica que el plasminógeno desempeña un papel más esencial y probablemente diferente durante la cicatrización de heridas que uPA. Sin querer restringirse a ninguna teoría específica, los presentes hallazgos apoyan que la incapacidad para cicatrizar apropiadamente puede estar provocada por un defecto en la respuesta inflamatoria, la migración de queratinocitos o acontecimientos de remodelación de la matriz durante el proceso de cicatrización.

Tal como se demuestra mediante los resultados en la tabla 1, uPA, tPA y plasminógeno desempeñan papeles distintos en el proceso de cicatrización de heridas, desempeñando el plasminógeno un papel central. Además, tal como se muestra en los ejemplos, la eliminación de tejido necrótico y fibrina dependen de manera crítica de la presencia o administración de plasminógeno/plasmina en vez de tPA o uPA.

TABLA 1

Comparación del tiempo de cicatrización y aspecto del tejido de membrana timpánica cicatrizada en ratones de tipo natural, deficientes en uPA, deficientes en tPA y deficientes en plasminógeno

Genotipo	Día de cicatrización	Patrón de cicatrización	Necrosis	Deposición de fibrina
Tipo natural	8,7±2,4	Cicatrización normal	No	No
tPA ^{-/-}	9,0±2,4	Cicatrización aparentemente normal	No	No
uPA ^{-/-}	11,0±1,7 (7/8 ratones cicatrizados en el día 11)	La zona cicatrizada contiene una superficie rugosa y depósitos de tejido similar a adoquines	No	Puntos de deposiciones de fibrina en la zona cicatrizada
Plg ^{-/-}	- (0/8 ratones cicatrizados en el día 144)	Membrana timpánica cubierta por tejido blanquecino, y es gruesa y no transparente	Se hace evidente la necrosis desde el día 16 en adelante	Deposición de fibrina extensa que cubre completamente la superficie de la membrana timpánica

Por consiguiente, podía usarse el plasminógeno en el tratamiento de enfermedades de cicatrización de heridas, así como para las estrategias de aceleración para la cicatrización de heridas y membranas timpánicas, el tratamiento de estados o enfermedades que afectan a la cicatrización de tejidos epidérmicos alterados, los métodos para reducir la formación de cicatrices o la formación o acumulación de tejido necrótico. La administración de plasminógeno también puede minimizar la formación de cicatrices o la acumulación de tejido necrótico en membranas timpánicas u otros tejidos epidérmicos durante la cicatrización de heridas. Por ejemplo, puede aplicarse plasminógeno conjuntamente con cirugía plástica para reducir la aparición de, o prevenir, la formación de cicatrices residuales, depósitos de fibrina o tejido necrótico. Además, puede aplicarse plasminógeno sobre úlceras o quemaduras para mejorar la cicatrización.

Además, la invención puede usarse para mejorar la cicatrización de heridas en estados de deficiencia de plasminógeno local o sistémica, o para mejorar la cicatrización de heridas que no cicatrizan o de cicatrización lenta. Notablemente, tal como se muestra en el ejemplo 5, la restauración del plasminógeno semanas después de la lesión puede disminuir la matriz extracelular acumulada y reiniciar la cicatrización normal, mostrando así que puede aplicarse plasminógeno para el tratamiento de heridas crónicas tales como ulceraciones y úlceras de decúbito.

Las composiciones de la invención pueden administrarse mediante inyección o mediante infusión intravenosa. Preferiblemente, aunque no necesariamente, la administración es local, es decir, en alguna proximidad a la herida. Cuando el plasminógeno se administra mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular), se prepara ventajosamente como una disolución del material en un líquido farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, solución salina isotónica. Puede administrarse localmente plasminógeno para lograr una alta concentración, por ejemplo, al menos plasminógeno 200 µg/ml, en la zona de la perforación o la herida.

Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Determinados términos se comentan a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al médico en la descripción de las composiciones y los métodos de la invención y cómo hacer uso de los mismos.

“Membrana timpánica” y “tímpano” se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Una “perforación de la membrana timpánica” es una abertura en la membrana timpánica provocada habitualmente por traumatismo. Hay al menos cuatro categorías principales: lesiones por compresión (las más comunes y habitualmente el resultado de un golpe en el oído); lesiones por instrumento (las segundas más comunes, habitualmente involuntarias, provocadas a menudo por bastoncillos de algodón u horquillas); lesiones por escoria de combustión (frecuentemente observadas en la industria, a partir de metal caliente de máquinas o soldadura); y lesiones por explosiones (habitualmente observadas durante guerras o bombardeos). La infección puede provocar cicatrización retardada de la membrana timpánica, y la perforación persistente es habitualmente una manifestación de la tubotimpanitis, una inflamación de las trompas de Eustaquio y la cavidad timpánica (oído medio).

Una “herida” es una rotura o discontinuidad en la estructura de un órgano o tejido, incluyendo epitelio, tejido conjuntivo y tejido muscular, provocada por un agente externo. Los ejemplos de heridas incluyen, pero no se limitan a, heridas cutáneas, moretones, ulceraciones, úlceras de decúbito, rasguños, desgarros, cortes, picaduras, heridas de psoriasis, perforaciones de la membrana timpánica y quemaduras. Un tipo particular de heridas son las que son una consecuencia de procedimientos de cirugía plástica.

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

“Plasminógeno” en el presente documento incluye plasminógeno de mamífero que se produce de manera endógena, plasminógeno alélico, derivados de plasminógeno de función conservativa, fragmentos de plasminógeno funcionalmente activos y homólogos de plasminógeno de mamífero. Opcionalmente, una composición de plasminógeno puede contener más de un tipo, derivado u homólogo de plasminógeno. Preferiblemente, el tipo de plasminógeno que va a usarse en una composición que va a administrarse a un sujeto es endógeno para la especie del sujeto. Un compuesto preferido es plasminógeno purificado a partir de una fuente biológica, por ejemplo, plasminógeno humano producido de manera recombinante, o plasminógeno humano purificado, que está disponible de, por ejemplo, Biopool AB (Umeå, Suecia). Un plasminógeno humano preferido tiene la secuencia de aminoácidos de número de registro de GenBank PLHU (GI: 625234) (SEQ ID NO:1).

“Plasmina” en el presente documento incluye plasmina de mamífero que se produce de manera endógena, plasmina alélica, derivados de plasmina de función conservativa, fragmentos de plasmina funcionalmente activos y homólogos de plasmina de mamífero. Opcionalmente, una composición de plasmina puede contener más de un tipo, derivado u homólogo de plasmina. Preferiblemente, el tipo de plasmina que va a usarse en una composición que va a administrarse a un sujeto es endógeno para la especie del sujeto. Un compuesto preferido es plasmina purificada de una fuente biológica, por ejemplo, plasmina humana producida de manera recombinante o plasmina humana purificada.

“Variantes de función conservativa” son proteínas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado sin alterar la conformación y función globales de la proteína, incluyendo, pero sin limitarse a, la sustitución de un aminoácido por uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, ácidas, básicas, hidrófobas y similares). Se conocen bien en la técnica aminoácidos con propiedades similares. Por ejemplo, arginina, histidina y lisina son aminoácidos hidrófilos-básicos y pueden ser intercambiables. De manera similar, isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede sustituirse por leucina, metionina o valina. Aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima de modo que el porcentaje de similitud de secuencia de aminoácidos o proteína entre cualquiera de dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de desde el 70% hasta el 99% tal como se determina según un esquema de alineación tal como mediante el método Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una “variante de función conservativa” también incluye un polipéptido o enzima que tiene una identidad de aminoácidos de al menos el 60% tal como se determina mediante los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 85%, incluso más preferiblemente al menos el 90% y todavía más preferiblemente el 95%, y que tiene propiedades o funciones iguales o sustancialmente similares que la proteína o enzima nativa u original con la que se compara.

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

“Tratamiento” de un sujeto, o “tratar” un sujeto para una enfermedad o estado en el presente documento significa reducir o aliviar los síntomas clínicos de la enfermedad o estado tal como cicatrización de heridas alterada o lenta.

“Promover”, “potenciar” o “mejorar” la cicatrización de heridas o membranas timpánicas significa generalmente aumentar la velocidad por la cual la herida o perforación cicatriza o reducir el grado de tejido necrótico o cicatrización residual durante o tras la cicatrización de la herida o perforación.

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

Una “cantidad eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad que aumenta las concentraciones locales y/o sistémicas de plasminógeno, y/o potencia la cicatrización de heridas. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un agente activo puede ser una cantidad que da como resultado un nivel local (en la perforación, herida o zona de la cicatriz) o sistémico de plasminógeno que supera 200 microgramos/ml. Alternativamente, una cantidad eficaz de un agente es una cantidad que da como resultado una cicatrización más rápida de una perforación o herida que en ausencia del agente, o una formación de tejido necrótico o cicatriz reducida que en ausencia del agente. Una cantidad eficaz podría significar también una cantidad o dosis suficiente para aumentar los niveles locales y/o sistémicos de plasminógeno, por ejemplo, hasta aproximadamente el 10 por ciento, preferiblemente en aproximadamente el 50 por ciento y más preferiblemente en aproximadamente el 100 por ciento del nivel encontrado antes de la administración del fármaco o agente activo. Alternativamente, una cantidad eficaz de plasminógeno es una cantidad correspondiente a de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg e, incluso más preferiblemente, desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 5 mg de plasminógeno por centímetro cuadrado en la zona de la herida. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede mejorar o presentar una respuesta clínicamente significativa en un sujeto, porque, por ejemplo, promueve la cicatrización de heridas o perforaciones de la membrana timpánica, o reduce la formación de cicatrices. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para mejorar un estado de formación de cicatrices o cicatrización de heridas clínicamente significativo en el huésped.

Tal como se usa en el presente documento, “aproximadamente” o “de manera aproximada” deben significar dentro del 50 por ciento, preferiblemente dentro del 20 por ciento, más preferiblemente dentro del 5 por ciento, de un intervalo o valor dado.

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

Según la presente invención, pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante convencionales dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning - A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Glover (DNA Cloning: A Practical Approach, volúmenes I y II, 1985); Hames y Higgins (Nucleic Acid Hybridization, 1985); Hams y Higgins (Transcription and Translation, 1984); Freshney (Animal Cell Culture, 1986); Perbal (A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984); y Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

Las abreviaturas usadas en la presente descripción incluyen las siguientes:

- uPA = activador de plasminógeno de tipo urocinasa;
- 15 PA = activador de plasminógeno;
- MMP = metaloproteinasa de la matriz;
- TIMP = inhibidor tisular de metaloproteinasa;
- tPA = activador de plasminógeno de tipo tisular;
- Plg = Plasminógeno
- 20 MEC = Matriz extracelular

Mejora de la cicatrización de heridas

Según la invención, la cicatrización de heridas se mejora proporcionando o potenciando los niveles de plasminógeno.

En una realización preferida, se usa una preparación sustancialmente pura de plasminógeno humano. Puede adquirirse plasminógeno en forma purificada, o producirse purificando el componente a partir de seres humanos u otros animales, o mediante producción recombinante en células huésped, incluyendo células huésped procariontas tales como *S. cerevisiae* o *E. coli* y, más preferiblemente, células huésped de mamífero tales como células CHO. El plasminógeno puede ser humano de tipo natural, un homólogo de mamífero o modificado/mutado. En particular, pueden usarse fragmentos del componente que conservan al menos una parte de la actividad deseada del componente de longitud completa.

Aplicaciones

La invención puede usarse para acelerar la cicatrización de una membrana timpánica u otra herida en animales incluyendo, pero sin limitarse a, vertebrados tales como seres humanos y animales domésticos, incluyendo perros, gatos y caballos. Además, puede usarse plasminógeno en aplicaciones clínicas para reducir la formación de tejido cicatricial y el tejido necrótico en una zona de la herida, y para potenciar la eliminación de residuos de tejido.

En una realización, la invención se aplica para potenciar la cicatrización de una membrana timpánica perforada en un sujeto humano. El sujeto humano o no humano puede padecer o no un estado que altera o ralentiza la cicatrización de la perforación de la membrana timpánica.

En otra realización, la invención proporciona la aceleración de la cicatrización de una herida en un sujeto. El sujeto puede padecer o no un estado que está asociado con la aparición de heridas, o un estado que afecta a la cicatrización de heridas, tal como diabetes (por ejemplo, úlcera diabética, queloides), heridas crónicas tales como úlceras o úlceras de decúbito.

Puesto que la invención no sólo aumenta la velocidad de cicatrización de heridas, sino que también mejora la calidad de las heridas, es decir, reduce la aparición de cicatrices y la aparición de tejido necrótico, puede administrarse una composición que potencia los niveles de plasminógeno al menos en la zona de la herida a cualquier paciente para reducir la formación de cicatrices. En una realización particular, el sujeto es un ser humano que planea someterse, está sometiéndose o se ha sometido a cirugía plástica o aplicación de un

sustituto de la piel. En tal caso, puede aplicarse o administrarse una composición que comprende plasminógeno tanto antes de como/o tras la cirugía.

Además, la administración de plasminógeno puede reiniciar un patrón de cicatrización de heridas normal en situaciones de cicatrización de heridas alterada. Sin querer restringirse a ninguna teoría particular, además de fibrinólisis, niveles de plasminógeno elevados pueden conducir a un aumento de la plasmina, lo que puede iniciar un proceso de cicatrización de heridas a través de la activación de rutas de citocinas.

Composiciones y tratamientos

Se describen composiciones de plasminógeno que, cuando se administran en una cantidad eficaz, dan como resultado un aumento del nivel de plasminógeno en la zona de la herida de un sujeto y de ese modo una mejora de la cicatrización de una perforación de la membrana timpánica u otra herida.

Por ejemplo, para la aceleración de la cicatrización de la membrana timpánica, puede aplicarse una composición que comprende de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg e, incluso más preferiblemente, desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 5 mg de plasminógeno, a la zona que rodea a una perforación de la membrana timpánica. Alternativamente, pueden aplicarse aproximadamente 10-50 µl de una disolución de plasminógeno 1 mg/ml, o la cantidad correspondiente administrada en otra formulación adecuada. Para la aceleración de la cicatrización de heridas en general, puede aplicarse una composición de plasminógeno de modo que la cantidad de plasminógeno por cada centímetro cuadrado (cm²) de la zona de la herida comprende de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 10 mg e, incluso más preferiblemente, desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 5 mg de plasminógeno.

Alternativamente, va a administrarse plasminógeno de modo que se logra una concentración localmente alta de plasminógeno en la perforación de la membrana timpánica o zona de la herida de un sujeto, por ejemplo, un paciente humano. En una realización preferida, la administración de una cantidad eficaz del agente activo da como resultado una concentración de plasminógeno de al menos aproximadamente 200 µg/ml en la perforación o zona de la herida. Aún en otra realización preferida, la administración de una cantidad eficaz del agente activo da como resultado una concentración de plasminógeno de al menos aproximadamente 200 µg/ml en la perforación o zona de la herida. Todavía en otra realización preferida, la concentración de plasminógeno que resulta de la administración de una cantidad eficaz de un agente activo es de desde aproximadamente 2 µg/ml hasta aproximadamente 2 mg/ml, más preferiblemente de al menos 200 µg/ml. La concentración de plasminógeno en plasma humano es de aproximadamente 200 microgramos por ml.

Por consiguiente, puede formularse plasminógeno en composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*, por ejemplo, mediante inyección o infusión. Por forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo* quiere decirse una forma de la sustancia que va a administrarse en la que cualquier efecto tóxico se compensa por los efectos terapéuticos. La administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una sustancia puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo. Puede ajustarse el régimen de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse diariamente más de una dosis dividida o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

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

La sustancia activa puede administrarse de una manera conveniente tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), inhalación, pulverización, aplicación tópica o transdérmica, o administración rectal. Dependiendo de la vía de administración, la sustancia activa puede recubrirse con un material para proteger al compuesto de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por tanto, las vías de administración adecuadas incluyen administración tópica, intravenosa, intramuscular, intradérmica, rectal e intravaginal. Una vía de administración preferida es la administración tópica. En el caso de perforaciones de la membrana timpánica, el agente activo puede administrarse a través del canal del oído externo. Los vasos que mantienen la membrana timpánica se detienen en el borde de la membrana. Por consiguiente, la sangre y componentes sanguíneos tales como oxígeno, la nutrición y el plasminógeno alcanzan sólo la membrana timpánica mediante difusión.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse mediante métodos conocidos *per se* para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, de manera que una cantidad eficaz de la sustancia activa se combina en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se describen vehículos adecuados, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE.UU. 1985). Basándose en esto, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, disoluciones de las sustancias o los compuestos en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidos en disoluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmóticas con los fluidos fisiológicos.

Las infusiones o formas farmacéuticas inyectables comprenden una disolución de plasminógeno en un líquido farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, solución salina isotónica, agua estéril o sistemas de tampón acuoso.

Tras haberse preparado las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un envase apropiado y etiquetarse para el tratamiento de un estado indicado. Para la administración de una composición de la invención, tal etiquetado incluiría la cantidad, la frecuencia y el método de administración.

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

Ejemplos

La invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son sólo ilustrativos de la invención, y de ningún modo limitan el alcance y significado de la invención. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de esta memoria descriptiva, y pueden realizarse sin apartarse de su espíritu y alcance.

EJEMPLO 1:

Cicatrización de membranas timpánicas alteradas en ratones de tipo natural y deficientes en plasminógeno

Este ejemplo muestra que ratones deficientes en plasminógeno tenían una cicatrización de heridas retardada y anómala en comparación con hermanos control de tipo natural. Estudios a corto plazo entre ratones deficientes en plasminógeno y control de tipo natural mostraron desde tan pronto como 6 horas tras realizarse la perforación, que los ratones deficientes en plasminógeno tenían una respuesta inflamatoria mucho más alta, lo que indica la función del plasminógeno tan pronto como en la fase de inflamación de la cicatrización de heridas.

Métodos

Ratones. Se genotiparon ratones hermanos de tipo natural y deficientes en el gen de plasminógeno macho adultos (C57BL/6J, 8-12 semanas de edad) mediante un ensayo de actividad cromogénica, que determina el nivel de plasminógeno en plasma de ratón (Ny *et al.*, Endocrinology. 140(11):5030-5 (1999)) y se confirmó con PCR. Se anestesiaron los ratones y bajo un otomicroscopio se perforaron sus membranas timpánicas con una lanceta de miringotomía. La perforación ocupaba el cuadrante posterior superior de la membrana timpánica.

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

neo: 5' ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC G 3' (SEQ ID NO:2)

5' TTC GTC CAG ATC ATC CTG ATC GAC 3' (SEQ ID NO:3)

plg: 5' TCA GCA GGG CAA TGT CAC GG 3' (SEQ ID NO:4)

5' CTC TGT GTC TGC CTT CCA TGG 3' (SEQ ID NO:5)

"Neo" significa neomicina, que es el marcador de resistencia usado para el desarrollo de los ratones deficientes en el gen. El gen neo se añade al genoma como una "bala" para inactivar el gen. Por tanto, una célula deficiente en el gen carece del gen intacto pero tiene el gen neo insertado en su lugar.

Se realizó la PCR mediante un procedimiento convencional. En resumen, una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min. seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 93°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y alargamiento a 72°C durante 45 segundos, y finalmente seguido por un alargamiento de 5 min. a 72°C.

- 5 *Genotipado de los animales con ensayo cromogénico.* Para someter a ensayo el nivel de plasminógeno en plasma de ratón, se añadió urocinasa (Ukidan) y se determinó la cantidad de plasmina formada. Comparando la cantidad de plasmina generada entre diferentes muestras de plasma, pudo determinarse el genotipo de un ratón. En resumen, se extrajo sangre de la punta de la cola del ratón en presencia de ácido cítrico 0,04 M. Se preparó plasma centrifugando durante 10 min. a 3000 rpm y se mantuvo a -20°C hasta que se realizó el experimento. Se incubó plasma de ratón, diluido 1000 veces con urocinasa 65 nM, lisina 10 mM y sustrato cromogénico S-2251 80 nM en PBS a 37°C en una placa (96 pocillos) con un volumen total de 200 µl/pocillo. S-2251 se colorea cuando se escinde por una proteinasa. Blancos de muestras individuales, para compensar diferentes colores de las muestras de plasma, eran idénticos a la muestra con la excepción de que se excluyó la urocinasa. Se midió la absorbancia a 405 nm cada 30 min. durante 2 h con un lector de placas Microtiter-tek. Se calculó para cada ratón el aumento promedio en absorbancia a lo largo del tiempo. Pudieron distinguirse los tres genotipos diferentes en tres niveles diferentes de aumento promedio en absorbancia a lo largo del tiempo, alto (plg+/+), medio (plg+/-) y bajo (plg/-).

- 20 *Evaluación clínica de la cicatrización de heridas y preparaciones histológicas.* Se evaluó el aspecto de la cicatrización de heridas bajo otomicroscopio a los 4, 8, 36, 72 y 144 días tras la perforación, respectivamente. En cada punto de tiempo, se decapitaron los ratones, se eliminó el tejido blando de sus bullas timpánicas, se abrieron y se pusieron en glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato durante la noche. Se diseccionó la membrana timpánica, incluyendo la pars tensa y pars flaccida, se enjuagó y se fijó posteriormente en tetróxido de osmio. Tras deshidratación en acetona, se incrustaron las muestras en una resina epoxídica. Se cortaron las membranas timpánicas incrustadas en plástico en paralelo al mango del martillo a través del cuadrante perforado. Se examinaron entonces las secciones de 0,5 micrómetros, teñidas con azul de toluidina, en el microscopio óptico. También se cortaron secciones ultrafinas, de 700 nm de grosor, y se tiñeron por contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo y entonces se estudiaron en el microscopio electrónico.

Resultados

- 30 La cicatrización de la membrana timpánica estaba alterada en ratones deficientes en plasminógeno, tal como revelaba el examen morfológico e histológico (véase la tabla 2). La tabla 2 muestra los resultados de la evaluación del aspecto otomicroscópico de la membrana timpánica, como función del tiempo tras la perforación. Se proporcionan los números de membranas timpánicas manifiestamente cerradas en relación con el número total examinado. El análisis morfológico reveló que los ratones de tipo natural cicatrizaban perfectamente, sin embargo, todas las perforaciones en ratones deficientes en plasminógeno tenían un patrón de cicatrización totalmente alterado en comparación con el tipo natural.

TABLA 2

La cicatrización de la membrana timpánica está alterada permanentemente en ratones deficientes en plasminógeno

- 40 La tabla muestra la fracción de membranas timpánicas manifiestamente cubiertas en cada grupo en cada punto de tiempo.

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

- 45 Además, se evaluaron datos de la cicatrización de ratones que eran heterocigotos para el gen de plasminógeno. Estos ratones tenían el 50% de la concentración de plasminógeno en sus fluidos corporales y se encontró que tenían una cicatrización retardada en comparación con ratones de tipo natural. Esto muestra que el proceso de cicatrización es dependiente de la dosis y por tanto que la administración de plasminógeno a seres humanos y ratones de tipo natural podría acelerar el proceso de cicatrización.

EJEMPLO 2: Cicatrización de membranas timpánicas en ratones deficientes en plasminógeno reconstituidos con plasminógeno

Este ejemplo demuestra que mediante reconstitución de plasminógeno en ratones deficientes en plasminógeno mediante administración sistémica, el fenotipo se convirtió completamente de nuevo en cicatrización de heridas normal.

Métodos

5 Se realizó este experimento de una manera similar al ejemplo 1, excepto por la administración de plasminógeno a un grupo de animales.

10 *Reconstitución de plasminógeno en ratones deficientes en plasminógeno.* Se reconstituyó plasminógeno humano en ratones deficientes en plasminógeno mediante inyecciones intravenosas repetidas de 1,5 mg de plasminógeno en 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se administró la primera dosis 12 horas antes de la perforación de la membrana timpánica. Después de eso, se administró plasminógeno cada 24 horas a lo largo de toda la duración del experimento.

Resultados

15 La reconstitución de plasminógeno en ratones deficientes en plasminógeno mediante inyección i.v. restauró la cicatrización de heridas normal en ratones deficientes en plasminógeno. La tabla 3 muestra los resultados de la evaluación del aspecto otomicroscópico de la membrana timpánica tras la cicatrización. Se proporciona el número de membranas timpánicas cicatrizadas en relación con el número total examinado.

TABLA 3

Cicatrización de membranas timpánicas en ratones deficientes en Plg tras la administración de Plg

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

Tiempo tras la perforación (días):	4	8	11
Ratones Plg ^{-/-} :	0/3	0/3	0/3
Ratones de tipo natural:	0/3	2/3	3/3
Plg ^{-/-} a los que se les inyectó plg:	0/3	2/3	3/3

20

25 Por tanto, en ratones deficientes en plasminógeno, la cicatrización de heridas de la membrana timpánica es anómala, mientras que la cicatrización de la membrana timpánica se restaura en ratones deficientes en plasminógeno tras la administración de plasminógeno. Además, tras 144 días, ninguno de los ratones deficientes en plasminógeno tenía membranas timpánicas cicatrizadas de manera normal, el patrón de cicatrización era completamente aberrante porque la membrana timpánica se hizo gruesa y no transparente, con tejido similar a adoquines blanquecino cubriendo la zona de la herida. El análisis de la morfología reveló que el tejido que rellenaba la zona de la herida tenía una estructura similar a fibrina, lo que indica que se había dificultado la migración celular. Era evidente la necrosis desde el día 16 en adelante.

EJEMPLO 3:

30 Cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica en ratones deficientes en tPA

35 Se perforaron membranas timpánicas (MT) de ratones deficientes en tPA (tPA^{-/-}) y de tipo natural en el día 0, y se siguió el patrón de cicatrización bajo otomicroscopio, tal como se describió anteriormente. Los resultados se describen en la tabla 4. Se cruzaron una vez ratones deficientes en tPA retrocruzados 6 veces con antecedentes C57B1/6 con antecedentes DBA1/J. Se usaron camadas heterocigotas para la cría. Se usaron la descendencia de tipo natural (tPA^{+/+}) y homocigota (tPA^{-/-}) de estas crías en los experimentos de cicatrización de heridas.

TABLA 4**Cicatrización de membranas timpánicas en ratones deficientes en tPA**

La tabla muestra la fracción de membranas timpánicas cicatrizadas en cada grupo en cada punto de tiempo

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

5 El patrón de cicatrización de la perforación de la MT en ratones tPA^{-/-} era idéntico al de ratones control de tipo natural, y la calidad del tejido de MT cicatrizado en ratones tPA^{-/-} y controles de tipo natural parecía idéntica, porque no pudieron observarse depósitos de fibrina o tejido “similar a adoquines” en la zona de la herida. Por consiguiente, no se observaron diferencias cuantitativas o cualitativas en la cicatrización de membranas timpánicas en ratones deficientes en tPA en comparación con ratones de tipo natural, indicando de ese modo que tPA desempeña un papel menor, si es que desempeña alguno, en la cicatrización de membranas timpánicas.

EJEMPLO 4:**Cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica en ratones deficientes en uPA**

15 Se perforaron membranas timpánicas en ratones de tipo natural y deficientes en uPA (uPA^{-/-}) en el día 0, y se monitorizó el patrón de cicatrización mediante otomicroscopio tal como se describió anteriormente. Los resultados se exponen en la tabla 5. Se cruzaron una vez ratones deficientes en uPA retrocruzados 6 veces con antecedentes C57B1/6 con antecedentes DBA1/J. Se usaron las camadas heterocigotas para la cría. Se usaron las descendencias de tipo natural (uPA^{+/+}) y homocigota (uPA^{-/-}) de estas crías en experimentos de cicatrización de heridas.

TABLA 5**20 Cicatrización de membranas timpánicas en ratones deficientes en uPA**

La tabla muestra la fracción de membranas timpánicas cicatrizadas en cada grupo en cada punto de tiempo

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

25 Este experimento mostró que la cicatrización de la perforación de la membrana timpánica en ratones deficientes en uPA estaba algo retardada en comparación con controles de tipo natural, y podía observarse tejido similar a adoquines y blanquecino, con deposiciones de fibrina, en la zona perforada tras la cicatrización. Estos datos sugieren que uPA puede desempeñar un papel en el proceso de cicatrización de heridas o membranas timpánicas, afectando posiblemente al aclaramiento de deposiciones de fibrina, aunque en un menor grado que el plasminógeno.

30 EJEMPLO 5:**Administración “tardía” de plasminógeno**

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

35 **Métodos.** Se prepararon ratones deficientes en plasminógeno (plg^{-/-}) tal como se describió anteriormente. Se perforaron las membranas timpánicas en el día 0. En el día 36 y en adelante durante 7 días, se inyectó a un grupo de los ratones plg^{-/-} diariamente 1,5 mg de plasminógeno humano en 150 µl de disolución.

5 *Resultados.* Pudo detectarse mediante otomicroscopía una reducción de la matriz extracelular acumulada de manera anómala debido a la administración de plasminógeno. Específicamente, en los ratones deficientes en plasminógeno que recibieron administraciones diarias de plasminógeno humano, se inició una reacción inflamatoria que dio como resultado una exudación de material acumulado a partir de la zona de la membrana timpánica en el plazo de 2 días tras la primera administración. Durante el periodo de inyección de 7 días, estos ratones mostraron un grosor enormemente disminuido de la matriz extracelular acumulada de manera anómala (que consistía principalmente en fibrina y tejido necrótico). Tras este periodo de 7 días inicial, el patrón de cicatrización de algunas membranas timpánicas se asemejaba al de la cicatrización normal. Estos resultados indican que el plasminógeno es esencial para el aclaramiento de fibrina y la eliminación de tejido necrótico.

10 En un experimento de restauración de plasminógeno similar, ratones deficientes en plasminógeno recibieron plasminógeno durante o bien los días 0-3, los días 4-7 o bien los días 8-11 tras la perforación. Este experimento mostró que el plasminógeno era importante durante las tres fases de la cicatrización de heridas: la fase inflamatoria, la fase de formación de tejido y la fase de remodelación tisular.

15 **EJEMPLO 6:**

Aplicación tópica de plasminógeno en membranas timpánicas perforadas en ratas de tipo natural

Este ejemplo muestra que la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica mejora en ratas de tipo natural mediante la aplicación local de plasminógeno.

20 *Métodos.* Se pincharon diez membranas timpánicas por grupo de estudio de animales. Se aplicaron cincuenta µl de PBS (control) o plasminógeno humano a una concentración de 1 mg/ml o 10 mg/ml directamente sobre la perforación de la membrana timpánica. Se repitió la adición de plasminógeno o control cada 24 horas, y se monitorizaron la reacción inflamatoria y el patrón de cicatrización a diferentes puntos de tiempo. Específicamente, se siguió la acumulación de líquido inflamatorio en la cavidad del oído medio en la zona del espacio epitimpánico, y se siguió la retracción de las perforaciones de la MT durante las primeras 108 horas tras las perforaciones.

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

TABLA 6

30 **Mejora de la cicatrización de perforaciones de la membrana timpánica en ratas de tipo natural mediante la administración de plasminógeno**

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

35 Las ratas que recibieron 10 mg/ml de plasminógeno tenían la reacción inflamatoria más fuerte en la zona del espacio epitimpánico del oído medio, mientras que las ratas que recibieron plasminógeno 1 mg/ml presentaban una reacción inflamatoria casi similar a los controles. Se observó la cicatrización más rápida de las membranas timpánicas en el grupo de 10 mg/ml, aunque ambos grupos que recibieron plasminógeno mostraron una retracción mejorada de la perforación durante las primeras 108 horas en comparación con los controles.

EJEMPLO 7:

40 **Caracterización de acontecimientos de remodelación tisular y migración celular en ratones deficientes en plasminógeno**

45 Con el fin de caracterizar los acontecimientos de remodelación tisular y migración celular anómalos en ratones deficientes en plasminógeno (plg^{-/-}), se realizaron inmunotinciones en serie de queratina, fibrina y neutrófilos en membranas timpánicas en cicatrización/cicatrizadas de ratones de tipo natural y plg^{-/-} en los días 4, 8, 16, 36, 72 y 144 tras la perforación. El anticuerpo reactivo con neutrófilos era de Cedarlane (Canadá), el anticuerpo anti-queratina era de ICN Pharmaceuticals, Inc., y el anticuerpo reactivo con fibrinógeno/fibrina era de Nordic Immunology.

5 *Resultados.* En el día 36 y en adelante tras la perforación, los ratones deficientes en plasminógeno tenían una composición de la matriz extracelular anómala en comparación con ratones de tipo natural. En los ratones deficientes en plasminógeno, las perforaciones contenían cantidades aumentadas de fibrina en lugar de queratina, mientras que la queratina “se mantuvo” en el borde de la perforación. Bajo otomicroscopio, estos depósitos de fibrina se observan como tejido en costra “similar a adoquines”, blanquecino. También se habían infiltrado grandes cantidades de neutrófilos en la zona de la herida. Además, era evidente tejido necrótico en todos los ratones deficientes en plasminógeno en el día 16 tras la perforación y en adelante. Los ratones de tipo natural presentaban una zona de la herida cicatrizada idéntica a controles de tipo natural normales.

10 Estos datos sugieren que el plasminógeno, o bien directamente o bien mediante la formación de plasmina, es importante para prevenir o reducir las deposiciones de fibrina, promover la formación de capas de queratina así como eliminar tejido necrótico.

15 La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse además que los valores son aproximados, y se proporcionan para descripción.

Lista de secuencias

- <110> NY, Tor
- 20 LI, Jinan
- HELLSTROM, Sten
- ERIKSSON, Per-Olof
- <120> MÉTODO DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS
- <130> 3810/2J759-WO0
- 25 <150> Documento US 60/317.643
- <151> 06/09/2001
- <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 30 <211> 810
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <300>
- <308> GenBank / 625234
- 35 <309> 15/09/2000
- <313> (1)..(810)
- <400> 1

ES 2 387 797 T3

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30

Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu
 35 40 45

Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
 50 55 60

Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
 65 70 75 80

Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95

Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
 100 105 110

Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125

Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
 130 135 140

ES 2 387 797 T3

Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
 145 150 155 160

Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175

Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190

Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205

Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220

Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
 225 230 235 240

Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 245 250 255

Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270

Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 275 280 285

Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro
 290 295 300

His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
 325 330 335

Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 340 345 350

Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365

Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380

Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400

ES 2 387 797 T3

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

ES 2 387 797 T3

Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
660 665 670

Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
675 680 685

Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
690 695 700

Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
705 710 715 720

Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
725 730 735

Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
740 745 750

Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
755 760 765

Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
770 775 780

Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
785 790 795 800

Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
805 810

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 2

atgattgaac aagatggatt gcacg

10

25

<210> 3

<211> 24

ES 2 387 797 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
5	<400> 3	
	ttcgtccaga tcatcctgat cgac	24
	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de PCR	
	<400> 4	
	tcagcagggc aatgtcacgg	20
15	<210> 5	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador de PCR	
	<400> 5	
	ctctctgtct gccttcatg g	21

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de plasminógeno para su uso en la aceleración de la cicatrización de heridas, para su uso en la reducción de la formación de cicatrices de una herida en cicatrización, o para su uso en la reducción de la formación de tejido necrótico en una herida en cicatrización en un mamífero, formulándose la composición para administración intravenosa, inyección subcutánea, administración intradérmica o administración intramuscular.
2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el mamífero es un ser humano y el plasminógeno es plasminógeno humano.
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el plasminógeno es plasminógeno purificado de una fuente biológica.
4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que la herida se selecciona del grupo que consiste en heridas cutáneas, moretones, ulceraciones, úlceras de decúbito, rasguños, desgarrros, cortes, picaduras, heridas de psoriasis, perforaciones de la membrana timpánica y quemaduras.

15

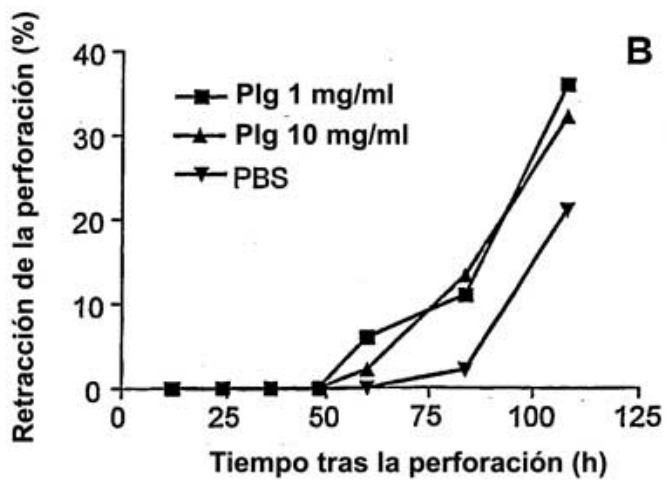
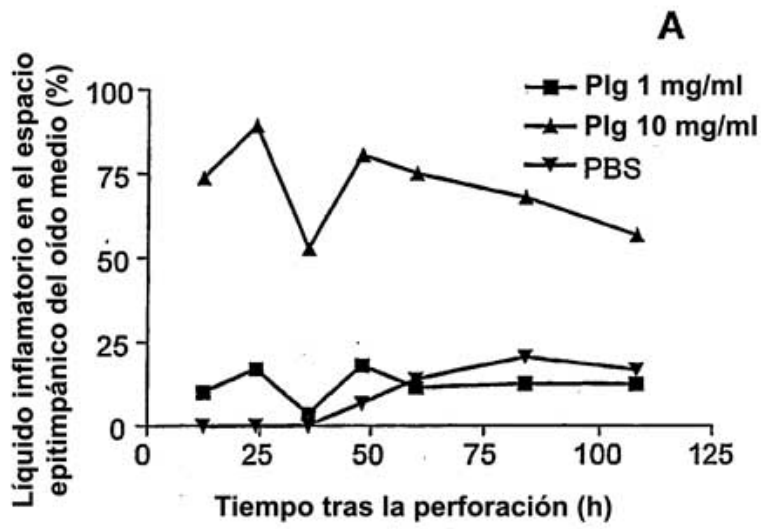


FIGURA 1