

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 496**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2007 E 07794196 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2056865**

54 Título: **Diana farmacológica novedosa de prevención y tratamiento de enfermedad periodontal, mejora de la cicatrización de heridas periodontales y promoción de la salud oral**

30 Prioridad:

**28.08.2006 US 823665 P**

**15.06.2007 US 944111 P**

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

**08.04.2014**

73 Titular/es:

**OMNIO HEALER AB (100.0%)**

**Villavägen 1**

**903 36 Umeå, SE**

72 Inventor/es:

**NY, TOR;**

**LI, JINAN;**

**GUO, YONGZHI y**

**LINDH, TOMAS**

**ES 2 453 496 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

Diana farmacológica novedosa de prevención y tratamiento de enfermedad periodontal, mejora de la cicatrización de heridas periodontales y promoción de la salud oral.

### Campo de invención

5 Esta invención se refiere a métodos para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de enfermedad periodontal infecciosa por ejemplo gingivitis y periodontitis, y estados necróticos que afectan al tejido de las encías, se refiere a la promoción de la salud oral en general, y también se refiere a la mejora de la cicatrización de heridas periodontales tales como heridas quirúrgicas localmente. En particular, la invención se refiere a un método novedoso de  
10 prevención y tratamiento de enfermedad periodontal infecciosa, promoción de la salud oral y mejora de la cicatrización de heridas periodontales.

### Antecedentes

#### Enfermedad periodontal

15 La enfermedad periodontal es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a los tejidos que soportan y anclan los dientes, también conocido como periodonto. Está provocada por la interacción desequilibrada entre los microorganismos subgingivales específicos y la respuesta inmunitaria e inflamatoria del huésped (1). Afecta casi a tres cuartas partes de las poblaciones adultas y se considera como una de las enfermedades más comunes en seres humanos. Los tejidos que están implicados en enfermedades periodontales son las encías, que incluyen la encía, el ligamento periodontal, el cemento y el hueso alveolar (figura 1). La encía es una membrana mucosa queratinizada de color rosa que cubre parte de los dientes y parte del hueso alveolar. El ligamento periodontal es la  
20 parte principal de las encías. El cemento es una estructura calcificada que cubre las partes inferiores de los dientes. El hueso alveolar es un conjunto de protuberancias de los huesos de la mandíbula (maxilar y mandibular) en las que están incrustados los dientes. La zona en la que se inicia la enfermedad periodontal es el surco gingival, un espacio entre los dientes y las encías.

25 La infección, inflamación y posterior defensa del huésped y cicatrización de heridas son todos signos característicos de la enfermedad periodontal. Esta enfermedad comienza como una infección bacteriana mixta en la encía que rodea a los dientes (2). En la boca sana, se han encontrado más de 500 especies de microorganismos. En enfermedades periodontales, se han estudiado varios posibles patógenos periodontales incluyendo *Porphyromonas gingivalis*, *Campilobacter rectus*, *Actinobacillus actinomcetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, que se considera que representan una parte significativa de la microbiota patógena. Estos microorganismos pueden inducir  
30 varios factores, tales como IL-1, IL-6, TNF, así como enzimas, en células huésped que directa o indirectamente se cree que provocan destrucción tisular irreversible incluyendo la destrucción de las encías, el hueso alveolar, la capa externa de la raíz del diente y conduce finalmente a la pérdida del diente. Además, la enfermedad periodontal grave puede conducir a mal aliento, enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular, diabetes, enfermedades respiratorias y parto prematuro durante el embarazo. Hay otros factores patógenos tales como fumar/tabaquismo, genética, embarazo y pubertad, estrés, medicaciones, diabetes, mala nutrición y otras enfermedades sistémicas.  
35

Otra forma de destrucción infecciosa del hueso alveolar, que se asemeja estrechamente a la periodontitis, concretamente la periimplantitis, puede producirse tras la implantación quirúrgica de un material aloplástico en las mandíbulas. El método de implantación se denomina a menudo osteointegración (3), que supone el contacto estrecho entre el material aloplástico, es decir, el implante dental (a menudo fabricado de titanio) y el hueso vivo. El  
40 método se usa para restaurar la oclusión posterior a la pérdida de los dientes naturales y es ahora un método convencional para tratar el edentulismo. Una diferencia principal entre el implante dental osteointegrado y el diente natural es la ausencia de un periodonto verdadero alrededor del implante. Mientras que el diente normal está suspendido en una malla de fibras de colágeno que permite una movilidad fisiológica del diente dentro del hueso alveolar, el implante dental está firmemente conectado al hueso sin tejido blando intermedio. A pesar de esta  
45 diferencia importante en la unión al tejido óseo, los cambios patológicos en los dientes e implantes durante la infección comparten muchas características clave tales como infección por medio de formación y colonización de biopelícula, respuesta inflamatoria, así como defensa inmunológica. Por tanto, la periimplantitis es un proceso inflamatorio/infeccioso que afecta a los tejidos alrededor de un implante osteointegrado en funcionamiento, dando como resultado la pérdida del hueso de soporte. La periimplantitis puede conducir a desintegración completa y  
50 pérdida del implante incluso si se ha realizado tratamiento extenso dirigido a resolver la infección periimplantaria. La periimplantitis también sucede como cambios inflamatorios/infecciosos reversibles de los tejidos blandos periimplantarios sin pérdida de hueso. Se ha notificado la prevalencia de periimplantitis en el tejido blando en el intervalo del 8-44%, mientras que se ha notificado la frecuencia de periimplantitis en el hueso en el intervalo del 1-19%. Los amplios intervalos de las frecuencias parecen deberse a diferencias en la definición de la entidad, al  
55 menos en parte. La frecuencia de periimplantitis está lo más estrechamente relacionada con el número de años que se han llevado los implantes. Puesto que el tratamiento con implantes dentales se introdujo de manera comparativamente reciente, los números probablemente aumentarán a lo largo de los años. Considerando las grandes similitudes en la respuesta inflamatoria y la defensa inmunológica con la infección en dientes e implantes dentales, la periimplantitis podría considerarse como una forma de enfermedad periodontal que afecta al material

aloplástico implantado.

La enfermedad periodontal es un aspecto importante de la salud oral general. La salud oral se refiere al estado de salud de los tejidos orales y relacionados que permiten a un individuo comer, hablar y socializarse sin enfermedad activa, molestia o vergüenza y que contribuye al bienestar general. Las principales indicaciones de la salud oral incluyen la flora bacteriana en la saliva y el tejido de las encías, así como la necrosis tisular e inflamación en el tejido de las encías. La salud oral es integral para la salud general y no debe considerarse aislada.

Los antibióticos y otros fármacos antimicrobianos se han usado ampliamente en tratamiento de enfermedades infecciosas desde la época de la Segunda Guerra Mundial. El éxito de los antimicrobianos contra microbios que provocan enfermedades está entre los grandes logros de la medicina moderna. Sin embargo, muchos antimicrobianos no son tan eficaces como solían serlo. Un factor clave en el desarrollo de resistencia a antibióticos es la capacidad de los organismos infecciosos para adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones del entorno. A lo largo del tiempo, algunas bacterias han desarrollado modos de sortear los efectos de los antibióticos. Se cree que el uso generalizado de antibióticos ha estimulado evolutivamente adaptaciones que permiten a las bacterias sobrevivir a estos fármacos una vez tan poderosos. En última instancia, la creciente dificultad en la lucha contra los microbios conduce a un aumento del riesgo de adquirir infecciones en un hospital u otro entorno. La farmacorresistencia es un problema especialmente difícil para hospitales que albergan pacientes gravemente enfermos que no pueden luchar contra las infecciones sin la ayuda de antibióticos. Por tanto, hay una conciencia creciente de que son altamente necesarias estrategias terapéuticas novedosas para mejorar la defensa contra la infección.

El tratamiento de enfermedad periodontal incluye métodos conservativos (no quirúrgicos) y métodos quirúrgicos. El tratamiento conservativo consiste en limpiezas profundas conocidas como eliminación de sarro y alisado radicular así como legrado. Este tratamiento está dirigido a eliminar la biopelícula que coloniza las superficies de las raíces afectadas y restablecer un entorno en el que pueda producirse la curación. Acompañado con buena higiene oral, esto mantendrá encías normales sanas. El tratamiento periodontal quirúrgico consiste en cirugía ósea (del hueso), injertos gingivales/periodontales, procedimiento de colgajo gingival, frenectomía, gingivectomía, aumento óseo/regeneración tisular guiada. Sin embargo, a pesar de los diversos métodos terapéuticos que han mejorado satisfactoriamente el tratamiento de enfermedad periodontal, existen todavía grandes desafíos en la salud oral. Tales factores desafiantes incluyen el aumento de la resistencia de las bacterias orales a los antibióticos, las necesidades de métodos más sencillos para mejorar la salud oral en general, el procedimiento de cuidado dental caro y tedioso, la estresante vida moderna y la carga dental más pesada en grupos desfavorecidos en países desarrollados y en desarrollo. Por tanto, hay grandes necesidades de métodos novedosos de prevención y tratamiento de enfermedad periodontal, promoción de la salud oral y mejora de la cicatrización de heridas periodontales.

### Necrosis

La necrosis es el nombre dado a la muerte no programada o accidental de células y tejido vivo. Está menos ordenada que la apoptosis, que es parte de la muerte celular programada. En contraposición a la apoptosis, la limpieza de residuos celulares por fagocitos del sistema inmunitario es generalmente más difícil, ya que la muerte celular desordenada generalmente no envía señales celulares de "cómeme" que indiquen a los fagocitos cercanos que engullan la célula moribunda. Esta falta de señalización hace más difícil que el sistema inmunitario localice y recicle las células muertas que han muerto a través de necrosis que si la célula hubiese experimentado apoptosis. La liberación del contenido intracelular tras el daño a la membrana celular es la causa de inflamación en la necrosis. Hay muchas causas de necrosis incluyendo lesión, infección, cáncer, infarto, envenenamiento e inflamación. El daño grave a un sistema esencial en la célula conduce a daño secundario a otros sistemas, una denominada "cascada de efectos". La necrosis está provocada por enzimas especiales que se liberan por lisosomas que pueden digerir componentes celulares o la propia célula completa. Las lesiones recibidas por la célula pueden comprometer la membrana de los lisosomas, o pueden dar lugar a una reacción en cadena desorganizada que provoca la liberación de enzimas. A diferencia de la apoptosis, las células que mueren por necrosis pueden liberar productos químicos perjudiciales que dañan a otras células. La necrosis del material de biopsia se detiene mediante fijación o congelación.

Se produce necrosis en determinados tipos de enfermedad periodontal. La gingivitis necrotizante es un estado gingival destructivo inflamatorio caracterizado por úlceras necróticas interproximales, hemorragia espontánea, rápida aparición de dolor y mal olor. A menos que se trate apropiadamente, la gingivitis necrotizante tiene una marcada tendencia a reaparecer y conducir a una pérdida considerable de soporte periodontal.

Actualmente hay cuatro métodos terapéuticos principales para curar la necrosis. El primero es quirúrgico, que es el más rápido, y por tanto se recomienda cuando están presentes áreas necróticas grandes o costras gruesas. El segundo es mecánico, que incluye hidroterapia, dextranómeros e irrigación de heridas. El tercero es enzimático, la enzima usada es principalmente colagenasa (por ejemplo: Santyl), sin embargo, el efecto es demasiado lento cuando está presente infección; y el cuarto es a través de un método autolítico, que es por medio de enzimas en el fluido de la herida pero el efecto es extremadamente lento. Sin embargo, ninguno de los cuatro métodos de tratamiento podía proporcionar una remodelación tisular y eliminación de la necrosis funcional y estéticamente satisfactoria. Por tanto,

hay una gran necesidad de una estrategia terapéutica novedosa para lograr una eliminación exitosa de la necrosis.

#### El sistema de activación de plasminógeno

La plasmina es el componente clave del sistema de PA. Es una proteasa de amplio espectro que tiene la capacidad para degradar varios componentes de la ECM incluyendo fibrina, gelatina, fibronectina, laminina y proteoglicanos (4). Además, la plasmina puede convertir algunas pro-metaloproteinasas de la matriz (pro-MMP) en MMP activas. Por tanto, se ha sugerido que la plasmina puede ser un importante regulador anterior de la proteólisis extracelular (5;6). La plasmina se forma a partir del zimógeno plasminógeno a través de escisión proteolítica mediante cualquiera de dos PA fisiológicos, tPA o uPA. Ya que el plasminógeno está presente en el plasma y otros fluidos corporales a niveles relativamente altos, la regulación del sistema de PA se produce principalmente al nivel de la síntesis y actividad de los PA. La síntesis de los componentes del sistema de PA está altamente regulada por diferentes factores tales como hormonas, factores de crecimiento y citocinas. Además, existen inhibidores fisiológicos específicos de plasmina y PA. El principal inhibidor de plasmina es  $\alpha_2$ -antiplasmina (7). La actividad de PA está regulada por PAI-1, que inhibe tanto uPA como tPA, y PAI-2, que inhibe principalmente uPA. Determinadas células tienen también un receptor de superficie celular específico para uPA (uPAR) que puede dirigir la actividad proteolítica a la superficie celular (8;9).

El plasminógeno es una glicoproteína de cadena sencilla que consiste en 790 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 92 kDa (7;8). El plasminógeno se sintetiza principalmente en el hígado y es abundante en la mayoría de los fluidos extracelulares. En plasma, la concentración de plasminógeno es de aproximadamente 2  $\mu$ M. Por tanto, el plasminógeno constituye una gran fuente potencial de actividad proteolítica en tejidos y fluidos corporales (9;10). El plasminógeno existe en dos formas moleculares: Glu-plasminógeno y Lys-plasminógeno. La forma secretada y no escindida nativa tiene un ácido glutámico amino-terminal (N-terminal) y se designa por tanto como Glu-plasminógeno. Sin embargo, en presencia de plasmina, Glu-plasminógeno se escinde en Lys<sup>76</sup>-Lys<sup>77</sup> para convertirse en Lys-plasminógeno. En comparación con Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno tiene una afinidad superior por fibrina y se activa por PA a una tasa superior. Estas dos formas de plasminógeno pueden escindirse en el enlace peptídico Arg<sup>560</sup>-Val<sup>561</sup> por uPA o tPA, dando como resultado la formación de la proteasa bicatenaria unida por disulfuros plasmina (11). La parte amino-terminal del plasminógeno contiene cinco bucles triples homólogos, denominados kringles, y la parte carboxilo-terminal contiene el dominio proteasa. Algunos de los kringles contienen sitios de unión de lisina que median en la interacción específica de plasminógeno con fibrina y su inhibidor  $\alpha_2$ -AP. Un hallazgo novedoso e interesante es que un fragmento de plasminógeno de 38 kDa, que consiste en los kringles 1-4, es un potente inhibidor de la angiogénesis. Este fragmento se denomina angiostatina y puede generarse a partir de plasminógeno a través de escisión proteolítica mediante varias MMP.

El principal sustrato de la plasmina es la fibrina, y la disolución de la fibrina es fundamental para la prevención de la formación de coágulos sanguíneos patológica (12). La plasmina también tiene especificidades de sustrato para otros varios componentes de la ECM, incluyendo laminina, fibronectina, proteoglicanos y gelatina, lo que indica que la plasmina también desempeña un importante papel en la remodelación de la ECM (8;13;14). Indirectamente, la plasmina puede degradar también componentes adicionales de la ECM a través de su capacidad para convertir algunas pro-MMP en MMP activas, incluyendo MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9. Por tanto, se ha sugerido que la plasmina puede ser un importante regulador anterior de la proteólisis extracelular (15). Además, la plasmina tiene la capacidad para activar formas latentes de determinados factores de crecimiento (16-18). *In vitro*, la plasmina también escinde componentes del sistema del complemento y de ese modo libera fragmentos quimiotácticos del complemento.

Se ha sugerido que el sistema de PA está implicado en varias fases y mediante diversos mecanismos durante la invasión bacteriana (19). Un gran número de patógenos expresan receptores de plasmin(ógeno) (20;21). Las bacterias también influyen en la secreción de PA y sus inhibidores a partir de células de mamífero (22;23). Por ejemplo, se ha encontrado que la producción de uPA está potenciada en células infectadas por diversas bacterias (24). Hasta la fecha, existen pruebas *in vivo* de un papel de la activación de plasminógeno en la patogénesis en unas cuantas bacterias tales como *Yersinia pestis*, *Borrelia* y estreptococos del grupo A.

La unión de plasminógeno a receptores presentes en las superficies de algunas bacterias convierte a estas bacterias en organismos proteolíticos. En bacterias Gram-negativas, los apéndices filamentosos de la superficie forman un grupo principal de receptores de plasminógeno (25;26). En bacterias Gram-positivas, se han identificado moléculas unidas a la superficie como receptores de plasminógeno (27;28). Como consecuencia, puede generarse plasmina en la superficie de microorganismos tales como *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, y *Borrelia burgdorferi*, lo que puede conducir a la degradación de la ECM de mamíferos. Además, proteasas bacterianas también pueden activar directamente procolagenasas latentes o inactivar inhibidores de proteasas en plasma humano, y por tanto contribuir al daño tisular y la propagación bacteriana a través de barreras tisulares (29;30).

#### Modelos de enfermedad periodontal y heridas periodontales

Los modelos de enfermedad periodontal incluyen el tipo espontáneo y el tipo inducido. El tejido periodontal está expuesto a un entorno rico en microbios. Se producen constantemente invasión bacteriana y posterior defensa del

huésped en la cavidad oral y normalmente permanecen en equilibrio. La alteración de este equilibrio huésped-bacterias provoca diversos tipos de enfermedad periodontal. Esto podría deberse a un desequilibrio entre la microbiota oral, alteraciones en la función de fagocitos y/o respuesta inmunitaria específica. Se produce enfermedad periodontal grave en aproximadamente el 2% de los adolescentes estadounidenses y en aproximadamente el 20% de los adultos estadounidenses.

La inducción de enfermedad periodontal por determinadas especies bacterianas proporciona modelos definidos para la periodontitis. Los patógenos periodontales comúnmente usados incluyen *Porphyromonas gingivalis*, *Campilobacter rectus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Fusobacterium nucleatum*, que se considera que representan una parte significativa de la microbiota patógena. Presentan o pueden inducir en células huésped varios factores, tales como IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral, proteínas asociadas a la superficie, fimbrias, vesículas, toxinas y enzimas, que se cree que provocan, directa o indirectamente, pérdida irreversible de tejidos de soporte periodontales.

Se observan comúnmente heridas periodontales, especialmente durante cirugía periodontal. Puede establecerse un modelo de herida periodontal induciendo heridas por incisión en el tejido de las encías en los ratones. Después de eso, puede evaluarse el patrón de cicatrización de las heridas y los efectos del fármaco candidato o compuestos.

El método actual para tratar infecciones tales como necrosis así como enfermedad periodontal tiene desventajas tal como se comentó anteriormente. Por tanto, hay todavía una necesidad en la técnica de estrategias y medios mejorados para tratar la enfermedad periodontal y mejorar la salud oral.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento novedoso de que componentes de la ruta de activación de plasminógeno, y compuestos con la capacidad para activar plasminógeno, pueden usarse para estrategias nuevas y mejoradas para prevenir y tratar enfermedad periodontal y necrosis tisular, para la cicatrización de heridas periodontales (tales como heridas quirúrgicas) y para promover la salud oral en general. La administración de plasminógeno y/u otros miembros de la ruta de activación de plasminógeno o compuestos con la capacidad para activar plasminógeno desempeña un papel pluripotente en la protección frente a la infección inducida por bacterias y la promoción de la cicatrización de heridas periodontales activando células inflamatorias, acelerando la migración de queratinocitos, destruyendo bacterias, eliminando tejido necrótico y potenciando la expresión de citocinas. La aparición extensa de enfermedad periodontal en ratones deficientes en plasminógeno en condiciones naturales también proporciona un modelo animal excelente para estudiar la enfermedad periodontal, y métodos de selección para identificar y evaluar nuevos fármacos y métodos de tratamiento para diversos aspectos de la enfermedad periodontal, mejora de heridas periodontales y promoción de la salud oral en general.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el uso de un compuesto o agente activo que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o tiene la capacidad para activar plasminógeno directamente o por medio de la ruta de activación de plasminógeno para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto/agente, o una combinación de dos o más de tales agentes/compuestos, para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de enfermedad periodontal, especialmente enfermedad periodontal infecciosa, y/o la eliminación de necrosis en el tejido de las encías, en un sujeto que necesita tal tratamiento. Preferiblemente, el agente activo se selecciona de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico. Lo más preferiblemente, el agente activo es plasminógeno y sus derivados. El agente activo puede administrarse por cualquier vía de administración conocida en la técnica. Las vías de administración preferidas, no limitativas incluyen aplicación tópica, inyección intragingival e inyección intravenosa. El agente también puede estar presente en un apósito para heridas aplicado sobre la zona infectada de tejido periodontal, si es posible, desde el que se transfiere al sitio infectado de tejido periodontal. La composición puede ser parte de un gel, una loción, un bálsamo, una pasta (pasta de dientes), disolución para gargarismos (disolución de enjuague bucal) o apósito para heridas.

La presente invención también proporciona el uso de un compuesto o agente activo que es un componente de la ruta de activación del plasminógeno o un compuesto que tiene la capacidad para activar plasminógeno directamente o por medio de la ruta de activación del plasminógeno para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de tal compuesto/agente, o una combinación de dos o más de tales compuestos/agentes, para mejorar la resolución y/o promoción de la cicatrización de heridas periodontales y heridas periodontales quirúrgicas, especialmente heridas periodontales infecciosas y heridas periodontales infecciosas quirúrgicas en un sujeto que necesita tal tratamiento. Preferiblemente, el agente activo se selecciona de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y los dominios proteolíticos. Lo más preferiblemente, el agente activo es plasminógeno. El agente activo puede administrarse por cualquier vía de administración conocida en la técnica. Las vías de administración preferidas, no limitativas incluyen aplicación tópica, inyección intragingival e inyección intravenosa. El agente también puede estar presente en un apósito para heridas, un gel, una loción, un bálsamo, una pasta, una disolución de enjuague bucal y pasta de dientes aplicados sobre la zona herida de tejido periodontal, si es posible, desde el que se transfiere al sitio herido de tejido

periodontal.

Además, la presente invención proporciona un método de promoción de la salud oral, que comprende administrar una composición que comprende un agente activo que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno, o una combinación de dos o más de tales agentes. Preferiblemente, el agente activo se selecciona de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y los dominios proteolíticos. Lo más preferiblemente, el agente activo es plasminógeno, tal como Glu-plasminógeno o Lys-plasminógeno. El agente activo puede administrarse por cualquier vía de administración conocida en la técnica. La composición puede ser parte de un gel, una loción, un bálsamo, una pasta o un apósito. Las vías de administración preferidas, no limitativas incluyen aplicación tópica tal como pasta de dientes o el uso de una disolución para gargarismos (disolución de enjuague bucal) que puede usarse para fortalecer los dientes frente a las caries y promover la salud oral.

La invención también proporciona un método de iniciación de la defensa del huésped para tratar enfermedad periodontal, especialmente enfermedad periodontal infecciosa, en condiciones en las que la defensa del huésped está retrasada o alterada, que comprende administrar un principio activo que es plasmina o plasminógeno. En una realización particular, el método de la invención puede usarse para mejorar la defensa del huésped frente a la enfermedad periodontal en condiciones de deficiencia/alteración local o sistémica de plasmina o plasminógeno.

En otra realización, la invención proporciona un método para la profilaxis, la prevención y el tratamiento de enfermedad periodontal, especialmente enfermedad periodontal infecciosa, mejorar la cicatrización de heridas periodontales tales como heridas quirúrgicas y promover la salud oral en sujetos humanos o no humanos administrando un compuesto o fármaco que es plasminógeno y sus derivados. Preferiblemente, el compuesto se administra por vía local para lograr una alta concentración en la zona infectada.

Además, la invención proporciona un método para reducir o prevenir la formación de necrosis oral administrando una composición que comprende la administración local o sistémica de una composición que comprende un compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno. La composición puede ser parte de un gel, una loción, un bálsamo, una pasta o un apósito para heridas. Alternativamente, la composición puede administrarse por vía sistémica. En una realización, el método de la invención se aplica conjuntamente con cirugía plástica en el tejido periodontal para reducir la aparición y la formación de infección, úlcera y necrosis.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento, la profilaxis y la prevención de enfermedad periodontal, especialmente enfermedad periodontal infecciosa, que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o compuestos con la capacidad para activar plasminógeno. El componente de la ruta de activación de plasminógeno puede seleccionarse de variantes genéticas que se producen de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, dominios kringle de plasminógeno, mini-plasminógeno. Preferiblemente, el componente de la ruta de activación de plasminógeno es plasminógeno.

En una realización adicional, la invención proporciona un método para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de enfermedad periodontal, especialmente enfermedad periodontal infecciosa, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto según las reivindicaciones 1-16, compuesto que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o que tiene la capacidad para activar plasminógeno directamente o por medio de la ruta de activación de plasminógeno a un sujeto que necesita tal tratamiento. El componente de la ruta de activación de plasminógeno puede seleccionarse de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, dominios kringle de plasminógeno, mini-plasminógeno. Preferiblemente, el componente de la ruta de activación de plasminógeno es plasminógeno.

Aún en otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para promover la cicatrización de heridas periodontales, especialmente heridas periodontales infecciosas, que comprende una cantidad eficaz de un componente de la ruta de activación de plasminógeno o un compuesto con la capacidad para activar plasminógeno. El componente de la ruta de activación de plasminógeno puede seleccionarse de variantes genéticas que se producen de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, dominios kringle de plasminógeno, mini-plasminógeno. Preferiblemente, el componente de la ruta de activación del plasminógeno es plasminógeno o plasmina.

En una realización adicional, la invención proporciona un método para promover la cicatrización de heridas periodontales, especialmente heridas periodontales infecciosas, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de compuesto, que es un componente de la ruta de activación de plasminógeno o que tiene la capacidad para activar plasminógeno directamente o por medio de la ruta de activación de plasminógeno a un sujeto que necesita tal tratamiento. El componente de la ruta de activación de plasminógeno puede seleccionarse de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, plasmina, dominios kringle de plasminógeno y plasmina, mini-plasminógeno, mini-plasmina. Preferiblemente, el componente de la ruta de activación del plasminógeno es plasminógeno o plasmina.

**Descripción detallada de la invención**Mejora de la prevención y el tratamiento de enfermedad periodontal, la cicatrización de heridas periodontales y el mantenimiento de la salud oral

5 Según la invención, puede usarse la proporción o potenciación de los niveles de plasminógeno y/o plasminas para la profilaxis, la prevención y el tratamiento de enfermedad periodontal, acelerando la cicatrización de heridas periodontales y promoviendo la salud oral. Esto puede lograrse de muchos modos diferentes. Por ejemplo, tratando a un paciente con agentes activos, fármacos, hormonas, citocinas, anticuerpos u otros compuestos que regulan por incremento la expresión de plasmina, plasminógeno o activadores del plasminógeno; reducen la degradación de cualquiera de estos componentes; pueden aumentarse los niveles locales o sistémicos de plasminógeno y/o plasmina. En otra realización, el nivel de plasminógeno o plasmina local se aumenta aplicando directamente proteínas plasmina/plasminógeno y sus derivados. Aún en otra realización, se potencia la actividad de plasmina mediante la administración de un activador de plasmina o plasminógeno. Adicionalmente en otra realización, se usa un activador del plasminógeno artificial, recombinante o bacteriano tal como estreptocinasa y estafilocinasa. Adicionalmente en otra realización, se usa un fragmento de secuencia de proteína plasminógeno tal como péptidos sintéticos, dominios kringle, miniplasminógeno o miniplasmina.

10 Pueden producirse componentes de la ruta de activación de plasminógeno o compuestos con la capacidad para activar plasminógeno purificando el/los componente(s) o compuestos a partir de bacterias, seres humanos u otros animales, o mediante producción recombinante en levadura tal como *S. cerevisiae*, en bacterias tales como una *E. coli* y en líneas celulares de mamífero tales como línea celular de ovario de hámster chino. El componente puede ser de tipo natural o estar modificado/mutado. También pueden usarse fragmentos del componente que conservan al menos una parte de la actividad deseada del componente de longitud completa. En una realización preferida, se usa una preparación sustancialmente pura de plasminógeno humano. En otra realización preferida, se usa una preparación sustancialmente pura de plasmina humana. Adicionalmente en otra realización preferida, se usa una preparación sustancialmente pura de miniplasminógeno, miniplasmina o un fragmento de secuencia de proteína plasminógeno.

Aplicaciones

El método de la invención se usa para la profilaxis, la prevención y el tratamiento de enfermedad periodontal, cicatrización de heridas periodontales y promoción de la salud oral para la vida diaria. Tales animales incluyen, pero no se limitan a, vertebrados tales como seres humanos y animales domésticos, incluyendo perros, gatos, caballos, vacas, cerdos y aves domesticadas. En una realización, los métodos de la invención se aplican para la gestión de enfermedad periodontal en un sujeto humano. El sujeto humano o no humano puede padecer o no un estado que altera la curación de enfermedad periodontal. En otra realización, los métodos de la invención se aplican para mejorar la cicatrización de heridas periodontales. Las heridas periodontales incluyen, pero no se limitan a, heridas traumáticas debidas a lesiones y heridas quirúrgicas. En una realización particular, el sujeto es un sujeto humano que planea someterse a, está sometiéndose a o se ha sometido a cirugía plástica en la zona periodontal de la boca. En tal caso, puede aplicarse una composición que comprende, por ejemplo, plasminógeno, o puede administrarse tanto antes de como/o después de la cirugía. Adicionalmente en otra realización, los métodos de la invención se aplican para promover la salud oral. En tal caso, puede aplicarse o administrarse una composición que comprende un método para aumentar el nivel/la actividad de plasminógeno, plasmina o miniplasmina para promover la salud oral.

Composiciones y tratamientos

Los agentes activos de la invención se usan para modular la actividad biológica de una diana farmacológica, y se usan en el tratamiento de estados en los que se observan degradación de ECM, defensa del huésped y/o alteración de la cicatrización de heridas. En particular, pueden usarse para prevenir y tratar enfermedad periodontal, cicatrización de heridas periodontales y promoción de la salud oral.

Por consiguiente, los agentes activos de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas para su administración a sujetos en una forma biológicamente compatible para su administración *in vivo*. Por forma biológicamente compatible para su administración *in vivo* quiere decirse una forma del agente activo que va a administrarse en la que cualquier efecto tóxico se compensa por los efectos terapéuticos. El agente activo puede administrarse a organismos vivos incluyendo seres humanos y animales. Una cantidad activa del agente activo 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 un agente activo puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. El intervalo de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diariamente varias dosis divididas o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

La/las composición/composiciones puede(n) administrarse de una manera conveniente tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, administración rectal o aplicación transdérmica.

Dependiendo de la vía de administración, el/los principio(s) activo(s) puede(n) recubrirse de un material para proteger el agente de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el agente. Por tanto, las vías de administración adecuadas incluyen administración tópica, intravenosa, intramuscular, intradérmica, oral, rectal e intravaginal. Una vía de administración preferida es administración tópica o administración oral.

5 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 se combina una cantidad eficaz de uno o más principio(s) activo(s) 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 los agentes activos 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.

15 Los ejemplos de vehículos que pueden usarse en la administración de los agentes activos según la invención incluyen, pero no se limitan a, gel, pastas, bálsamos, ceras, lociones, cremas cutáneas, disoluciones de enjuagado, polvos secos con/sin agente de carga y diversos otros formatos para administración tópica conocidos en la técnica. Las composiciones también pueden administrarse por vía local en forma de un polvo o disolución pulverizada, o disoluciones para gargarismos. Alternativamente, las composiciones de la invención pueden presentarse en apósitos para heridas, almohadillas, tiritas, gasa u otros medios aplicados a la zona de interés, desde los que se transfieren a la zona necesitada. Tales dispositivos también incluyen dispositivos de liberación lenta, que liberan de manera continua plasminógeno u otros agentes de la invención durante un periodo de tiempo prolongado, o pueden incluir dispositivos de liberación instantánea, que liberan plasminógeno u otros agentes de la invención inmediatamente en el momento de su uso.

25 Tras haberse preparado las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un recipiente 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.

Las composiciones pueden administrarse a intervalos regulares, por ejemplo, una vez o dos veces al día, o añadirse en apósitos o dispositivos de liberación lenta que se cambian según sea apropiado. Con respecto a promover la salud oral, la composición puede administrarse instantáneamente, formando la composición en el momento de su uso.

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

Figura 1. Fotografías de tejido de encías sanas normales (A), gingivitis inflamatoria (B) y periodontitis por infección periodontal (C).

35 Figura 2. La presencia de plasminógeno en medio de crecimiento promueve la migración de queratinocitos en un modelo de cicatrización de heridas *in vitro*.

Figura 3. Morfología de mandíbulas de ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural de 8 - 12 semanas de edad no tratados. Obsérvese que el tejido necrótico (N, en rojo) y la degradación grave de los tabiques óseos (B) se producen en el tejido de las encías de ratones deficientes en plasminógeno, mientras que el tejido de las encías en ratones de tipo natural es completamente normal. Con más aumentos (x200), las diferencias entre ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural son incluso más evidentes (paneles inferiores). B, tabiques óseos. N, tejido necrótico.

45 Figura 4. Morfología de mandíbulas de ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural de 12 - 16 semanas de edad no tratados. La enfermedad periodontal espontánea en ratones deficientes en plasminógeno a las 12-16 semanas de edad es más grave que la de 8-12 semanas. Obsérvese que el tejido necrótico (N, en rojo) y la degradación grave de los tabiques óseos (B) se producen en el tejido de las encías de ratones deficientes en plasminógeno, mientras que el tejido de las encías en ratones de tipo natural es completamente normal. Con más aumentos (x200), las diferencias entre ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural son incluso más evidentes (paneles inferiores). B - tabiques óseos, N - tejido necrótico.

50 Figura 5. Morfología de mandíbulas de ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural de 16 - 20 semanas de edad no tratados. La enfermedad periodontal espontánea en ratones deficientes en plasminógeno a las 16-20 semanas de edad es más grave que la de 12-16 semanas. Obsérvese que el tejido necrótico (N, en rojo) y la degradación grave de los tabiques óseos (B) se producen en el tejido de las encías de ratones deficientes en plasminógeno (panel superior derecho), mientras que el tejido de las encías en ratones de tipo natural es completamente normal (panel superior izquierdo). Con más aumentos (x200), las diferencias entre ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural son incluso más evidentes (paneles inferiores). B - tabiques óseos, N - tejido necrótico.

Figura 6. Recuperación bacteriana de saliva de ratones de tipo natural, heterocigotos para plasminógeno y

deficientes en plasminógeno. Los ratones deficientes en plasminógeno y heterocigotos para plasminógeno tienen números significativamente superiores de bacterias en la saliva en comparación con la de ratones de tipo natural.

5 Figura 7. Recuperación bacteriana de los dientes arrancados de ratones deficientes en plasminógeno complementados con plasminógeno humano, ratones deficientes en plasminógeno complementados con PBS y ratones de tipo natural sin ningún tratamiento.

10 Figura 8. Morfología de ratones deficientes en plasminógeno complementados con PBS o plasminógeno humano. Obsérvese que en los ratones deficientes en plasminógeno tratados con PBS estaba presente tejido necrótico en el tejido de las encías, el tejido de colágeno circundante comenzó a desprenderse de los dientes y había tenido lugar resorción ósea (paneles izquierdos). Sin embargo, la complementación de plasminógeno humano en ratones deficientes en plasminógeno había recuperado completamente la estructura celular y tisular en el tejido periodontal. Aumentos, x 50.

Figura 9. Morfología de ratones deficientes en plasminógeno complementados con PBS o plasminógeno humano con más aumentos (x 50).

15 Figura 10. Morfología de ratones deficientes en plasminógeno complementados con PBS o plasminógeno humano mediante inyecciones orales. Obsérvese que en los ratones deficientes en plasminógeno tratados con PBS estaba presente tejido necrótico en el tejido de las encías, el tejido de colágeno circundante comenzó a desprenderse de los dientes y había tenido lugar resorción ósea (los dos paneles superiores izquierdos). Sin embargo, la complementación de plasminógeno humano en ratones deficientes en plasminógeno había recuperado la estructura celular y tisular en el tejido periodontal. Aumentos, 100 x.

20 Figura 11. Morfología de mandíbulas de ratones deficientes dobles en tPA/uPA (paneles derechos) y de tipo natural (paneles izquierdos) de 22 semanas de edad no tratados. Obsérvese que el tejido necrótico (N, en rojo) y la degradación grave de los tabiques óseos (B) se producen en el tejido de las encías de ratones deficientes dobles en tPA/uPA, mientras que el tejido de las encías en ratones de tipo natural es completamente normal. B, tabiques óseos. N, tejido necrótico.

25 Figura 12. Números de bacterias en articulaciones de rodilla de ratones plg<sup>-/-</sup> y plg<sup>+/+</sup> con tratamientos local y sistémico diferentes tras la inoculación de  $1 \times 10^6$  UFC de *S. aureus* Phillips en las articulaciones de rodilla.

30 Figura 13. Números de bacterias en articulaciones de rodilla de ratones plg<sup>+/+</sup> tras la inyección local con Plg (recuadro negro) o PBS (recuadro blanco) 3 días tras la inoculación de *S. aureus* en las articulaciones de rodilla. Obsérvese que en ratones de tipo natural en los que se inyectó por vía local Plg el número de bacterias está significativamente reducido en 5 veces con respecto a los de tipo natural en los que se inyectó PBS.

### Definiciones

35 Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Se comentan a continuación determinados términos, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones y los métodos de la invención y cómo preparar y usar las mismas.

40 “Un compuesto del grupo que comprende: plasminógeno, plasmina, un componente de la ruta de activación de plasminógeno, un análogo de plasminógeno, tal como mini-plasmina, un análogo de plasmina, un análogo de un componente de la ruta de activación de plasminógeno, un activador de plasminógeno” se refiere a un compuesto que proporciona directa o indirectamente el efecto de plasminógeno o plasmina, respectivamente.

45 “Un componente de la ruta de activación de plasminógeno” se refiere a plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, variantes y análogos de plasminógeno que comprenden uno o más dominios de plasminógeno tal como uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico mostrados a modo de ejemplo por mini-plasminógeno; plasmina y variantes y análogos de plasmina que comprenden al menos uno o más dominios de plasmina tal como uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico, mostrados a modo de ejemplo por mini-plasmina y delta-plasmina; un activador de plasminógeno que tiene el efecto final de activar plasminógeno, por ejemplo mediante una cascada de acontecimientos que dan como resultado la formación o activación de plasminógeno mostrado a modo de ejemplo por uPA y tPA y variantes y análogos de tPA y uPA que comprenden uno o más dominios de tPA o uPA tal como uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico. Las  
50 variantes de plasminógeno, plasmina, tPA y uPA incluyen todas las variantes genéticas que se producen de manera natural de ser humano así como otras formas de mamífero de estas proteínas, así como variantes mutantes de estas proteínas obtenidas mediante reemplazos de aminoácidos conservativos. Un “análogo” de plasminógeno o plasmina es un compuesto que proporciona esencialmente un efecto análogo al plasminógeno o plasmina, respectivamente, tal como se mide mediante enzimografía, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) y FACS (clasificador celular activado por fluorescencia). Existe también un ensayo para medir los niveles de actividad de plasmina convertida tal como se describió previamente: Ny, A., Leonardsson, G., Hagglund, A.C., Hagglof, P., Ploplis, V.A., Carmeliet, P., y Ny, T. (1999). Ovulation in plasminogen-deficient mice. *Endocrinology* 140, 5030-  
55

5035.). Un “análogo” de un componente de la ruta de activación de plasminógeno es un compuesto que proporciona esencialmente un efecto análogo a un componente de la ruta de activación de plasminógeno tal como se mide mediante los niveles de actividad de plasmina que activa este análogo.

5 “Enfermedad periodontal” es un trastorno inflamatorio común provocado por la interacción entre los microorganismos subgingivales específicos y la respuesta inmunitaria e inflamatoria del huésped. Las enfermedades periodontales oscilan entre una simple inflamación de las encías y enfermedad grave que da como resultado daño importante al tejido blando y el hueso que soporta los dientes. En los peores casos, se pierden los dientes. Las bacterias provocan inflamación de las encías que se denomina “gingivitis.” En la gingivitis, las encías se enrojecen, se hinchan y pueden sangrar fácilmente. La gingivitis es una forma leve de enfermedad de las encías que puede revertirse habitualmente con cepillado y uso de hilo dental diarios, y limpieza regular por un dentista o higienista dental. Esta forma de enfermedad de las encías no incluye ninguna pérdida de hueso y tejido que mantienen los dientes en su lugar. Cuando no se trata la gingivitis, puede avanzar a “periodontitis” (lo que significa “inflamación alrededor del diente”). En la periodontitis, las encías se sueltan de los dientes y forman “espacios” que se infectan. El sistema inmunitario del organismo combate a las bacterias a medida que la placa se propaga y crece por debajo de la línea de las encías. Las toxinas bacterianas y las enzimas del organismo que combaten la infección comienzan realmente a descomponer el hueso y el tejido conjuntivo que mantienen los dientes en su lugar. Si no se trata, los huesos, las encías y el tejido conjuntivo que soportan los dientes se destruyen. Los dientes pueden finalmente aflojarse y tienen que extraerse. Otro tipo de enfermedad periodontal, la periimplantitis, se produce como una complicación biológica tras la implantación quirúrgica de un material aloplástico en el hueso de la mandíbula. La periimplantitis es un proceso inflamatorio/infeccioso que afecta a los tejidos alrededor de un implante osteointegrado en funcionamiento, dando como resultado la pérdida del hueso de soporte. La periimplantitis puede conducir a desintegración completa y pérdida del implante incluso si se ha realizado tratamiento extensivo dirigido a resolver la infección periimplantaria. La periimplantitis también sucede como cambios inflamatorios/infecciosos reversibles de los tejidos blandos periimplantarios sin pérdida de hueso, denominada algunas veces mucositis periimplantaria. En la presente patente, la definición de enfermedad periodontal incluye al menos periodontitis, gingivitis, periimplantitis y mucositis periimplantaria.

“Enfermedad periodontal infecciosa” es enfermedad periodontal provocada por infección, en contraposición a por ejemplo periodontitis leñosa. Por ejemplo, la periodontitis infecciosa puede estar provocada por infección bacteriana, viral o fúngica.

30 “La enfermedad periodontal bacteriana” está provocada por infección bacteriana.

“Herida periodontal” se refiere a las heridas traumáticas y heridas quirúrgicas que se producen en el tejido periodontal de la boca, incluyendo heridas en los tejidos que rodean a implantes en la zona periodontal.

35 “Salud oral” se refiere al nivel de salud de los tejidos orales y relacionados que permite a un individuo comer, hablar y socializarse sin enfermedad activa, molestia o vergüenza y que contribuye al bienestar general. Las indicaciones principales de la salud oral incluyen la flora bacteriana en la saliva y el tejido de las encías, así como necrosis tisular e inflamación en el tejido de las encías. La salud oral es integral para la salud general y no debe considerarse aislada.

40 “Derivados de plasmina/plasminógeno” se refiere a por ejemplo dominios kringle de plasmina o plasminógeno, fragmentos de proteína de plasmina o plasminógeno, mini-plasminógeno y mini-plasmina así como los derivados sintéticos de plasmina o plasminógeno.

“Mini-plasminógeno” se refiere al fragmento C-terminal de plasminógeno nativo, que incluye el sitio activo de la enzima. El Mr de miniplasminógeno es 38000. La activación con urocinasa o estreptocinasa produce una enzima bicatenaria con especificidad de sustrato extremadamente similar a la de plasminógeno, que se denomina “mini-plasmina”.

45 “Necrosis” se refiere a la muerte de tejido en el cuerpo. Esto sucede cuando no se suministra suficiente sangre al tejido, ya sea por una lesión, radiación o productos químicos. La necrosis no es reversible. Hay muchas causas de necrosis incluyendo lesión, infección, cáncer, infarto, envenenamiento, heridas crónicas, úlceras e inflamación.

“Tópica” y “aplicación tópica” se refieren a la 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.

50 La “actividad” de una proteína o compuesto se refiere al efecto que la proteína o compuesto tiene sobre una reacción específica, y es una medida de su capacidad para afectar, modular, participar en o promover la reacción. Generalmente, la actividad de una proteína u otro compuesto puede medirse. Por ejemplo, en el caso de enzimas tales como plasmina, PA y MMP y moduladores, la actividad enzimática puede expresarse como la velocidad a la que se produce el producto de la reacción, representada, por ejemplo, como la cantidad de producto producido por unidad de tiempo y de enzima (por ejemplo, concentración o peso). En el caso de moduladores tales como PA, la actividad puede referirse a la capacidad del modulador para inhibir o promover, aumentar o disminuir, regular por incremento o disminución, la velocidad de una reacción o la cantidad de producto formado a partir de la reacción.

Una “herida” es una rotura en la estructura de un órgano o tejido, incluyendo el epitelio, tejido conjuntivo y tejido muscular, provocada por un agente externo. Los ejemplos de heridas incluyen, pero no se limitan a, magulladuras, rasguños, desgarros, cortes, pinchazos y quemaduras. Otros tipos particulares de heridas son las que son una consecuencia de procedimientos de cirugía plástica.

- 5 “Tratamiento” de un sujeto, o “tratar” a un sujeto de 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 lenta o alterada.

“Potenciar” la cicatrización de heridas significa aumentar la velocidad mediante la cual la herida se cicatriza. Alternativamente, “potenciar” la cicatrización de heridas significa reducir las formaciones de tejido cicatricial durante o tras la cicatrización.

- 10 Un “sujeto” en el presente documento incluye animales tanto humanos como no humanos. Los animales no humanos incluyen, sin limitación, 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.

- 15 Un “control”, “valor de control” o “valor de referencia” en un ensayo es un valor usado para detectar una alteración en, por ejemplo, el tratamiento de enfermedad periodontal, la cicatrización de heridas periodontales y la promoción de la salud oral, o cualquier otro ensayo descrito en el presente documento.

Un sujeto “en riesgo de”, “predisuesto a” o “susceptible a” una enfermedad o estado significa que el riesgo de que el individuo contraiga o desarrolle la enfermedad o estado es superior que en la población promedio.

- 20 Una “deficiencia” de un compuesto significa que la cantidad, el nivel o la concentración del compuesto es significativamente inferior que un valor control. Por ejemplo, en un animal deficiente en plasminógeno, los niveles tisulares y en fluidos corporales de plasminógeno son significativamente inferiores que en un animal de tipo natural.

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

- 30 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 que se determina una significación a un intervalo de confianza de al menos el 90%, más preferiblemente a un intervalo de confianza del 95%.

#### Abreviaturas

Las abreviaturas usadas en la presente descripción incluyen las siguientes:

- uPA = activador de plasminógeno de tipo urocinasa;  
 PA = activador de plasminógeno;  
 35 MMP = metaloproteinasa de la matriz;  
 TIMP = inhibidor tisular de metaloproteinasa;  
 tPA = activador de plasminógeno de tipo tisular;  
 Plg = plasminógeno  
 ECM = matriz extracelular

#### 40 EJEMPLOS

La invención se describe además 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 leer esta memoria descriptiva, y pueden hacerse sin apartarse de su espíritu y alcance.

#### 45 Ejemplo 1

##### La migración *in vitro* de queratinocitos es dependiente de las cantidades relativas de plasminógeno

Puesto que la cicatrización de heridas implica un enorme número de diferentes factores, células y procesos, se incluye un modelo *in vitro* simplificado para delinear el posible efecto del plasminógeno sobre la migración celular.

Métodos:

5 Se incubaron células DOK (queratinocitos orales humanos neoplásicos/displásicos tempranos) en medios de cultivo celular. Tras someterlas a ayuno, se incubaron las células DOK en medio de cultivo celular DMEM, que contenía hidrocortisona, glutamina, penicilina/estreptomina, suero bovino fetal agotado en plasminógeno al 10%, y en ausencia o presencia de plasminógeno humano. A las 0 h, se realizó un rasgón patrón en la capa de queratinocitos con el fin de inducir un modelo de cicatrización de heridas *in vitro*. A diferentes puntos de tiempo (0 h, 12 h y 24 h), se documentó la migración de queratinocitos bajo microscopio ZEISS.

Resultados:

10 La migración de células DOK (queratinocitos orales humanos neoplásicos/displásicos tempranos) parece casi detenerse en ausencia de plasminógeno en los medios de cultivo durante el periodo experimental (figura 2A, paneles superiores). Sin embargo, en presencia de plasminógeno en los medios de cultivo, la migración de queratinocitos parece potenciarse en comparación con la de los medios agotados en plasminógeno (figura 2A, paneles inferiores). Tras 24 horas de exposición a plasminógeno (4  $\mu$ M), los bordes de tales heridas *in vitro* están cercanos a fusionarse (figura 2B). Además, la velocidad de migración celular parece ser dependiente de la  
15 concentración de plasminógeno. Este experimento indica claramente que el plasminógeno es importante para lograr un cierre de heridas más rápido y una velocidad de cicatrización potenciada de tejido dañado *in vitro*.

Ejemplo 2

Desarrollo espontáneo de enfermedad periodontal en ratones deficientes en plasminógeno

Métodos:

20 Este experimento está dedicado a investigar la importancia del plasminógeno en el desarrollo de enfermedad periodontal analizando ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural a diferente edad.

Se dividieron ratones deficientes en plasminógeno (deficientes en plg) y de tipo natural (wt) en tres grupos de edad (5 - 8 ratones por genotipo por grupo): Grupo I: 8 - 12 semanas de edad; grupo II: 12 - 16 semanas de edad; grupo III: 16 - 20 semanas de edad. Se siguió el desarrollo de enfermedad periodontal analizando las muestras de tejido de  
25 cada genotipo y grupo de edad.

Para analizar las muestras de tejido, se separaron las mandíbulas inferior y superior del cráneo, se retiró la carne de tejido blando macroscópico tal como la lengua y se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 horas. Después de eso, se transfirieron las muestras a la disolución de descalcificación para eliminar el calcio del tejido óseo. Tras cuatro semanas de proceso de descalcificación, se incrustaron las muestras en parafina y se cortaron a 5  $\mu$ m de  
30 grosor para la tinción morfológica. Se usó tinción con safranina O para el análisis morfológico, por tanto el cartílago y la mucina se tiñen de color rojo oscuro, las estructuras óseas y los dientes son de color azul y los núcleos celulares se tiñen de color azul oscuro.

Resultados

35 El análisis morfológico del tejido de las encías que rodea a los dientes a las 8 - 12 semanas de edad muestra que los ratones de tipo natural no tienen inflamación o desprendimiento de tejido de colágeno de la superficie de los dientes. En cambio, todos los ratones deficientes en plg muestran distintos signos de inflamación-estadios de gingivitis inicial, desprendimiento de tejido de colágeno de los dientes, formación de tejido necrótico entre los dientes y degradación de tabiques óseos y hueso mandibular subyacente (figura 3). Mientras que los ratones de tipo natural tienen una cavidad oral sana hasta las 20 semanas de edad (figura 3, 4, 5), en los ratones deficientes en plasminógeno, la  
40 gingivitis progresa con la edad a periodontitis: el tejido de las encías está gravemente inflamado, se forma tejido necrótico de manera profunda en el tejido blando y es evidente la destrucción de los tabiques óseos (figura 4, 5). Estos datos demuestran claramente que los ratones deficientes en plasminógeno desarrollan espontáneamente enfermedad periodontal grave y la gravedad de la enfermedad progresa con la edad.

Ejemplo 3

45 Los ratones deficientes en plasminógeno tienen cantidades significativamente superiores de bacterias en la saliva que la de ratones de tipo natural

Métodos:

50 Se usaron ratones de tipo natural, heterocigotos para plasminógeno y deficientes en plasminógeno a edades entre 16-20 semanas de edad en este estudio (tabla I). Se realizó la toma de muestras de saliva de ratones recogiendo la saliva de la boca con una punta de pipeta estéril y se transfirieron a medio anaerobio para su cultivo inmediato.

Resultados:

Se recogieron satisfactoriamente 5  $\mu$ l de muestras de saliva de ratones de tipo natural y heterocigotos para

plasminógeno. Sin embargo, debido a las condiciones secas generales de las bocas en ratones deficientes en plasminógeno, la cantidad posible de muestras de saliva dio como resultado variaciones, oscilando entre 1,0  $\mu$ l y 5,0  $\mu$ l. La recuperación bacteriana mostró que ratones deficientes en plasminógeno tienen casi  $9,0 \times 10^6$ /ml de bacterias en saliva, la mayor en los tres grupos y significativamente superior a la de ratones de tipo natural. De manera importante, los ratones heterocigotos para plasminógeno tienen también cantidades significativamente superiores de bacterias los ratones de tipo natural (figura 6). Estos datos indican claramente que el plasminógeno desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la resistencia frente a bacterias orales. Además, el número de bacterias parece depender de manera crítica de las cantidades relativas de plasminógeno, lo que sugiere una importancia terapéutica del plasminógeno como fármaco novedoso para promover la salud oral.

#### 10 Ejemplo 4

La complementación de plasminógeno humano en ratones deficientes en plasminógeno mejora satisfactoriamente los estados clínicos de enfermedad periodontal espontánea en estos ratones

Métodos:

15 Se dividieron aleatoriamente diez ratones deficientes en plasminógeno (8-12 semanas de edad) en grupos de tratamiento de plasminógeno y PBS (5 ratones por grupo). Desde el día 0 hasta el día 9, se les inyectó a los ratones diariamente por vía intravenosa 100  $\mu$ l de plasminógeno humano (10 mg/ml) o PBS. En el día 10, se sacrificaron los ratones. Para las mandíbulas del lado izquierdo, se arrancaron los dientes molares para determinar la recuperación de bacterias. Se procesaron las mandíbulas del lado derecho para la descalcificación, incrustación en parafina y tinción morfológica. Se incluyeron tres ratones de tipo natural no tratados de la misma edad como controles en el experimento.

Resultados:

25 La recuperación de bacterias de las muestras de dientes arrancados mostró que los ratones deficientes en plasminógeno complementados con plasminógeno humano tienen números significativamente disminuidos de bacterias en comparación con la complementación con PBS (figura 7). Estos datos indican que el plasminógeno es esencial en la defensa del huésped frente a la colonización bacteriana en los dientes.

30 Tal como se esperaba, se produjo enfermedad periodontal grave en los 5 ratones deficientes en plasminógeno tratados con PBS: estaba presente tejido necrótico en el tejido de las encías, el tejido de colágeno circundante comenzó a desprenderse de los dientes y había tenido lugar resorción ósea (figura 8 y figura 9, paneles izquierdos). Ratones deficientes en plasminógeno complementados con plasminógeno humano habían recuperado completamente la estructura celular y tisular: no se observó inflamación en el tejido de las encías, se había eliminado el tejido necrótico y había tenido lugar remodelación del tejido de colágeno (figura 8 y figura 9, paneles de la derecha). Para los 3 ratones de tipo natural no tratados, el análisis morfológico mostró una estructura tisular normal como en la figura 3. Estos datos muestran claramente que el plasminógeno desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de una estructura tisular normal y funciona frente a la enfermedad periodontal.

#### 35 Ejemplo 5

La complementación local de plasminógeno humano en el tejido de las encías en ratones deficientes en plasminógeno mejora satisfactoriamente los estados clínicos de enfermedad periodontal espontánea en estos ratones

Métodos:

40 Se dividieron aleatoriamente diez ratones deficientes en plasminógeno (16-20 semanas de edad) en grupos de tratamiento de plasminógeno y PBS (5 ratones por grupo). Desde el día 0 hasta día 9, se inyectaron por vía local 10  $\mu$ l de plasminógeno humano (10 mg/ml) diariamente en el tejido de las encías de ambos lados de las mandíbulas inferiores de ratones deficientes en plasminógeno. Para el grupo tratado con PBS control, se inyectaron por vía local 10  $\mu$ l de PBS diariamente en el tejido de las encías de ambos lados de las mandíbulas inferiores de ratones deficientes en plasminógeno. En el día 10 se sacrificaron los ratones y se realizaron estudios morfológicos. Se usaron tres ratones de tipo natural no tratados y tres ratones deficientes en plasminógeno no tratados como controles sin tratamiento.

50 Para analizar las muestras de tejido, se separaron las mandíbulas inferior y superior del cráneo, se retiró la carne de tejido blando macroscópico tal como la lengua y se fijó en PFA al 4% durante 24 horas. Después de eso, se transfirieron las muestras a la disolución de descalcificación para eliminar el calcio del tejido óseo. Tras cuatro semanas de proceso de descalcificación, se incrustaron las muestras en parafina y se cortaron a 5  $\mu$ m de grosor para la tinción morfológica. Se usó tinción con safranina O para el análisis morfológico, por tanto el cartílago y la mucina se tiñen de color rojo oscuro, las estructuras óseas y los dientes son de color azul y los núcleos celulares se tiñen de color azul oscuro.

55 Resultados:

La inyección local de plasminógeno en el tejido de las encías disminuyó satisfactoriamente la gravedad de la enfermedad periodontal en ratones deficientes en plasminógeno. Tal como se esperaba, se produjo enfermedad periodontal grave en los 5 ratones deficientes en plasminógeno tratados con PBS: estaba presente tejido necrótico en el tejido de las encías (N), el tejido de colágeno circundante comenzó a desprenderse de los dientes y había tenido lugar resorción ósea (figura 10, los dos paneles superiores a la izquierda). Ratones deficientes en plasminógeno complementados localmente con plasminógeno humano habían recuperado la estructura tisular y celular normal en una gran magnitud: se observaban bajos niveles de inflamación en el tejido de las encías, se había eliminado el tejido necrótico y había tenido lugar remodelación del tejido de colágeno (figura 10, los dos paneles superiores a la derecha). Para los tres ratones deficientes en plasminógeno y de tipo natural no tratados, el análisis morfológico mostró una estructura tisular similar como en la figura 3, respectivamente. Estos datos muestran claramente que la complementación local de plasminógeno proporciona un modo potente y eficaz para tratar la enfermedad periodontal.

#### Ejemplo 6

#### Desarrollo espontáneo de enfermedad periodontal en ratones deficientes dobles en tPA y uPA

##### 15 Métodos:

Este experimento está dedicado a investigar la importancia de la plasmina en el desarrollo de enfermedad periodontal analizando el tejido periodontal en ratones de tipo natural y deficientes dobles en tPA/uPA. Se crearon ratones deficientes dobles en tPA y uPA en el laboratorio con el fin de crear ratones que carecían de activación de plasminógeno. Estos ratones, aunque contenían plasminógeno en sus cuerpos, no pueden convertir el precursor de plasmina en plasmina activa. Por tanto, los datos de estos ratones pueden tratar directamente la importancia de la plasmina activa en la defensa del huésped frente a la enfermedad periodontal espontánea.

Se siguió la aparición de enfermedad periodontal en ratones deficientes dobles en tPA/uPA y sus compañeros de camada de tipo natural a la edad de 22 semanas de edad analizando muestras de tejido de cada genotipo.

25 Para analizar las muestras de tejido, se separaron las mandíbulas inferior y superior del cráneo, se retiró la carne de tejido blando macroscópico tal como la lengua y se fijó en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 horas. Después de eso, se transfirieron las muestras a la disolución de descalcificación para eliminar el calcio del tejido óseo. Tras cuatro semanas de proceso de descalcificación, se incrustaron las muestras en parafina y se cortaron a 5 µm de grosor para la tinción morfológica. Se usó tinción con safranina O para el análisis morfológico, por tanto el cartílago y la mucina se tiñen de color rojo oscuro, las estructuras óseas y los dientes son de color azul y los núcleos celulares se tiñen de color azul oscuro.

##### 30 Resultados:

El análisis morfológico de ratones de tipo natural y deficientes dobles en tPA y uPA de 22 semanas de edad muestra que mientras que los ratones de tipo natural no tienen inflamación o desprendimiento del tejido de colágeno de los dientes (figura 11, paneles de la izquierda), los cuatro ratones deficientes dobles en tPA y uPA muestran enfermedad periodontal grave: el tejido de las encías está gravemente inflamado, se forma tejido necrótico (N) de manera profunda en el tejido blando y había tenido lugar destrucción de los tabiques óseos evidente (B) (figura 11). Estos datos demuestran claramente que ratones deficientes dobles en tPA y uPA desarrollan espontáneamente enfermedad periodontal grave, lo que indica que la plasmina activa también es crítica en el mantenimiento de una salud periodontal normal.

40 En los siguientes ejemplos, se describirán los hallazgos en los estudios de artritis bacteriana y un estudio que va a realizarse. Se cree que se lograrán datos prometedores similares como en el estudio de artritis bacteriana. Aunque los datos de los que se dispone son del estudio de artritis bacteriana, se considera que estos resultados arrojan luz a los desenlaces prometedores cuando se realizan estudios similares en la zona periodontal. Y por tanto estos resultados sugieren que la inyección local de plasminógeno humano en la zona periodontal también puede restaurar la defensa normal del huésped frente a la enfermedad periodontal en ratones plg-/-. Esta conclusión se basa en la consideración de los siguientes motivos:

1. Los mecanismos de defensa del huésped son en gran medida similares en las zonas de articulación de la rodilla y en las zonas periodontales, porque en ambas situaciones se activan células inflamatorias y migran a la zona infecciosa, se destruyen bacterias por las células inflamatorias activadas y otras moléculas, se potencia la expresión de la red de citocinas, se elimina el tejido necrótico y se produjo remodelación tisular a lo largo de todo el proceso de defensa del huésped.

2. *S. aureus* es un patógeno clínico que desempeña papeles importantes en los procesos infecciosos durante tanto la periodontitis como la artritis bacteriana. Por tanto, los datos obtenidos de los estudios de artritis bacteriana inducida por *S. aureus* representan lo más probablemente un fenómeno general a pesar de la ubicación tisular específica de la infección.

3. El método de inyección local que se usó en el modelo de artritis bacteriana también se ha usado en el estudio de

periodontitis (véase el ejemplo 5) y ha mostrado resultados positivos en los que la inyección local de plasminógeno redujo la periodontitis espontánea en ratones *plg*<sup>-/-</sup>. Estas similitudes indican además que los resultados obtenidos a partir de la artritis bacteriana representan un mecanismo general que también subyace a la enfermedad periodontal.

5 Por tanto, los presentes inventores desearían usar los datos de estos estudios sobre artritis bacteriana (ejemplos 7 y 8) para apoyar sus reivindicaciones en la presente solicitud de patente. La importancia de los datos del estudio de artritis bacteriana es que: en primer lugar, los resultados del ejemplo 7 indican que la inyección local de plasminógeno restaura la capacidad de defensa del huésped (por ejemplo destrucción de bacterias) en un modelo de infección inducida en ratones *plg*<sup>-/-</sup>; además, los resultados del ejemplo 8 indican que la inyección local de plasminógeno en un modelo de infección inducida potencia además la capacidad de defensa normal del huésped (por ejemplo destrucción de bacterias) en ratones de tipo natural normales. Además, basándose en estos motivos, también se incluye en la presente solicitud de patente otro ejemplo que va a realizarse (ejemplo 9). En este ejemplo, se describe un modelo clínico de enfermedad periodontal inducida y se cree que la aplicación de plasminógeno puede restaurar la defensa del huésped en ratones *plg*<sup>-/-</sup> y potencia además la defensa normal del huésped en ratones de tipo natural u otras especies.

### 15 EJEMPLO 7 DE REFERENCIA

La complementación local de ratones *plg*<sup>-/-</sup> con plasminógeno humano (Plgh) restauró la defensa normal del huésped frente a la infección por *S. aureus*

#### Métodos

20 Se indujo artritis bacteriana mediante inoculación local de  $1 \times 10^6$  UFC de *S. aureus* Phillips en 10  $\mu$ l de PBS estéril en ambas articulaciones de rodilla de ratones. 15 minutos tras la inoculación bacteriana, se complementó un lado de las articulaciones de rodilla de 6 ratones *plg*<sup>-/-</sup> con 40  $\mu$ l de plasminógeno humano (10  $\mu$ g/ $\mu$ l en PBS, Biopool, Umeå, Suecia) mediante inyecciones locales alrededor del tejido de la articulación de la rodilla. Después de eso, se complementó plasminógeno humano a intervalos de 24 horas durante 7 días. Como controles para las inyecciones locales, se les inyectó a 6 ratones *plg*<sup>-/-</sup> por vía local alrededor del tejido de la articulación de la rodilla 40  $\mu$ l de PBS estéril solo a los 15 minutos tras la inoculación bacteriana, y después de eso a intervalos de 24 horas durante 7 días de período experimental. Como controles para los ratones de tipo natural, se les administró a 2 ratones *plg*<sup>+/+</sup> 40  $\mu$ l de PBS estéril solo a los 15 minutos tras la inoculación bacteriana, y después de eso cada 24 horas durante 7 días. Como controles para los ratones *plg*<sup>-/-</sup> con inyecciones sistémicas, se les administró a 2 ratones *plg*<sup>-/-</sup> 100  $\mu$ l de plasminógeno humano (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) por vía intravenosa 1 hora antes de la inoculación bacteriana y después de eso cada 24 horas durante 7 días.

Se sacrificaron los ratones en el día 7 tras la inoculación bacteriana y se tomaron las articulaciones de rodilla y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados en placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias *S. aureus* en cada homogeneizado.

#### 35 Resultados

7 días de inyección local de plasminógeno en ratones *plg*<sup>-/-</sup> a los que se les inoculó *S. aureus* disminuyeron exitosa y significativamente las cantidades de bacterias hasta 100 veces en comparación con el tratamiento local con PBS en estos ratones. Tanto ratones *plg*<sup>-/-</sup> con inyección sistémica de plasminógeno humano o ratones *plg*<sup>+/+</sup> con inyección local de PBS también han destruido exitosamente *S. aureus* en sus articulaciones de rodilla. Estos datos (tabla 1) demuestran claramente que la inyección local de plasminógeno humano puede restaurar la capacidad de destrucción de bacterias normal en los ratones *plg*<sup>-/-</sup>.

Tabla 1. Número de bacterias en ratones *plg*<sup>-/-</sup> y *plg*<sup>+/+</sup> con diferentes tratamientos locales y sistémicos en el día 3 tras la inoculación de  $1 \times 10^6$  UFC de *S. aureus* Phillips

Grupos	Número de muestras	Número medio de bacterias (media $\pm$ DE, $\times 10^6$ UFC)
<i>Plg</i> <sup>-/-</sup> con inyección local de Plgh	6	0,019 $\pm$ 0,044*
<i>Plg</i> <sup>-/-</sup> con inyección local de PBS	6	1,09 $\pm$ 0,55
<i>Plg</i> <sup>-/-</sup> con inyección sistémica de Plgh	2	0,00075 $\pm$ 0,0011*
<i>Plg</i> <sup>+/+</sup> con inyección local de PBS	2	0,00065 $\pm$ 0,00092*

\*, P<0,05, en comparación con el grupo de ratones plg<sup>-/-</sup> con inyección local de PBS.

EJEMPLO 8 DE REFERENCIA

La complementación local de ratones plg<sup>+/+</sup> con plasminógeno humano potencia la defensa del huésped frente a la infección por *S. aureus*

5 Métodos

Se indujo artritis bacteriana mediante inoculación local de 1 x 10<sup>6</sup> UFC de *S. aureus* Phillips en 10 µl de PBS estéril en articulaciones de rodilla de ratones. 15 minutos tras la inoculación bacteriana, se complementó un lado de las articulaciones de rodilla de 7 ratones plg<sup>+/+</sup> con 50 µl de plasminógeno humano (Plgh, 10 µg/µl en PBS, Biopool, Umeå, Suecia) mediante inyecciones locales bajo la piel de la rodilla y alrededor del tejido de la articulación de la rodilla. Después de eso, se complementó plasminógeno humano en el mismo patrón a intervalos de 24 horas desde el día 0 hasta día 2. Como controles para las inyecciones locales, se les inyectó a 7 ratones plg<sup>+/+</sup> por vía local bajo la piel de la rodilla y alrededor del tejido de la articulación de la rodilla 50 ul de PBS estéril solo a los 15 minutos tras la inoculación bacteriana, y después de eso se realizaron las mismas inyecciones locales a intervalos de 24 horas desde el día 0 hasta el día 2 del periodo experimental.

15 Se sacrificaron los ratones en el día 3 tras la inoculación bacteriana y se tomaron las articulaciones de rodilla y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril. Tras diluciones en serie, se distribuyeron las disoluciones de homogeneizados sobre placas de agar LB y se incubaron a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de bacterias *S. aureus* en cada homogeneizado.

Resultados

20 La inyección local en las articulaciones de rodilla de plasminógeno humano durante 3 días en ratones plg<sup>+/+</sup> redujo exitosa y significativamente el número de *S. aureus* vivas 5 veces en comparación con el grupo de plg<sup>+/+</sup> control tratado con PBS. Estos datos demuestran claramente que el plasminógeno humano es un potente factor proinflamatorio que potencia la defensa del huésped frente a la infección bacteriana incluso en un animal de tipo natural. Estos datos (tabla 4, figura 10) indican además que el plasminógeno es un candidato a fármaco antiinfeccioso novedoso para uso clínico.

25 Tabla 2. Número de bacterias en ratones de tipo natural (plg<sup>+/+</sup>) a los que se les inyectó por vía local plasminógeno humano o PBS en el día 3 tras la inoculación de 1 x 10<sup>6</sup> UFC de *S. aureus* Phillips. Obsérvese que en ratones de tipo natural a los que se les inyectó por vía local Plg el numero de bacterias se reduce significativamente 5 veces en comparación con los de tipo natural a los que se les inyectó por vía local PBS.

30

Grupos	Número de muestras	Número medio de bacterias (media±DE, x 10 <sup>6</sup> UFC)
Plg <sup>+/+</sup> con inyección local de Plgh	7	0,031±0,011*
Plg <sup>+/+</sup> con inyección local de PBS	7	0,14±0,047

\*, P<0,05, en comparación con el grupo de ratones plg<sup>+/+</sup> con inyección local de PBS.

(La figura tiene la misma información que la tabla, de modo que no es necesaria).

Ejemplo 9

35 La complementación de plasminógeno restaura/potencia la defensa del huésped frente a la enfermedad periodontal inducida por *S. aureus* en animales experimentales

Métodos

El modelo experimental aplicado en este ejemplo es en gran medida tal como se describió anteriormente (31), con enmiendas necesarias para el entorno de esta investigación. Puesto que *S. aureus* es uno de los principales patógenos en la enfermedad periodontal, se usará en primer lugar *S. aureus* como bacteria infecciosa en este modelo. Sin embargo, puesto que se cree que el plasminógeno desempeña un papel general en la potenciación de la defensa del huésped frente a la infección, dependiendo de las condiciones de laboratorio, se usará probablemente *P. gingivalis* como otra bacteria infecciosa y se realizarán estudios similares como con *S. aureus*.

45 Se dividen aleatoriamente treinta y seis ratones de 8 semanas de edad en tres grupos; infectados por ligadura, infectados por ligadura simulada y controles. Se mantienen los ratones en mantenimiento convencional con un ciclo

de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y se alimentan con pienso y agua a voluntad.

*Ligaduras adheridas a S. aureus para inyección oral*

5 Para la infección periodontal, se preparan ligaduras adheridas a *S. aureus* sumergiendo trozos de 7 mm de ligadura estéril en caldo LB y se cultivan a 37°C hasta la fase logarítmica tardía-estacionaria temprana. Para el grupo simulado, se procesan las ligaduras con el procedimiento anterior pero sin los microorganismos. Para la enumeración de las bacterias en las ligaduras, se suspende en 1 ml de caldo LB y se agita con vórtex durante 30 segundos. Después de eso, se diluyen en serie las suspensiones y se propagan sobre placas de agar LB y se incuban a 37°C durante la noche. Entonces se contaron las colonias bacterianas viables para evaluar el número de *S. aureus*.

10 *Infección periodontal*

Se realiza la infección en el periodonto en los grupos infectados de manera experimental y de manera simulada colocando y atando las ligaduras alrededor de los dientes molares en el hueso maxilar de los animales anestesiados. Se ata una ligadura tratada de manera simulada o adherida a *S. aureus* en el primer molar maxilar (M1) en el hueso maxilar izquierdo con la ayuda de instrumentos estériles. Tras apretarse el nudo, se empuja la ligadura hacia la cisura. Los animales control no se ligan ni se infectan con el microorganismo.

*Detección e identificación de S. aureus*

20 En el momento del sacrificio, se examina la presencia de bacterias o bien tomando muestras de la biopelícula en la zona molar ligada, o bien arrancando el diente molar cuidadosamente y de un modo estéril. Se transfieren las muestras inmediatamente a caldo LB, se agitan con vórtex vigorosamente, se diluyen en serie y se colocan sobre placas de agar LB y se incuban a 37°C durante la noche. Se cuentan las UFC totales en las placas de agar LB después de eso para determinar el número de bacterias.

*Tratamiento con plasminógeno*

25 Tras la verificación del establecimiento del modelo en ratones, comienza la inyección diaria de plg humano (10 ul/ul), o bien por vía sistémica a través de inyección intravenosa, o bien por vía local en la encía marginal en el M1 maxilar izquierdo. El punto de partida de la inyección puede ser el momento de inicio del experimento, o durante la fase infecciosa del experimento. Al final del experimento, se sacrificarán los animales de cada grupo para la toma de muestras bacteriológicas finales y su análisis. Se separan las mandíbulas maxilares del cráneo, se retira la carne de tejido blando macroscópico tal como la lengua y se fija en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 24 horas. Después de eso, se transfieren las muestras a la disolución de descalcificación para eliminar el calcio del tejido óseo.

30 cuatro semanas de proceso de descalcificación, se incrustaron las muestras en parafina y se cortaron a 5 µm de grosor para la tinción morfológica. Se usó tinción con safranina O para el análisis morfológico, por tanto el cartílago y la mucina se tiñen de color rojo oscuro, las estructuras óseas y los dientes son de color azul y los núcleos celulares se tiñen de color azul oscuro.

Resultados

35 Basándose en la experiencia previa del tratamiento con plasminógeno de ratones plg<sup>-/-</sup>, en el que inyecciones tanto por vía sistémica como por vía local han reconstituido la inflamación gingival, la defensa normal del huésped (por ejemplo destrucción de bacterias) y reacoplamiento periodontal apropiado en estos animales que tienen enfermedad periodontal espontánea, se predice con fuerza una respuesta similar al tratamiento con plasminógeno de ratones plg<sup>-/-</sup> en el modelo de enfermedad periodontal inducida tal como se describió anteriormente. Además, basándose en los datos del estudio previo en otro modelo de infección, el modelo de artritis bacteriana, en el que la inyección local de plasminógeno potencia la defensa normal del huésped frente a bacterias infecciosas en ratones plg<sup>+/+</sup>, se predice con fuerza que el tratamiento local de plasminógeno en ratones plg<sup>+/+</sup> durante el modelo de enfermedad periodontal inducida descrito anteriormente también potenciará la defensa normal del huésped en ratones plg<sup>+/+</sup>. Y por tanto, todos estos datos mostrarán una fuerte indicación de que el plasminógeno es un candidato a fármaco

45 novedoso para prevenir y tratar la enfermedad periodontal, mejorar la cicatrización de heridas periodontales y promover la salud oral.

**Bibliografía**

1. Clark, W.B., y Loe, H. 1993. Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontol.* 2000. 2:72-82.

50 2. Liakoni, H., Barber, P., y Newman, H.N. 1987. Bacterial penetration of pocket soft tissues in chronic adult and juvenile periodontitis cases. *An ultrastructural study. J. Clin. Periodontol.* 14:22-28.

3. Branemark, P.I, Flansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O., y Ohman, A. 1977. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Supl.* 16:1-132.

4. Alexander CM, y Werb, Z. 1991. Extracellular matrix degradation. En *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay ED, editor. Plenum Press. Nueva York. 255-302.
5. Wcrb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A., y Harris, E.D., Jr. 1977. Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells. Evidence for a role of plasminogen activator. *N. Engl. J. Med.* 296:1017-1023.
- 5 6. HE, C.S., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., y Goldberg, G.I. 1989. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* 86:2632-2636.
- 10 7. Wiman, B., y Wallen, P. 1975. Structural relationship between "glutamic acid" and "lysine" forms of human plasminogen and their interaction with the NH<sub>2</sub>-terminal activation peptide as studied by affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 50:489-494.
8. Saksela, O., y Rifkin, D.B. 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:93-126.
9. Wallén P 1980. Biochemistry of plasminogen. En *Fibrinolysis*. Kline DL, and Reddy KKN, editors. CRC press. Florida. 1-24.
- 15 10. Raum, D., Marcus, D., Alper, C.A., Levey, R., Taylor, P.D., y Starzl, T.E. 1980. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208:1036-1037.
11. Sottrup-Jensen, L., Zajdel, M., Claeys, H., Petersen, T.E., y Magnusson, S. 1975. Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 72:2577-2581.
- 20 12. Collen, D., y Lijnen, H.R. 1991. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 78:3 114-3124.
13. Alexander, C.M., y Werb, Z. 1989. Proteinases and extracellular matrix remodeling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:974-982.
14. Mignatti, P., y Rifkin, D.B. 1993. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev.* 73:161-195.
- 25 15. Collen, D. 2001. Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrinhomeostasis and tissue remodeling. *Hematology. (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)* 1-9.
16. Rifkin, D.B., Moscatelli, D., Bizik, J., Quarto, N., Blei, F., Dennis, P., Flaumenhaft, R., y Mignatti, P. 1990. Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ. Dev.* 32:313-318.
- 30 17. Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L., y Duffy, M.J. 1997. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int. J. Cancer* 72:1-22.
18. Rifkin, D.B., Mazzieri, R., Munger, J.S., Noguera, I., y Sung, J. 1999. Proteolytic control of growth factor availability. *APMIS* 107:80-85.
19. Lahteenmaki, K., Kuusela, P., y Korhonen, T.K. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:531-552.
- 35 20. Broder, C.C., Lottenberg, R., von Mering, G.O., Johnston, K.II., y Boyle, M.D. 1991. Isolation of a prokaryotic plasmin receptor. Relationship to a plasminogen activator produced by the same micro-organism. *J. Biol. Chem.* 266:4922-4928.
21. Berge, A., y Sjobring, U. 1993. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.* 268:25417-25424.
- 40 22. Flinchs, H., Simon, M.M., Wallich, R., Bechtel, M., y Kramer, M.D. 1996. *Borrelia burgdorferi* induces secretion of pro-urokinase-type plasminogen activator by human monocytes. *Infect. Immun.* 64:4307-4312.
23. Brandtzaeg, P., Joo, G.B., Brusletto, B., y Kierulf, P. 1990. Plasminogen activator inhibitor 1 and 2, alpha-2-antiplasmin, plasminogen, and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *Thromb. Res.* 57:271-278.
- 45 24. Fuchs, H., Simon, M.M., Wallich, R., Bechtel, M., y Kramer, M.D. 1996. *Borrelia burgdorferi* induces secretion of pro-urokinase-type plasminogen activator by human monocytes. *Infect. Immun.* 64:4307-4312.
25. Klemm, P., y Schembri, M.A. 2000. Fimbriae-assisted bacterial surface display of heterologous peptides. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:215-221.
26. Lahteenmaki, K., Westerlund, B., Kuusela, P., y Korhonen, T.K. 1993. Immobilization of plasminogen on

*Escherichia coli* flagella. FEMS Microbiol. Lett. 106:309-314.

27. Berge, A., y Sjobring, U. 1993. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. J. Biol. Chem. 268:25417-25424.

5 28. Pancholi, V., y Fischetti, V.A. 1998. alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. J. Biol. Chem. 273:14503-14515.

29. Harrington, D.J. 1996. Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease. Infect. Immun. 64:1885-1891.

10 30. Paul, R., Lorenzl, S., Koedel, U., Sporer, B., Vogel, U., Frosch, M., y Pfister, H.W. 1998. Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis. Ann. Neurol. 44:592-600.

31. Kimura, S., Nagai, A., Onitsuka, T., Koga, T., Fujiwara, T., Kaya, H., y Hamada, S. 2000. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. J. Periodontol. 71:1167-1173.

## REIVINDICACIONES

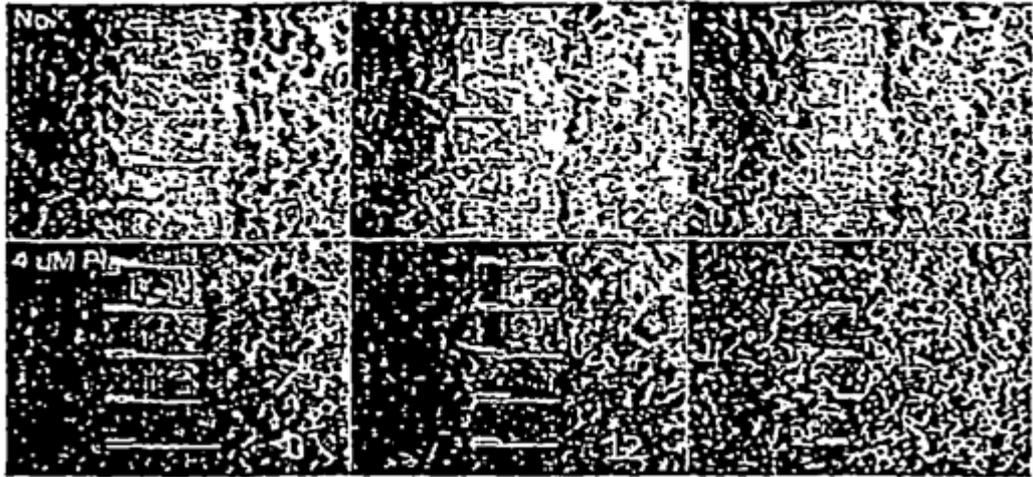
1. Uso de un compuesto seleccionado de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico, para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, para la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de enfermedad periodontal infecciosa provocada por infección bacteriana, viral o fúngica en un sujeto que necesita tal tratamiento.
2. Uso de un compuesto seleccionado de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico, para la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable, para promover la cicatrización de heridas periodontales infecciosas en un sujeto que necesita tal tratamiento.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad periodontal es, o está provocada por, una infección bacteriana.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad periodontal se selecciona de: periodontitis, gingivitis, gingivitis necrotizante, periimplantitis y mucositis periimplantaria.
5. Uso según la reivindicación 1, que además activa células inflamatorias, potencia la migración de queratinocitos, reduce el crecimiento bacteriano, elimina el tejido necrótico, mejora la remodelación tisular, reduce y/o potencia la expresión de citocinas.
6. Uso según la reivindicación 2, en el que la herida periodontal infecciosa es una herida provocada por lesión o una herida provocada por cirugía periodontal o cirugía plástica.
7. Uso según la reivindicación 2, que reduce además la deposición de fibrina, promueve la migración de queratinocitos, potencia la expresión de citocinas, elimina el tejido necrótico, activa células inflamatorias y/o mejora la remodelación tisular.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un ser humano, y el compuesto es plasminógeno humano.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sujeto es un mamífero no humano.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición va a administrarse mediante un pulverizador, o mediante una administración tópica, oral, local o sistémica.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición se selecciona del grupo que consiste en una disolución acuosa, una disolución para gargarismos, un gel, una loción, un bálsamo, un polvo, una pasta, una pasta de dientes, un vendaje o un apósito para heridas.
12. Uso según la reivindicación 10, en el que la composición para administración tópica comprende desde 1  $\mu$ g hasta 500 mg de plasminógeno por centímetro cuadrado del área de aplicación.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración va a repetirse al menos una vez.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la administración va a repetirse diariamente.
15. Composición farmacéutica para su uso en la profilaxis, la prevención y/o el tratamiento de enfermedad periodontal infecciosa provocada por infección bacteriana, viral o fúngica que comprende un compuesto seleccionado de una variante genética que se produce de manera natural de plasminógeno, Lys-plasminógeno, Glu-plasminógeno, mini-plasminógeno y variantes de plasminógeno que comprenden uno o más de los dominios kringle y el dominio proteolítico.

Figura 1.

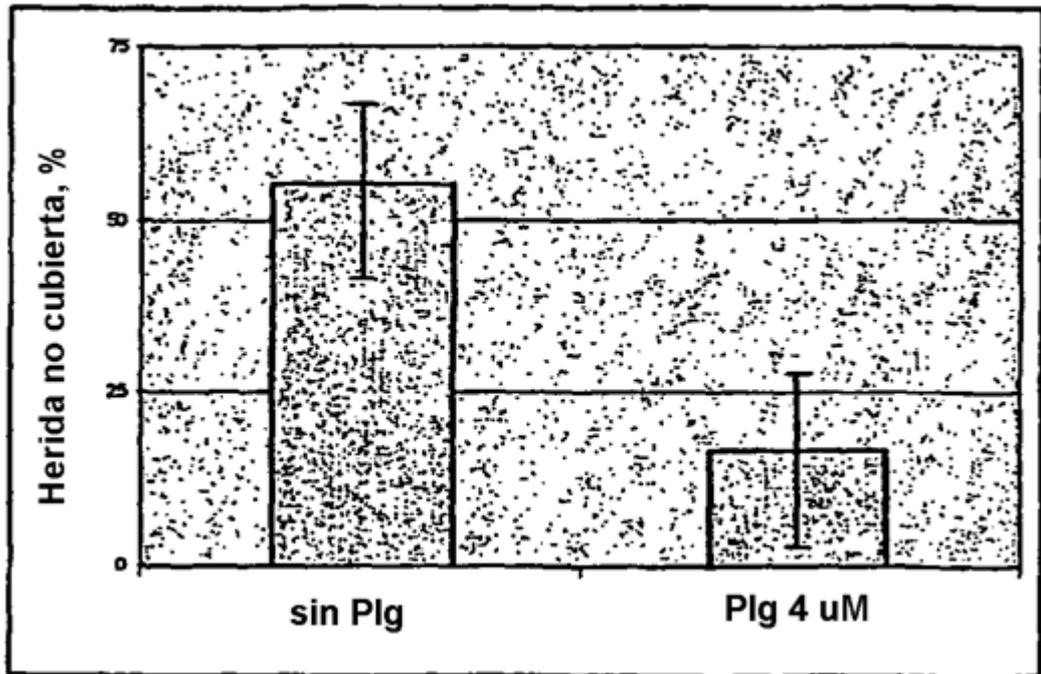


Figura 2.

A.



B.



**Figura 3.**

**Ratón de tipo natural, 11 semanas de edad    Ratón deficiente en Plg, 9 semanas de edad**

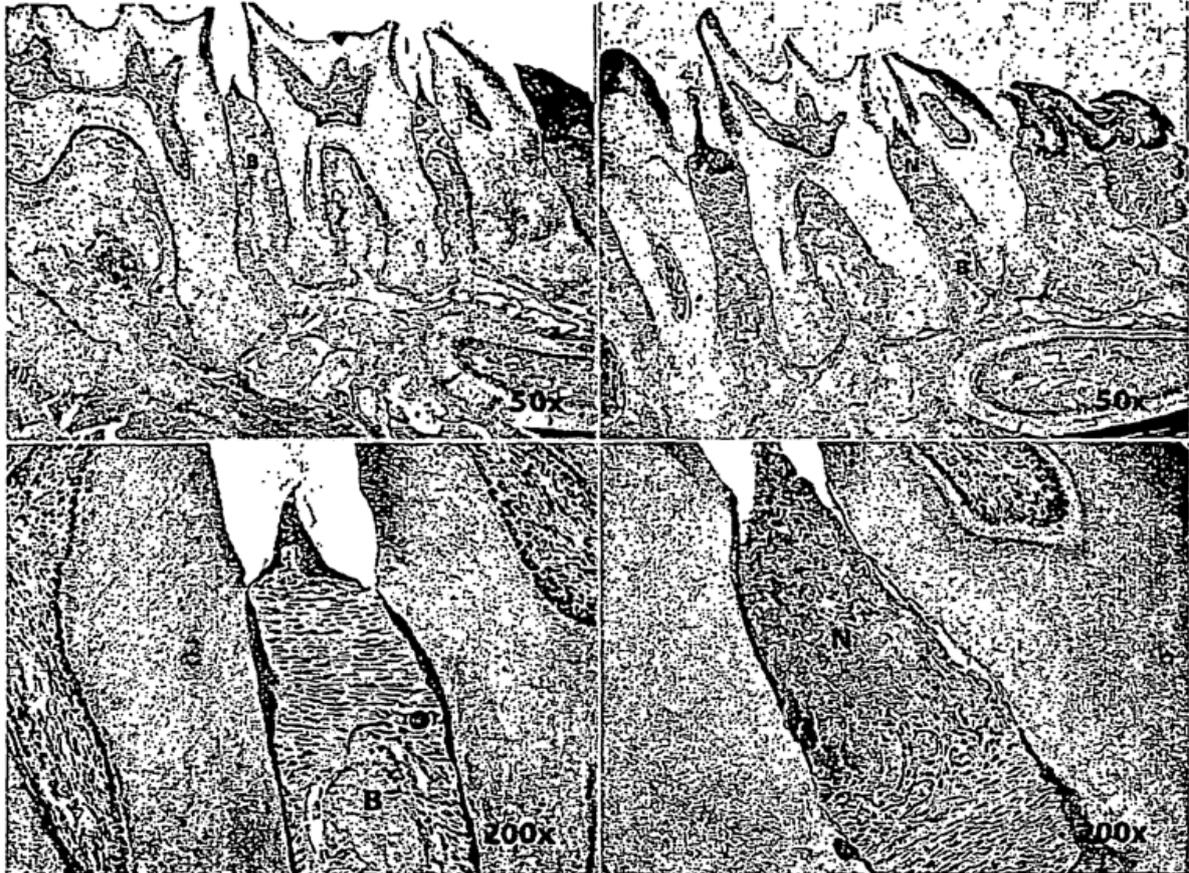


Figura 4.

Ratón de tipo natural, 16 semanas de edad      Ratón deficiente en Plg, 16 semanas de edad

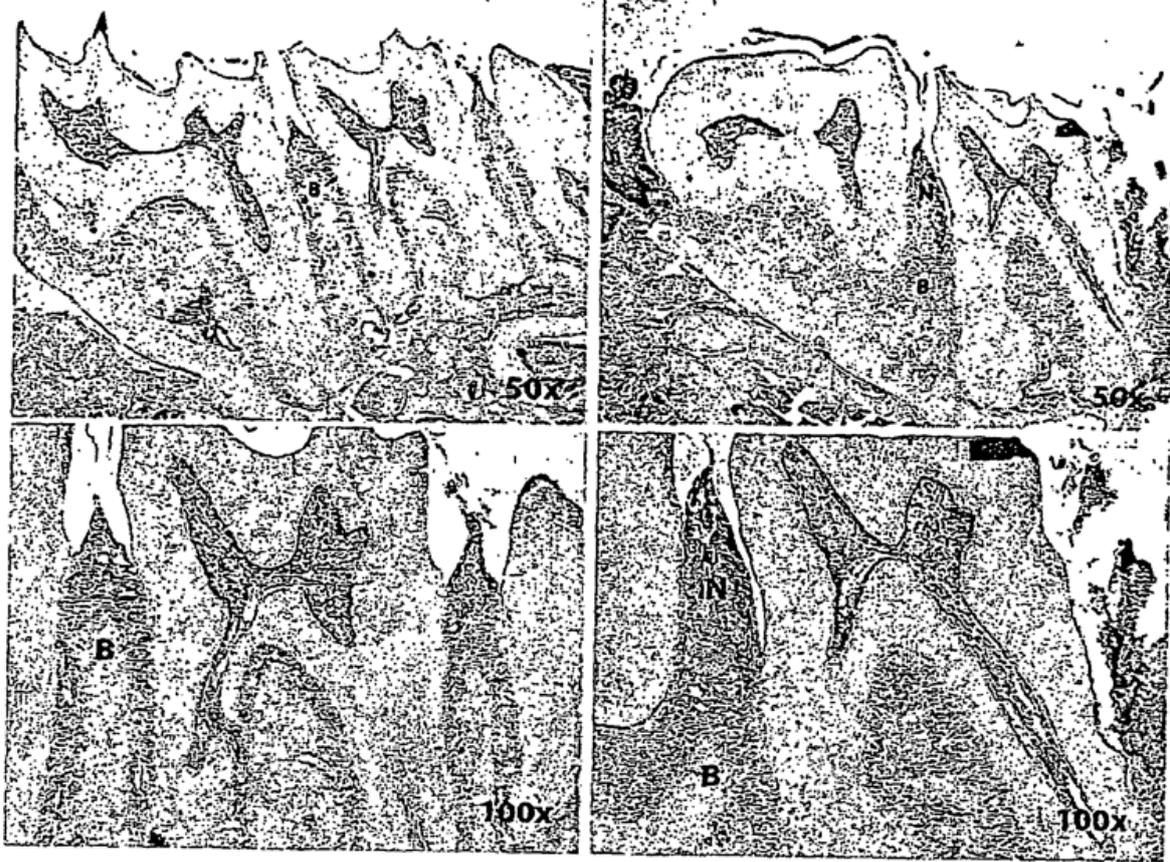


Figura 5.

Ratón de tipo natural, 19 semanas de edad    Ratón deficiente en Plg, 17 semanas de edad



Figura 6.

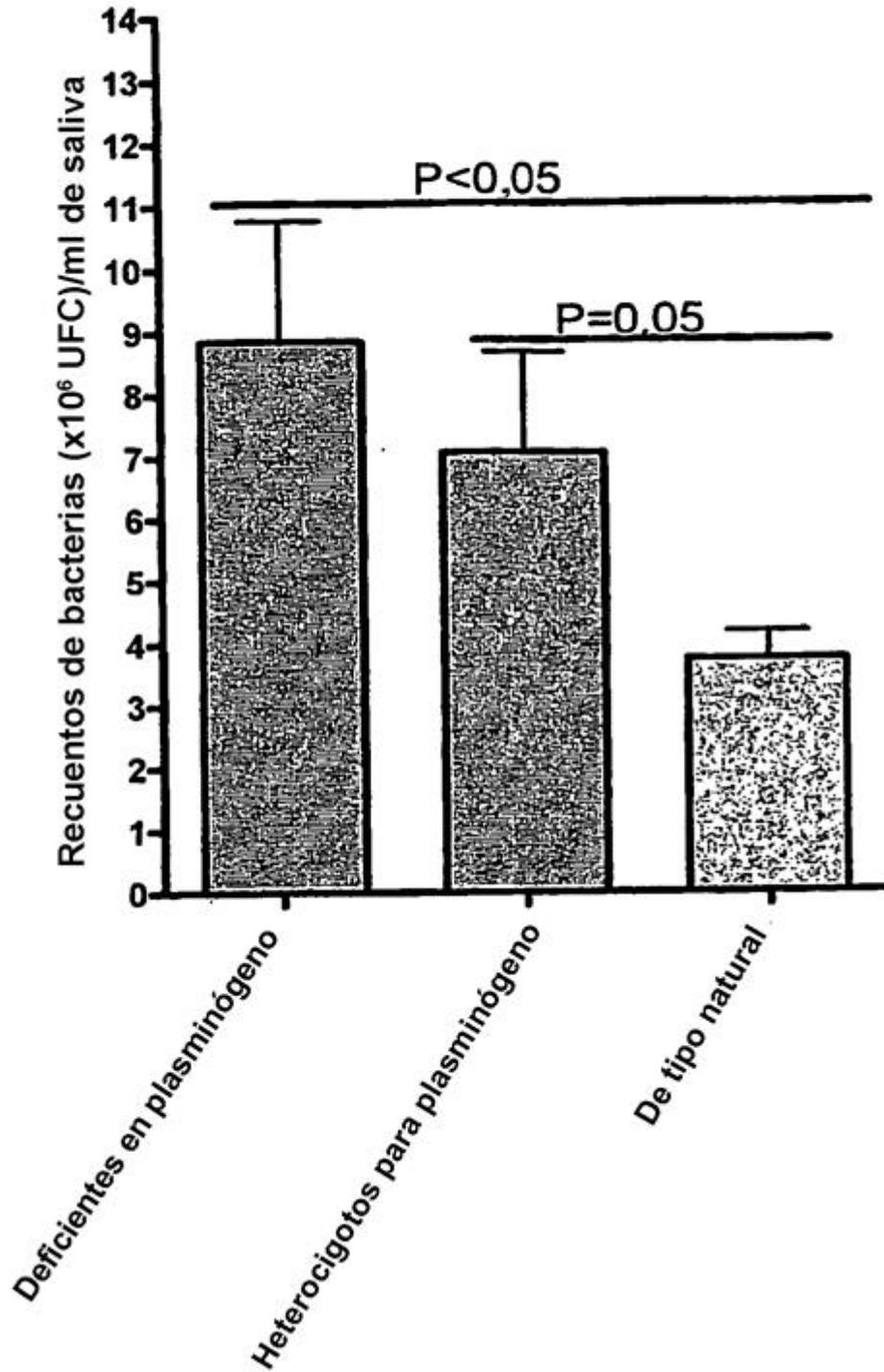


Figura 7.

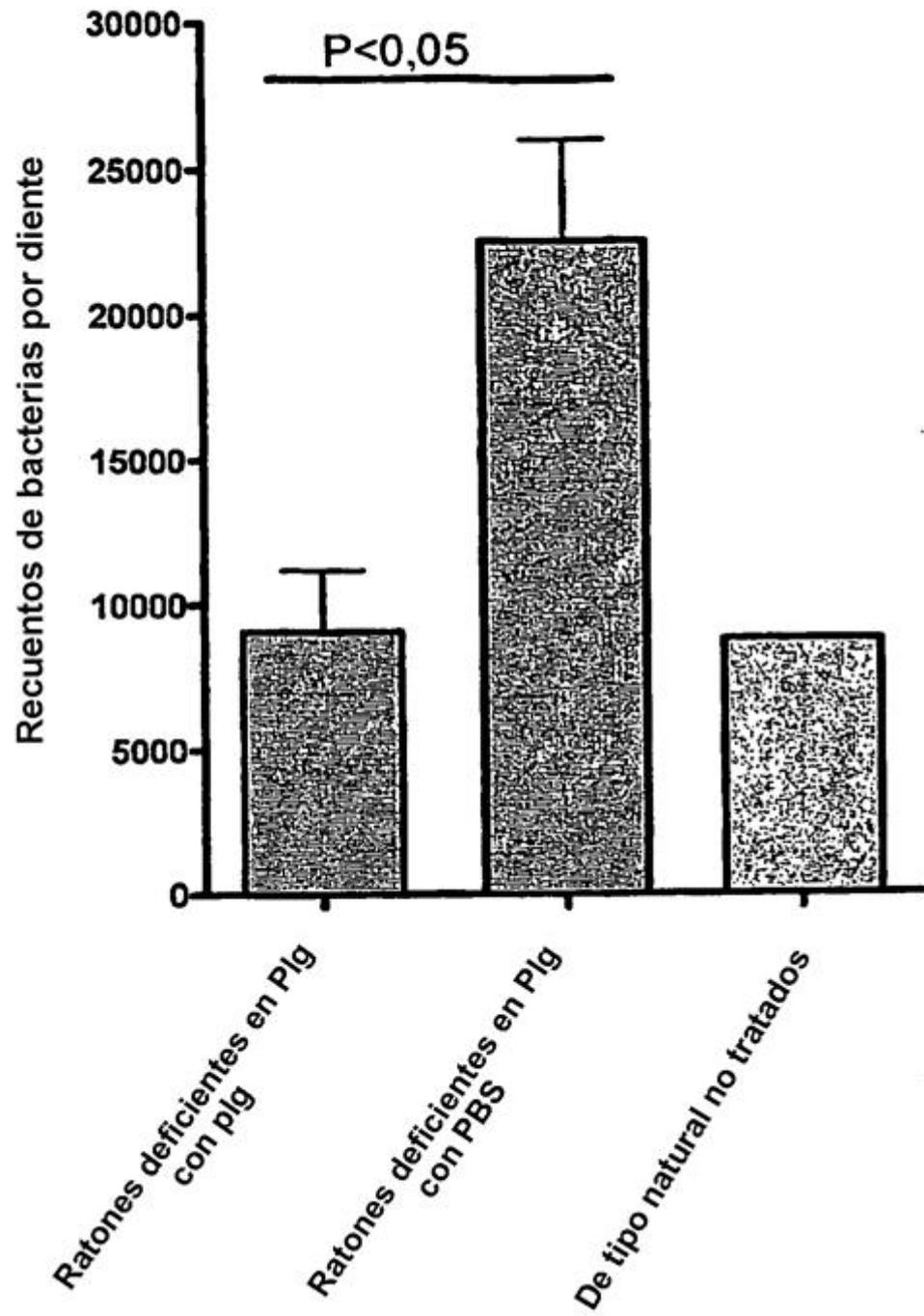


Figura 8.

Ratones Plg-/- tratados con PBS Plg-/-tratados con plasminógeno

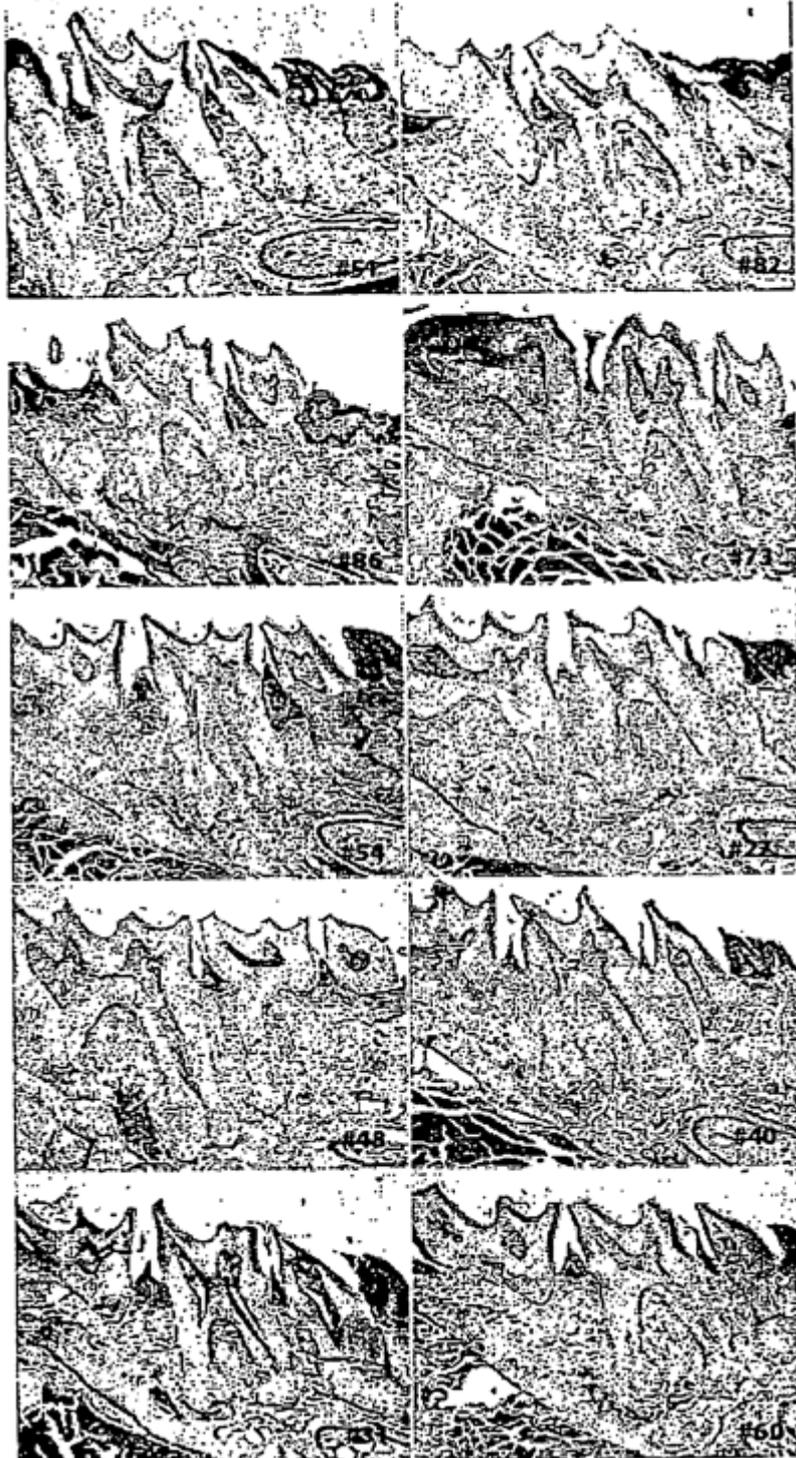


Figura 9.

Ratones Plg<sup>-/-</sup> tratados con PBS Plg<sup>-/-</sup> tratados con plasminógeno

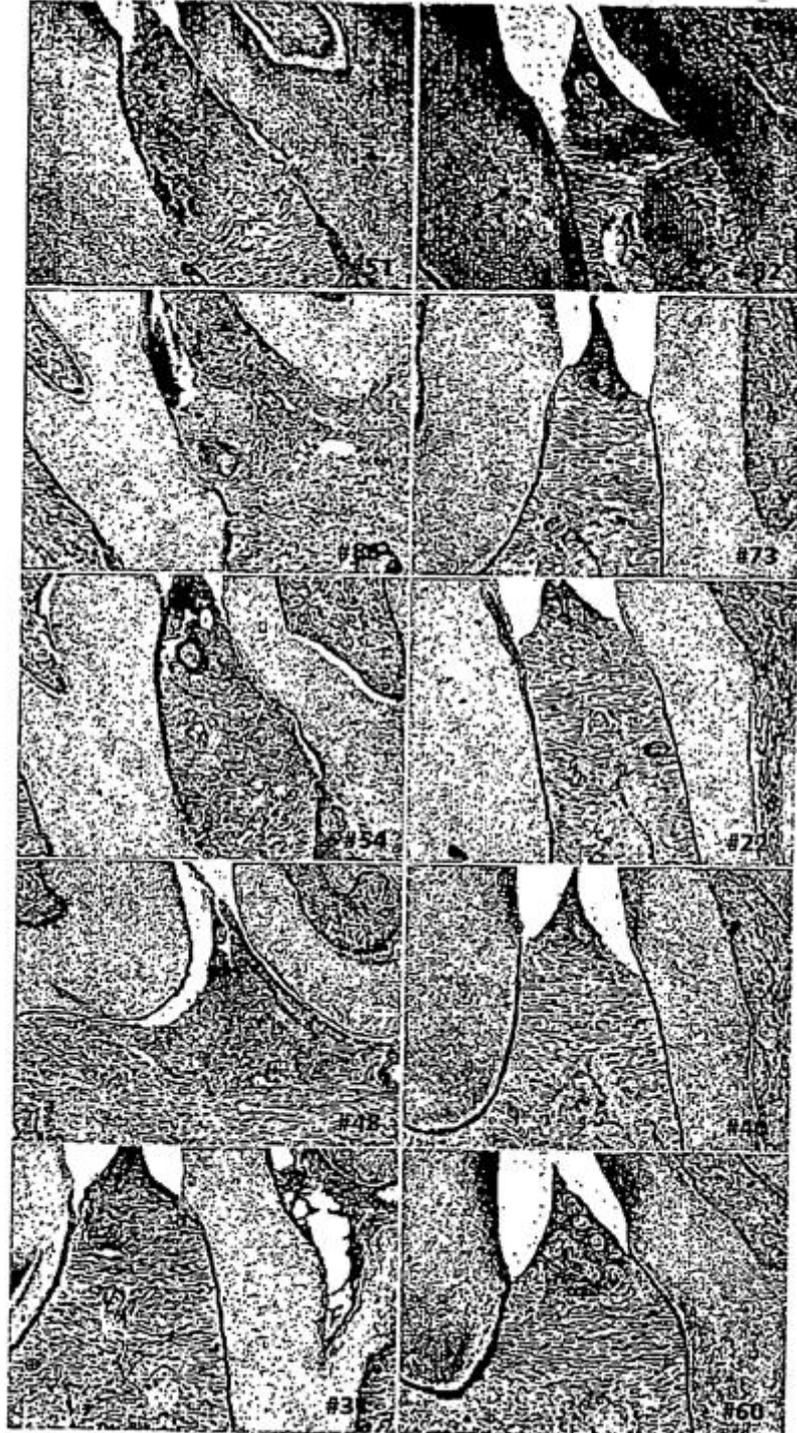


Figura 10.



Figura 11.

Ratones de tipo natural  
de 22 semanas de edad

Ratones deficientes dobles en  
tPA/uPA de 22 semanas de edad



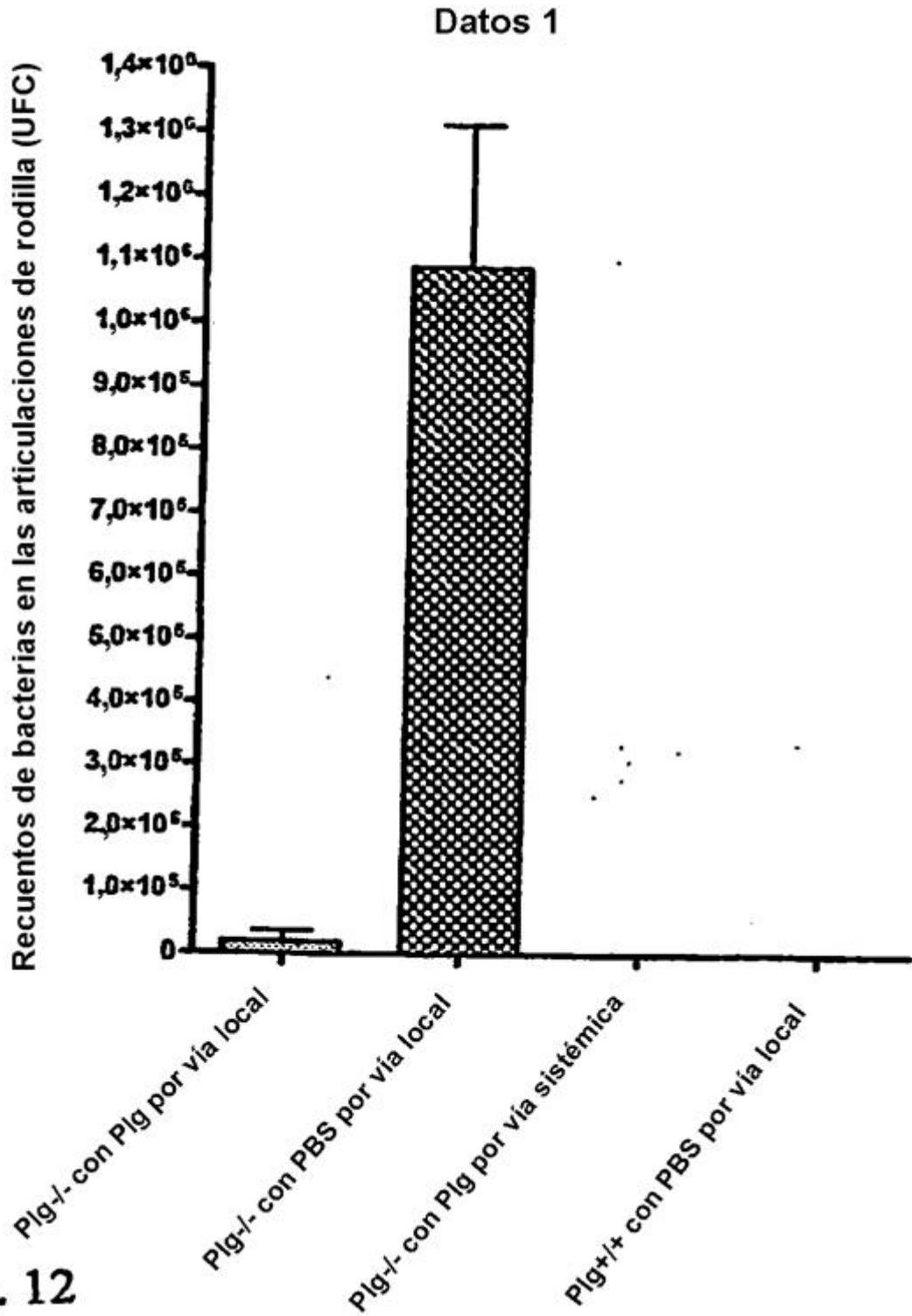


Fig. 12

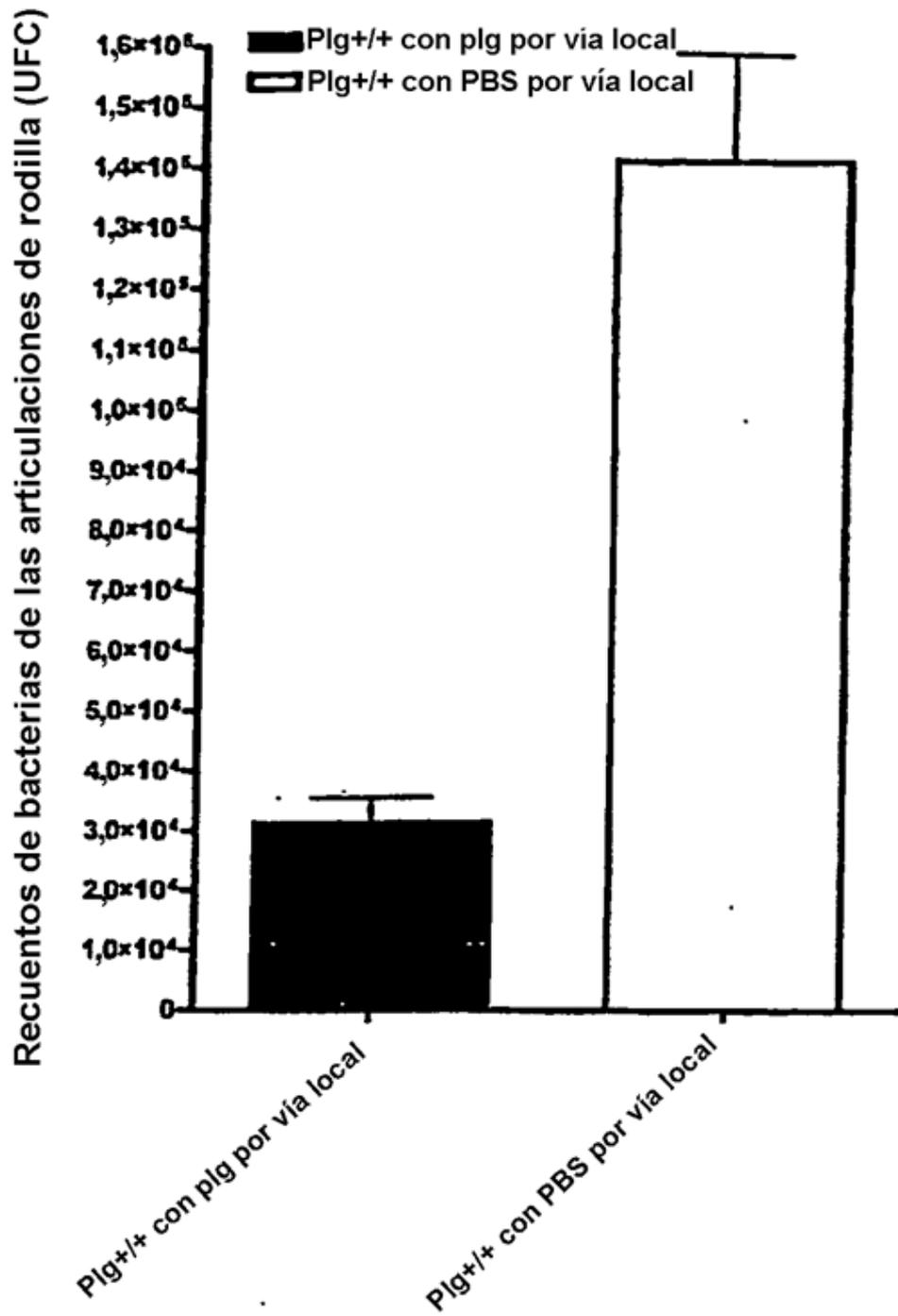


Fig. 13