

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 141**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2017 PCT/CN2017/089062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018 WO18107702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2017 E 17880561 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 3556383**

54 Título: **Plasminógeno para su uso en el tratamiento de la diabetes**

30 Prioridad:

15.12.2016 WO PCT/CN2016/110171

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

07.10.2024

73 Titular/es:

**TALENGEN INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)
Suite 2409, Everbright Center, 108 Gloucester
Road, Wanchai
Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:

LI, JINAN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 981 141 T3

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

DESCRIPCIÓN

Plasminógeno para su uso en el tratamiento de la diabetes

5 **Campo Técnico**

[0001] La presente invención se refiere a un nuevo método para tratar la diabetes mellitus, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno a un sujeto diabético; además, la presente invención se refiere a un medicamento para tratar la diabetes mellitus.

10

Antecedentes de la Invención

[0002] La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad común genéticamente predispuesta anormal del metabolismo de la glucosa con trastorno endocrino, y es causada por secreción absoluta o relativamente insuficiente de insulina. En 2015, había 415 millones de pacientes con diabetes mellitus en todo el mundo, y se espera que el número de pacientes con diabetes mellitus alcance los 642 millones en 2040 ^[1]. La diabetes mellitus es una de las principales enfermedades que ponen en grave peligro la salud humana.

15

[0003] Las principales manifestaciones de la diabetes mellitus son el metabolismo anormal de la glucosa y los trastornos metabólicos de sustancias como las grasas y las proteínas; además, la hiperglucemia a largo plazo puede dar lugar a complicaciones diabéticas graves, incluidas las complicaciones microvasculares, la nefropatía diabética, la cardiomiopatía diabética, la neuropatía diabética, la dermopatía diabética, la diabetes mellitus con infecciones, etc. Entre ellas, la nefropatía diabética y la neuropatía diabética tienen un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes, y son severamente perjudiciales.

20

25

[0004] La diabetes mellitus clínicamente común se puede dividir en cuatro tipos: diabetes mellitus tipo 1 (T1DM), diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), diabetes mellitus gestacional y tipos especiales de diabetes mellitus. Entre ellos, los más frecuentes son los pacientes con diabetes mellitus gestacional y diabetes mellitus de tipo especial.

[0005] Se cree que la DM1T está asociada con factores genéticos, factores ambientales (como infecciones virales, productos químicos diabetógenos y factores dietéticos) y factores autoinmunes. Los estudios han demostrado que hay al menos 17 loci génicos asociados con T1DM, que se encuentran en diferentes cromosomas. En términos de factores ambientales, los factores ambientales que afectan la aparición de la T1DM comprenden infecciones virales, productos químicos diabetógenos y factores dietéticos, en los que los factores virales son los más importantes. Se ha encontrado que paperas, virus de la rubéola, citomegalovirus y similares están asociados con la patogénesis de la T1DM. El mecanismo es que los virus pueden destruir directamente las células pancreáticas β de los islotes, y después de que los virus dañan las células pancreáticas de los islotes, se desencadenan reacciones autoinmunes, que causan más daño a las células pancreáticas β de los islotes. Los productos químicos diabetógenos como el aloxano, la estreptozotocina (STZ) y la pentamidina actúan sobre las células pancreáticas del islote β , lo que conduce a la destrucción de las células pancreáticas del islote β . Los factores autoinmunes comprenden inmunidad humoral e inmunidad celular. La inmunidad humoral se manifiesta por la presencia de múltiples autoanticuerpos contra las células β de los islotes pancreáticos en la circulación sanguínea de un paciente. La principal manifestación de la inmunidad celular es que puede observarse una expresión anormal del antígeno HLA-DA y una sobreexpresión del receptor de IL-2 y de los antígenos HLA de clase 1 de la superficie de las células de los islotes pancreáticos β en las superficies de las células infiltrantes inflamatorias de los islotes pancreáticos y de las células β de los islotes pancreáticos, y la proporción de CD4+/CD8+ en la sangre periférica y los niveles de IL-1, TNF- α , e INF- γ son elevados. Los cambios patológicos causados por estos factores se centran en la destrucción de las células de los islotes pancreáticos, lo que provoca una disminución absoluta del nivel de insulina en el organismo y, por tanto, la T1DM se considera una enfermedad autoinmune.

30

35

40

45

[0006] La T2DM es una enfermedad poligénica, y generalmente se considera de origen múltiple, en la que los factores ambientales y los factores genéticos actúan conjuntamente para causar la resistencia a la insulina; y la manifestación de la T2DM es que la insulina a una concentración igual al nivel normal no puede funcionar normalmente debido a la resistencia en el organismo. En consecuencia, para alcanzar el nivel normal de glucosa en sangre, el organismo segregará insulina en exceso para paliar el estado de "baja eficacia" de la insulina en servicio, y si continúa así, las necesidades de las células de los islotes pancreáticos serán cada vez mayores, lo que acabará provocando daños en las propias células de los islotes pancreáticos debido al "exceso de trabajo", convirtiéndose así en una deficiencia absoluta de insulina.

50

55

Patogénesis de la DM

[0007] La patogénesis de la DM es compleja y está relacionada principalmente con la predisposición genética familiar, la heterogeneidad étnica, la deficiencia de receptores de insulina, el deterioro del sustrato del receptor de insulina, la regulación positiva de los genes relacionados con la proteína tirosina fosfatasa, la respuesta inflamatoria inmune excesiva, la lipotoxicidad, el estrés oxidativo, la alteración de las mitocondrias, etc. ^[2-3]

60

1. Ácidos grasos libres

[0008] Los niveles elevados de ácidos grasos libres son una de las causas de la resistencia a la insulina y también una de las características importantes de la resistencia a la insulina. Bajo la influencia de factores genéticos o ambientales, el nivel de ácidos grasos libres en la sangre aumenta, y cuando excede la capacidad de almacenamiento de los tejidos adiposos, se produce resistencia a la insulina. Los estudios han demostrado que las dietas altas en grasa a largo plazo provocan una disfunción de las células β de los islotes pancreáticos, ya que las dietas altas en grasa no sólo desencadenan una resistencia periférica a la insulina, sino que también aumentan el contenido de grasa abdominal y reducen la capacidad de la insulina para inhibir la lipólisis, promoviendo así un aumento del contenido de ácidos grasos libres, lo que a su vez inhibe la fosforilación de los sitios tiro- sinos del receptor de insulina y de los sustratos del receptor de insulina IRS-1 y IRS-2, inhibiendo así la actividad de la P13K, lo que provoca que la vía de transducción de señales de la insulina se vea obstaculizada, formándose así la resistencia a la insulina.

2. Respuesta inflamatoria

1) Inflamación y resistencia a la insulina

[0009] La T2DM es una enfermedad inflamatoria leve e inespecífica. Los estudios de los últimos años han demostrado que el principal mecanismo de inflamación que conduce a la resistencia a la insulina es que existe un efecto cruzado entre los factores inflamatorios y la transducción de señales de los sustratos receptores de insulina: por un lado, un factor inflamatorio resultante de una inflamación inespecífica dificulta la ruta de seguimiento del IRS/PI3K, y por otro lado, una serie de quinasas activadas por el factor inflamatorio inducen la fosforilación de los sitios de serina y treonina en el IRS, lo que dificulta la fosforilación normal de la tirosina, lo que en última instancia resulta en la disminución de la capacidad de transducción de señales de insulina y la inducción de resistencia a la insulina [2-3].

[0010] En una célula diana, la unión de insulina a un receptor de la misma puede activar el receptor, luego la ruta de transducción de señales en la célula da como resultado una serie de moléculas de transducción intracelular y acciones en cascada enzimática para completar la transmisión y amplificación escalonada de la señal en la célula, y finalmente, la señal se pasa a un órgano diana para producir una serie de efectos biológicos. Hay dos vías principales de transducción de señales, una es la vía IRS-1-PI3K-PKB/AKT y la otra es la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (Shc/Raf/MAPK). En la primera vía, en primer lugar, la insulina se une a un receptor de la misma bajo la estimulación de insulina y/o glucosa exógena, activando así una tirosina quinasa endógena del receptor. La tirosina quinasa activada induce la fosforilación del sitio de tirosina en el sustrato del receptor de insulina IRS mientras que logra la fosforilación de la tirosina quinasa misma. El IRS activado migra a la membrana celular, la fosfotirosina se ancla a la tirosina quinasa del IRS a través de un dominio de unión a fosfotirosina (PTB), y el IRS fosforilado con tirosina recluta la subunidad reguladora P85 de PI3K a través de un dominio SH2. P85 se une a una molécula de 3-fosfato de fosfoinositol y convierte el monofosfato de fosfatidilinositol (PIP) en difosfato de fosfatidilinositol (PIP2) y trifosfato de fosfatidilinositol (PIP3), ambos segundos mensajeros de la insulina y otros factores de crecimiento, y son sitios de anclaje para moléculas de separación aguas abajo proteína quinasa-1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) y/o algunos subtipos de proteína quinasa c (PKC). PDK1 puede activar la proteína quinasa B (PKB, también conocida como Akt) y un subtipo atípico de PKC. La PKB activada, por un lado, inactiva la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3) por medio de la fosforilación de serina/treonina y, por otro, activa la diana de mamífero de la proteína quinasa rapamicina (mTOR), induciendo así la activación de la fosforilación de la quinasa 70ku-S6 (p70S6K) cadena abajo. La proteína cinasa mTOR puede actuar como un "receptor de ATP" y activa la p70S6K sin Ca_2^+ /cAMP, consiguiendo así una síntesis proteica controlada, una transcripción génica mejorada y la facilitación de la hipertrofia de las células β de los islotes pancreáticos, así como otros efectos biológicos. La PKB puede inducir directamente la fosforilación de serina/treonina en ciertos factores de transcripción para promover la aparición de la mitosis celular [4-5]. En la segunda vía, la activación de Ras puede lograrse a través de dos vías. 1) El receptor de insulina activado activa la proteína IRS-2, y la proteína IRS-2 puede transmitir la señal a la proteína adaptadora proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2), que a su vez interactúa con una proteína de señalización factor de intercambio GDP/GTP (mSOS), y puede a su vez activar el Ras-GDP inactivado en Ras-GT para lograr la activación de Ras. La acción directa del receptor de insulina fosforila la tirosina de la proteína señalizadora She, y entonces She se une a Grb2 para activar Ras a través de la vía mSOS. La Ras-GTP activada recluta a la serine quinasa Raf, que fosforila secuencialmente a la MAPK quinasa y a la MAPK. La MAPK activada puede activar otras proteínas quinasas para participar en procesos como la inducción de la transcripción génica y la regulación de la apoptosis [6].

[0011] Hasta ahora, se ha confirmado que el residuo de serina del IRS-1 puede ser fosforilado por varias cinasas inflamatorias como la c-Jun N-terminal cinasa (JNK), la κ B cinasa β (κ K β) y la proteína cinasa C (PKC)- Θ . El radioinmunoanálisis muestra que el sitio de la serina 307 es el principal para la fosforilación del IRS-1 por la JNK, y su mutación provoca la desaparición de la fosforilación del IRS-1 inducida por la JNK y del efecto inhibidor del TNF sobre la fosforilación de la tirosina del IRS-1 inducida por la insulina. La JNK reduce la fosforilación de la tirosina en el sustrato del receptor de insulina fosforilando la serina 307 del IRS-1, inhibiendo así la transducción de la señal de insulina [7]. Hiorsumi et al. descubrieron que la actividad de la JNK aumentaba significativamente en el hígado, el músculo y los tejidos adiposos de ratones obesos inducidos por dieta y de ratones ob/ob. La eliminación del gen (JNK1-/-) puede atenuar la resistencia a la insulina en los ratones obesos inducidos por dieta y aliviar la obesidad, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia en los ratones ob/ob. El nivel de fosforilación del sitio de serina 307 del IRS-1 en el tejido hepático de los ratones obesos era superior al de los ratones delgados; sin embargo, no se observó ningún aumento en los ratones obesos knockout (JNK1-/-); se puede observar que el sitio de serina 307 del IRS-1 era la diana en la que actúa la JNK in vivo [8]. Los estudios han demostrado que en un modelo de resistencia a la insulina de los hepatocitos inducida por la estimulación del TNF α , los

inhibidores de la JNK pueden bloquear completamente la fosforilación de la serina 307. La IκKβ puede afectar a la transducción de la señal de la insulina a través de al menos dos vías, es decir, induciendo directamente la fosforilación de la Ser307 del IRS-1 o mediante la fosforilación de la IκB, activando así el NF-κB, que induce indirectamente la resistencia a la insulina al estimular la expresión de diversos factores inflamatorios.

5

[0012] Las respuestas inflamatorias son respuestas defensivas del sistema inmune humano contra infecciones, daños tisulares y respuestas al estrés después de que se producen estas lesiones, y también están involucradas en la etiología o patogénesis de la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y tumores.

10

[0013] Ya en 1993, Hotmamisligil et al. ^[9] demostraron a través de experimentos con animales que las ratas obesas resistentes a la insulina tenían altos niveles de citoquinas proinflamatorias y TNF-α en los tejidos adiposos. Desde entonces, muchos investigadores han comenzado a explorar la relación entre inflamación y obesidad y la relación entre inflamación y resistencia a la insulina, y explorar la patogénesis molecular. En 2006, Hotmamisligil ^[10] propuso por primera vez una nueva definición médica, es decir, la inflamación metabólica, para enfatizar que esta inflamación sistémica crónica de bajo grado es causada principalmente por el exceso de nutrientes y metabolitos. La inflamación metabólica puede tener rutas de transducción molecular y de señales similares a las de las inflamaciones típicas; a diferencia de las inflamaciones típicas que hemos conocido en el pasado, la inflamación metabólica no tiene los síntomas de enrojecimiento, hinchazón, calor, dolor y disfunción. En circunstancias normales, el ambiente interno del cuerpo está en un estado estacionario, y las inflamaciones y metabolismos mantienen estados de equilibrio dinámico respectivamente o entre ellos. En caso de trastornos metabólicos en un cuerpo, tal equilibrio en el cuerpo se rompe, causando desequilibrio del sistema inmunológico, desencadenando una ruta de transducción de señales inflamatorias, impulsando así al cuerpo a liberar una serie de factores inflamatorios. Algunos de los factores inflamatorios incluso amplifican las respuestas antiinflamatorias para formar un efecto de cascada inflamatoria, que desarrolla aún más la resistencia a la insulina en el cuerpo, lo que conduce a la aparición del síndrome metabólico.

25

[0014] Los estudios han demostrado que el TNF-α está estrechamente relacionado con el síndrome metabólico. Los TNF, también conocidos como discrasia, son producidos principalmente por macrófagos activados, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T, en donde el TNF secretado por los macrófagos se llama TNF-α, y la fotoxina linfática secretada por los linfocitos T se llama TNF-β. La actividad biológica del TNF-α representa el 70%-95% de la actividad global de los TNF, y por lo tanto, normalmente la referencia al TNF en la actualidad se refiere principalmente al TNF-α. Después de años de investigación y discusión, se ha confirmado que el TNF-α está asociado con varias enfermedades como la resistencia a la insulina, enfermedades autoinmunes, tumores y hepatitis B crónica. El TNF-α juega un papel crucial en la aparición y desarrollo de la resistencia a la insulina. Swaroop et al. ^[11] concluyeron detectando el nivel de TNF-α en suero en 50 pacientes con T2DM que los TNF-α están elevados en los pacientes con T2DM y están significativamente asociados con el IMC, el nivel de insulina en ayunas y el índice de resistencia a la insulina de evaluación de modelo homeostático (HOMA-IR), sugiriendo que el TNF-α juega un papel importante en la patogénesis de la T2DM. También se ha señalado en estudios adicionales que el TNF-α puede inhibir la fosforilación del receptor de insulina, y cuando se inhibe la fosforilación del receptor de insulina, se puede reducir la expresión del gen del transportador de glucosa, reduciendo así la actividad de la lipoproteína lipasa, conduciendo finalmente a la lipolisis ^[12].

40

[0015] Una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado está estrechamente relacionada con la disfunción de las células β de los islotes pancreáticos. La disfunción pancreática de las células β de los islotes causada por una disminución en el número de células β es otra causa importante de la patogénesis de T2DM, y la apoptosis de las células β es la causa más importante de la disminución en el número de células β. Debido a razones genéticas o dietéticas, los pacientes con T2DM son susceptibles a la resistencia a la insulina; además, en el caso de pacientes con glucosa en sangre elevada, la hiperglucemia puede promover la producción de IL-6 que no solo puede reducir la expresión de GLUT4, reducir el transporte de glucosa por las células grasas, dificultar la síntesis de glucógeno y reducir la sensibilidad a la insulina, sino que también puede promover la secreción de IL-6 por las células de los islotes pancreáticos, causando un círculo vicioso. La hiperglucemia induce la producción de una gran cantidad de IL-1 α, que resulta en apoptosis de las células de los islotes pancreáticos mediante la activación de rutas como NF-κB, MAPK, Fas y NO, y hay facilitaciones cruzadas de varias rutas inflamatorias para agravar la apoptosis de las células de los islotes pancreáticos, lo que finalmente conduce a la falla de la función de los islotes pancreáticos ^[13]. Además, la IL-1β también puede mediar las interacciones de los leucocitos, e interactuar y restringirse mutuamente con otras citoquinas como IFN-γ y TNF-α, y desempeñar un papel importante en el proceso de una lesión de las células β. La dislipidemia en T2DM causa un aumento en el nivel de sustancias hormonales como la leptina y la de IL-6. La leptina puede aumentar la liberación de IL-1β para inducir la optosis β celular, y también puede regular negativamente la secreción de insulina ^[14]. Además de causar resistencia a la insulina, las ROS también tienen un efecto sobre la lesión de las células pancreáticas de los islotes, y bajo estrés oxidativo, la expresión de los factores de transcripción del gen de la insulina y los sitios de unión a la insulina se reducen notablemente, afectando así a la producción y secreción de insulina. Otras adipocitosquinas como el TNF-α y la leptina también pueden reducir la función de las células β. La acción combinada de estas citoquinas causa un daño más notable a la función de las células pancreáticas de los islotes. Además, algunos factores inflamatorios también pueden actuar sobre la parte clave del sustrato 2 del receptor de insulina para fosforilar serina/treonina, lo que resulta en una degradación acelerada del sustrato 2 del receptor de insulina y promueve la apoptosis de las células pancreáticas del islote β.

60

3. Estrés oxidativo

[0016] Los estudios han demostrado que el estrés oxidativo es un factor importante en la aparición y el desarrollo de la DM2. El estrés oxidativo se refiere al desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) y su eliminación por el sistema de defensa antioxidante en el cuerpo, lo que resulta en una producción excesiva de ROS y RNS, causando daños a los histocitos y macromoléculas biológicas, como proteínas y ácidos nucleicos, en el cuerpo ^[13]. La hiperglucemia es la principal causa de estrés oxidativo y aumenta el contenido de ROS y RNS en el organismo a través vías como la cadena mitocondrial de transporte de electrones ^[14], la autooxidación de la glucosa y la vía de los polioles ^[15], en la que la cadena mitocondrial de transporte de electrones es la vía predominante de producción de ROS. En la cadena de transporte de electrones mitocondrial intervienen principalmente los complejos enzimáticos I-IV, el citocromo c y la coenzima Q, en los que se produce continuamente una pequeña cantidad de productos de superóxido, que incluyen el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, en los complejos enzimáticos I y III, mientras que la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa catalizan la conversión de los productos de superóxido en gas oxígeno y agua. Sin embargo, en condiciones de obesidad o hiperglucemia, los productos superóxido aumentan considerablemente, y se genera estrés oxidativo cuando el ritmo de producción de los productos superóxido supera el ritmo de eliminación de los mismos.

[0017] Varios estudios ^[16-18] han demostrado que las ROS pueden dañar directamente las células β , especialmente destruir la estructura mitocondrial celular y promover la apoptosis de las células β ; las ROS también pueden inhibir indirectamente la función de las células β al afectar la ruta de transducción de señales de insulina, por ejemplo, activando la ruta de señales del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) para causar una respuesta inflamatoria de las células β , inhibiendo la translocación nucleocitoplasmática de la homeocaja 1 pancreática y duodenal (PDX-1), inhibiendo el metabolismo de la energía mitocondrial, reduciendo la síntesis y secreción de insulina, etc. El estrés oxidativo causa una lesión de las células β a través de la ruta NF- κ B, en la que NF- κ B es un dímero compuesto por dos subunidades, p50 y RelA, y en una célula en reposo, se une a la proteína inhibidora I κ B para existir como un trímero inactivo en el citoplasma, que está involucrado principalmente en la respuesta de la célula a estimulaciones como estrés, citoquinas, radicales libres, bacterias y virus, y en la regulación transitoria de la expresión génica, etc. ^[19] Los estudios han demostrado que las ROS inducidas por hiperglucemia activan a NF- κ B al interrumpir la transducción de señales intracelulares e inducen lesiones de las células β ^[20]. Mariappan et al. ^[21] inhibieron la expresión de NF- κ B en ratones obesos db/db mediante el uso de ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), y descubrieron que el grado de daño causado por el estrés oxidativo en las mitocondrias de las células β de los ratones se redujo notablemente; Hofmann et al. ^[22] trataron a pacientes diabéticos con el fármaco antioxidante ácido α -lipoico y descubrieron que la actividad del NF- κ B se reducía significativamente en los cuerpos de los pacientes, y el estado de los pacientes también mejoraba; y Eldor et al. ^[23] inhibieron específicamente la expresión del NF- κ B en ratones mediante una técnica transgénica, lo que redujo notablemente la incidencia de la diabetes mellitus en los ratones inducida por STZ.

[0018] Como factor de transcripción nuclear multidireccional, NF- κ B está involucrado en varias regulaciones genéticas después de ser activado, como la proliferación celular, apoptosis, inflamación e inmunidad ^[24]. En un organismo con diabetes mellitus, el NF- κ B provoca la leucocitosis del islote pancreático al regular la expresión de genes de citocinas y quimiocinas, como los factores IL-1 (interleucina-1) y MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos/macrófagos-1), provocando así una lesión de las células β ^[25]. Además, muchos productos génicos regulados por el NF- κ B, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), activan aún más el NF- κ B, lo que agrava la lesión de las células β ^[26].

[0019] Estudios de Mahadev et al. ^[27] mostraron que las ROS tienen un efecto regulador sobre la transducción de señales de insulina, y este efecto es versátil. Bajo la estimulación de la insulina, el organismo produce rápidamente una cantidad traza de ROS mediante un mecanismo dependiente de Nox (NADPH oxidasa); las ROS actúan como un segundo mensajero, que inhibe principalmente la actividad de PTP1B mediante oxidación para promover una reacción en cascada de la insulina ^[28]; Además, tras la inhibición de la Nox mediante DPI (difenilenoiodonio), la fosforilación del receptor de insulina (InsR) y del sustrato del receptor de insulina (IRS) estimulados por la insulina disminuye en un 48% ^[29]. Estudios de Loh et al. ^[30] mostraron que las ROS fisiológicas pueden promover la sensibilidad del cuerpo a la insulina. Aunque en un estado fisiológico, una cantidad traza de ROS producida por la estimulación de la insulina promueve la acción de la insulina, la hiperglucemia a largo plazo hace que el cuerpo produzca una gran cantidad de ROS a través del camino mitocondrial ^[31], causando resistencia a la insulina.

[0020] InsR e IRS son elementos de señalización importantes en la ruta de transducción de señales de insulina: el primero es un elemento iniciador para la transducción de señales de insulina, y el IRS es un puente entre el primero y un elemento aguas abajo en la ruta. Numerosos estudios han demostrado que el estrés oxidativo puede interferir con la fosforilación de InsR e IRS a través de múltiples vías para dificultar la transducción de señales de insulina. IKK es un activador de la subunidad inhibidora I κ B de NF- κ B, y bajo estimulación ROS, IKK puede actuar como una quinasa para la fosforilación de serina/treonina de InsR e IRS, que promueve la fosforilación de serina en InsR e IRS, causando la inhibición de la fosforilación normal de tiroseno, dificultando así la transducción de señales de insulina ^[32]. Estudios realizados por Brownlee ^[33] mostraron que la IKK puede fosforilar directamente un residuo de serina en el sitio 307 del IRS, lo que resulta en la reducción de la fosforilación normal de tirosina del IRS, lo que dificulta la unión del InsR al IRS, causando así resistencia a la insulina.

[0021] Además de IKK, varios miembros de la familia MAPK también tienen un efecto en InsR e IRS. La JNK, las proteínas quinasa reguladas extracelularmente (ERK) y la proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK p38) son miembros de la familia MAPK, tienen actividades serina/treonina proteína quinasa y pueden activarse bajo las acciones

del estrés oxidativo, citoquinas, agonistas de receptores acoplados a proteínas G, etc. Múltiples estudios han demostrado que la activación de MAPK JNK, ERK y p38 agrava el grado de fosforilación de serina/treonina en InsR e IRS, y la capacidad de unión a proteínas entre InsR e IRS y la capacidad del IRS para activar moléculas de encadenamiento cadena abajo que contienen un dominio SH-2 se reducen ^[34,36].

5

[0022] El estrés oxidativo provocado por un estado diabético de glucosa elevada es una de las causas clave de la formación de diversas complicaciones crónicas, y también es un factor importante en la inducción de daños en el ADN ^[37]. En el caso de la diabetes mellitus, el fluido extracelular presenta continuamente un alto nivel de glucosa. En este estado, los electrones generados por la cadena de transporte de electrones mitocondrial aumentan notablemente, lo que da lugar a un exceso de ERO, causando daños en el entorno intracelular y en macromoléculas biológicas como los lípidos, las proteínas y el ADN. El oxígeno reactivo producido por el organismo en la vía metabólica aeróbica actúa como agente inductor de mutaciones al oxidar la guanina de la cadena de ADN a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Durante la replicación del ADN, la 8-OHdG es propensa al desajuste con la adenina, lo que da lugar a una mutación de transversión G:C a T:A que forma el daño del ADN. Además, las ERO pueden causar otras formas de daño en el ADN, que comprenden roturas de la cadena de ADN, mutaciones del sitio del ADN, aberraciones de la doble cadena del ADN, mutaciones de protooncogenes y genes de supresores tumorales, y similares. Además, el daño en el ADN también puede agravar los procesos de ROS y estrés oxidativo, por ejemplo, el daño en el ADN puede inducir la producción de ROS mediante la vía H2AX-reducción de la coenzima II oxidasa 1 (Nox1)/Rac1. Las ROS promueven además la entrada de una gran cantidad de Ca²⁺ en las mitocondrias, provocando necrosis y apoptosis celular, o dañando directamente las mitocondrias para causar disfunción mitocondrial, con lo que se deterioran las células β de los islotes pancreáticos y se agrava el proceso patológico de la diabetes mellitus ^[38].

10

15

20

25

30

[0023] Además de causar resistencia a la insulina, las ROS también tienen un efecto sobre la lesión de las células β de los islotes pancreáticos, y bajo estrés oxidativo, la expresión de los factores de transcripción del gen de la insulina y los sitios de unión a la insulina se reducen notablemente, afectando así la producción y secreción de insulina. Otras citoquinas como el TNF- α pueden también reducir la función de las células β ^[15]. La acción combinada de estas citoquinas causa un daño más notable a la función de las células pancreáticas de los islotes. Además, algunos factores inflamatorios también pueden actuar sobre la parte clave del sustrato 2 del receptor de insulina para fosforilar serina/treonina, lo que resulta en una degradación acelerada del sustrato 2 del receptor de insulina y promueve la apoptosis de las células pancreáticas de los islotes.

35

[0024] De lo anterior se desprende que el papel del estrés oxidativo en la aparición y el desarrollo de la diabetes mellitus es muy complicado. Además de deteriorar directamente las células β de los islotes, las ROS también pueden actuar como una molécula individual para activar algunas vías sensibles al estrés, regulando así la expresión de factores relacionados, causando apoptosis o necrosis de las células β , inhibiendo la secreción de insulina, induciendo resistencia a la insulina y causando o agravando ultimátamente la diabetes mellitus.

Tratamiento de la DM

40

[0025] La diabetes mellitus generalmente se trata con medicamentos, y los medicamentos tradicionales comprenden medicamentos a base de insulina y medicamentos hipoglucémicos orales.

45

[0026] En los primeros días, la insulina se extraía principalmente del páncreas de animales como cerdos y ganado, y después de la aplicación a seres humanos, notables alergias reacciones ocurridas. Con el aumento de la madurez en la década de 1990, se aplicaron gradualmente análogos de insulina, y dicha insulina puede cambiar notablemente la farmacocinética de la insulina tradicional, y tiene las ventajas de una baja incidencia de hipoglucemia, aparición rápida, efecto duradero, etc. Actualmente, con la profundización de la exploración de los preparados de insulina, algunos preparados de insulina oral han entrado en una etapa de prueba; sin embargo, debido a dificultades técnicas, todavía no se han aplicado clínicamente preparados orales eficaces.

50

55

60

65

[0027] Existen muchos fármacos hipoglucémicos orales tradicionales, entre los que son comunes los siguientes tipos: (1) biguanidas como metformina. La metformina tiene un buen efecto protector cardiovascular y también un buen efecto hipoglucémico, y se ha utilizado como fármaco de primera línea para tratar la DM2 en muchos países. (2) Sulfonilureas: las sulfonilureas son secretagogos de insulina que estimulan a las células pancreáticas de los islotes a secretar insulina, logrando así un efecto de mejora del nivel de glucosa en sangre. En la actualidad, las insulinas que se pueden comercializar en China comprenden principalmente glimepirida, glibenclamida, glipizida, gliclazida, gliquidona, etc.; sin embargo, algunos estudios han demostrado que, si se toman estos medicamentos durante mucho tiempo, puede causar un efecto hipoglucémico fallido, lo que fácilmente resulta en complicaciones como hipoglucemia y aumento de la masa corporal. (3) Compuestos de tiazolidindiona (TZD): En 1999, la FDA aprobó el uso de rosiglitazona y pioglitazona para T2DM, en donde la primera puede agravar el riesgo de enfermedades cardíacas y por esta razón, posteriormente se restringió su uso como medicamento de tratamiento de segunda línea y se prohibió su uso en afecciones de insuficiencia cardíaca. En junio de 2013, la FDA reexaminó la rosiglitazona, declaró que este medicamento puede continuar usándose clínicamente, e incluso relajó o prohibió completamente la prohibición del uso de este medicamento y sus preparaciones de compuestos. (4) inhibidores de la α -glucosidasa: Tales insulinas inhiben la glucosidasa en las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado, aliviando así la absorción de carbohidratos y conduciendo a una disminución en el nivel de

glucosa en sangre postprandial. Estos medicamentos comúnmente utilizados comprenden voglibosa, acarbosa, miglitol, etc.

5 **[0028]** En la etapa actual, los medicamentos para tratar la diabetes mellitus comprenden principalmente medicamentos antidiabéticos tradicionales, que comprenden sulfonilureas, glinidas, biguanidas, tiazolidinodionas (TZD), inhibidores de la α -glucosidasa, insulina, etc.; sin embargo, todos estos medicamentos tienen diferentes grados de reacciones adversas, como desencadenar hipoglucemia, molestias gastrointestinales y obesidad. Con la profundización del estudio sobre la teoría básica de la diabetes mellitus, las personas están buscando activamente nuevos objetivos terapéuticos para la diabetes mellitus con el fin de evitar los efectos secundarios de los fármacos hipoglucémicos tradicionales y proteger las células β de los islotes pancreáticos. Las dianas que actualmente se encuentran asociadas con la patogénesis de la diabetes mellitus comprenden principalmente el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), el cotransportador sodio-glucosa 2 (SGLT-2), la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), la proteína tirosina fosfatasa (PTP), la glucoquinasa (GK), etc. Entre ellos, los fármacos basados en la regulación del glucagón, como los análogos del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), los agonistas del receptor de GLP-1 y los inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), se consideran eficaces para mantener la homeostasis de la glucosa en sangre, mejorar las funciones de las células β , retrasar la progresión de la diabetes mellitus e incluso invertir el curso de la diabetes mellitus.

20 **[0029]** Actualmente, no existe ningún medicamento o medio eficaz para curar completamente la diabetes mellitus, y los medicamentos actuales se centran en reducir y retrasar la aparición de complicaciones mediante el control de la glucosa en sangre dentro de un cierto rango. Con una comprensión más profunda y completa de la patogénesis de la diabetes, el estudio de fármacos terapéuticos para la diabetes mellitus también se ha desplazado del estudio de fármacos con mecanismos tradicionales al estudio de fármacos con nuevas dianas y nuevos mecanismos de acción, en los que algunos de ellos ya han estado en el mercado, por ejemplo, los agonistas del receptor de GLP-1, los inhibidores de DPP-4 y los inhibidores de SGLT-2, y también hay algunos fármacos en fase de estudio clínico o preclínico, por ejemplo, los agonistas del receptor de GPR119, los inhibidores de 11 β -HSD1, los inhibidores de PTP1B y los agonistas de GK, con la eficacia y la seguridad aún por verificar clínicamente. Aunque la aparición de nuevos fármacos antidiabéticos basados en dianas en los últimos años ha proporcionado más opciones para el tratamiento de la DM, dado que la patogénesis de la diabetes mellitus es compleja y está implicada un gran número de hormonas, enzimas y receptores, todavía hay problemas, por ejemplo, fármacos unidiana que tienen un rango de acción estrecho, un efecto hipoglucémico débil y causan reacciones adversas después de actuar sobre el sistema sistémico, en el campo de la investigación de nuevos fármacos, y todos estos deben estudiarse más a fondo. Por lo tanto, las personas necesitan encontrar medicamentos terapéuticos más eficaces que puedan actuar sobre muchos aspectos de la patogénesis de la diabetes mellitus.

35 **[0030]** La presente invención descubre que el plasminógeno puede aliviar la lesión del tejido pancreático, controlar la inflamación, reducir la apoptosis de las células β de los islotes pancreáticos, emparejar de nuevo el tejido pancreático, restaurar la función de secreción de las células β de los islotes pancreáticos y reducir la glucosa en sangre en ratones experimentales diabéticos, y se espera que se convierta en un nuevo medicamento que aborde de manera integral muchos aspectos de la patogénesis de la diabetes mellitus. Esta invención se define en las reivindicaciones.

40 **Breve Descripción de la Invención**

[0031] La invención proporciona una posición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de plasminógeno para su uso en el tratamiento de la diabetes mediante la reducción de la glucosa en sangre en un sujeto diabético, en la que el plasminógeno:

- 45 (a) tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 2; o
(b) tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID No. 6, 8, 10 o 12, y todavía tiene la actividad del plasminógeno.

50 **[0032]** Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

[0033] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar la diabetes mellitus, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de plasminógeno a un sujeto.

55 **[0034]** La presente invención se refiere a un método para reducir la glucosa en sangre en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención se refiere además al uso de plasminógeno para reducir la glucosa en sangre en un sujeto diabético. La presente invención se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para reducir la glucosa en sangre en un sujeto diabético. Además, la presente invención se refiere además a un plasminógeno para reducir la glucosa en sangre en un sujeto diabético. En algunas realizaciones, la glucosa en sangre se selecciona de uno o más de: un nivel de glucosa en suero, un nivel de fructosamina en suero y un nivel de hemoglobina glucosilada en suero. En algunas otras realizaciones, la glucosa en sangre es un nivel de glucosa en suero. En las realizaciones mencionadas anteriormente, la diabetes mellitus es T1DM o T2DM.

60 **[0035]** En otro aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para mejorar la tolerancia a la glucosa en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al

sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para aumentar la tolerancia a la glucosa en un sujeto diabético. La presente invención se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para aumentar la tolerancia a la glucosa en un sujeto diabético. Además, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se refiere además a un plasminógeno para aumentar la tolerancia a la glucosa en un sujeto diabético. En algunas realizaciones, la diabetes mellitus es T2DM.

[0036] En un aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para promover la caída de glucosa en sangre después del marcado en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para promover la caída de glucosa en sangre postprandial en un sujeto diabético. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la caída de glucosa en sangre postprandial en un sujeto diabético. Además, la presente invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para promover la disminución de la glucosa en sangre postprandial en un sujeto diabético. En algunas realizaciones, el plasminógeno se administra de 30 minutos a 1,5 horas antes de que el sujeto coma. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno se administra de 30 minutos a 1 hora antes de que el sujeto coma.

[0037] En un aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para promover la utilización de glucosa en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para promover la utilización de glucosa en un sujeto diabético. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la utilización de glucosa en un sujeto diabético. Además, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para promover la utilización de glucosa en un sujeto diabético. En otro aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para promover la secreción de insulina en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. En otras realizaciones, el plasminógeno promueve aún más la expresión de insulina en un sujeto diabético. En las realizaciones mencionadas anteriormente, la diabetes mellitus es T1DM o T2DM. En algunas realizaciones, el plasminógeno promueve la secreción de insulina en el sujeto diabético después de comer. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno promueve la secreción de insulina en el sujeto diabético en ayunas. En algunas realizaciones, el plasminógeno devuelve la glucosa en sangre a un nivel normal o casi normal al promover la secreción de insulina en respuesta a una estimulación elevada de la glucosa en sangre en el sujeto diabético. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno reduce la expresión y/o secreción de glucagón en el sujeto mientras promueve la expresión y/o secreción de insulina; en particular, el plasminógeno logra un retorno a un nivel normal o casi normal de glucosa en sangre en el sujeto al reducir la expresión y/o secreción de glucagón en el sujeto mientras promueve la expresión y/o secreción de insulina.

[0038] En un aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para reducir la secreción de glucagón en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para reducir la secreción de glucagón en un sujeto diabético. La presente invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para reducir la secreción de glucagón en un sujeto diabético. Además, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para reducir la secreción de glucagón en un sujeto diabético. En algunas realizaciones, el plasminógeno reduce aún más la expresión de glucagón en el sujeto diabético. En las realizaciones mencionadas anteriormente, la diabetes mellitus es T1DM o T2DM. En algunas realizaciones, el plasminógeno reduce la secreción de glucagón en el sujeto diabético después de comer. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno reduce la secreción de glucagón en el sujeto diabético en ayunas. En algunas realizaciones, el plasminógeno devuelve la glucemia a un nivel normal o casi normal reduciendo la secreción de glucagón en el sujeto diabético en un estado de glucemia elevada. En algunas realizaciones, el plasminógeno devuelve la glucemia a un nivel normal o casi normal reduciendo la secreción de glucagón en el sujeto diabético en un estado de glucemia elevada. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión y/o secreción de insulina al tiempo que reduce la expresión y/o secreción de glucagón en el sujeto; en particular, el plasminógeno logra el retorno a un nivel normal o casi normal de glucemia en el sujeto promoviendo la expresión y/o secreción de insulina al tiempo que reduce la expresión y/o secreción de glucagón en el sujeto. En las realizaciones mencionadas, el plasminógeno promueve la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2).

[0039] En un aspecto, la presente divulgación (no reivindicada) se refiere a un método para promover la reparación de una lesión de las células de los islotes pancreáticos en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno para promover la reparación de una lesión celular de los islotes pancreáticos en un sujeto diabético. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la reparación de una lesión de las células de los islotes pancreáticos en un sujeto diabético. Además, la presente divulgación (no reivindicada) se refiere además a un plasminógeno para promover la reparación de una lesión celular de los islotes pancreáticos en un sujeto diabético. En algunas realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2). En algunas otras realizaciones de la divulgación, el plasminógeno promueve la expresión de la citocina TNF- α . En algunas otras realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B en el sujeto. En algunas realizaciones de la divulgación, la lesión de las células de los

islotos pancreáticos es una o más seleccionadas de: una función lesionada de síntesis y secreción de insulina de las células de los islotos pancreáticos, una estructura de tejido de los islotos pancreáticos lesionada, deposición de colágeno en el islote pancreático, fibrosis de los islotos pancreáticos, apoptosis de las células de los islotos pancreáticos, un equilibrio desordenado entre la secreción de glucagón y de insulina en el islote pancreático, y una adaptación fallida de los niveles de glucagón e insulina secretados por el islote pancreático a un nivel de glucosa en sangre en un sujeto. En algunas realizaciones, el plasminógeno reduce la secreción de glucagón y aumenta la secreción de insulina en el sujeto diabético; en particular, se repara el equilibrio normal entre la secreción de glucagón y de insulina en el islote pancreático.

5
10
15
20
25
[0040] En otro aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para proteger el islote pancreático de un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para proteger el islote pancreático de un sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para proteger el islote pancreático de un sujeto. Además, la presente invención como definida en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para proteger el islote pancreático de un sujeto. En algunas realizaciones, el plasminógeno reduce la deposición de colágeno en el islote pancreático. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno reduce la fibrosis de los islotos pancreáticos. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno reduce la apoptosis de las células de los islotos pancreáticos. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del sustrato receptor de insulina 2 (IRS-2) en el islote pancreático. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno promueve la reparación de una inflamación en el islote pancreático. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión de la citocina TNF- α . En algunas otras realizaciones, el minógeno plasmático promueve la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B en el sujeto. En las realizaciones mencionadas anteriormente, el sujeto es un paciente diabético; en particular, el paciente diabético tiene T1DM o T2DM. En algunas realizaciones, el sujeto con T1DM es un sujeto con actividad PLG normal o actividad PLG alterada.

30
35
40
[0041] En un aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para promover la reparación de una inflamación en el islote pancreático, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para promover la reparación de una inflamación en el islote pancreático de un sujeto diabético. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la reparación de una inflamación en el islote pancreático de un sujeto diabético. Además, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para promover la reparación de una inflamación en el islote pancreático de un sujeto diabético. En algunas realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión de la citocina TNF- α . En algunas otras realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B en el sujeto. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno reduce la deposición de colágeno en el islote pancreático. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno reduce la fibrosis de los islotos pancreáticos. En algunas otras realizaciones, el plasminógeno inhibe la apoptosis de las células de los islotos pancreáticos. En las realizaciones mencionadas anteriormente, el paciente diabético tiene T1DM o T2DM; en particular, el sujeto con T1DM es un sujeto con actividad PLG normal o actividad PLG alterada.

45
50
55
[0042] En un aspecto, la presente divulgación (no reivindicada) se refiere a un método para promover la expresión de la citocina TNF- α en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno para promover la expresión de la citocina TNF- α en un sujeto diabético. El presente cierre (no reivindicado) se refiere además al uso del plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la expresión de la citocina TNF- α en un sujeto diabético. Además, la presente divulgación (no reivindicada) además se refiere a un plasminógeno para promover la expresión de la citoquina TNF- α en un sujeto diabético.

60
65
[0043] En otro aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B en un sujeto diabético. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B en un sujeto diabético.

[0044] En otro aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para promover la expresión del sustrato receptor de insulina 2 (IRS-2) por el islote pancreático, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para promover la expresión del sustrato receptor de insulina 2 (IRS-2) en el islote pancreático. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) en el islote pancreático. Además, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para promover la expresión del sustrato receptor de insulina 2 (IRS-2) en el islote pancreático.

5 **[0045]** En otro aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para promover la secreción de insulina en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto para promover la expresión del sustrato receptor de insulina 2 (IRS-2). La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para promover la secreción de insulina en un sujeto diabético. La presente invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la secreción de insulina en un sujeto diabético. Además, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para promover la secreción de insulina en un sujeto diabético.

10 **[0046]** En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para promover un aumento en el número de células de los islotes pancreáticos β en un sujeto diabético, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno al sujeto. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno para promover un aumento en el número de células β de los islotes pancreáticos en un sujeto diabético. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover un aumento en el número de células de los islotes pancreáticos β en un sujeto diabético. Además, la presente divulgación (no reivindicada) se refiere además a un plasminógeno para promover un aumento del número de células β de los islotes pancreáticos en un sujeto diabético. En algunas realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2).

20 **[0047]** En un aspecto, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para reducir la apoptosis de las células β de los islotes pancreáticos, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno a un sujeto. La presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno para reducir la apoptosis de las células β de los islotes pancreáticos. La presente invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para reducir la apoptosis de las células β de los islotes pancreáticos. Además, la presente invención como se define en las reivindicaciones se refiere además a un plasminógeno para reducir la apoptosis de las células β de los islotes pancreáticos. En algunas realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2).

30 **[0048]** En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para promover la reparación de una lesión de las células β de los islotes pancreáticos, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno a un sujeto. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno para promover la reparación de una lesión de células β de islote pancreático. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la reparación de una lesión de células β de islote pancreático. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además a un plasminógeno para promover la reparación de una lesión celular de los islotes pancreáticos. En algunas realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2).

40 **[0049]** En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para promover la recuperación de la función de las células β de los islotes pancreáticos, que comprende administrar una cantidad eficaz de plasminógeno a un sujeto. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno para promover la recuperación de la función de las células β de los islotes pancreáticos. La presente divulgación (no reivindicada) se refiere además al uso de plasminógeno en la preparación de un medicamento para promover la recuperación de la función de las células β de los islotes pancreáticos. Además, la presente divulgación (no reivindicada) se refiere además a un plasminógeno para promover la recuperación de la función de las células β de los islotes pancreáticos. En algunas realizaciones, el plasminógeno promueve la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2).

50 **[0050]** En las realizaciones mencionadas anteriormente, el plasminógeno se administra en combinación con uno o más fármacos o terapias diferentes. En particular, el gen del plasmino puede administrarse en combinación con uno o más fármacos seleccionados entre fármacos antidiabéticos, fármacos contra enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, fármacos antitrombóticos, fármacos antihipertensivos, fármacos antilipémicos, fármacos anticoagulantes y fármacos antiinfecciosos.

55 **[0051]** En las realizaciones mencionadas anteriormente, el plasminógeno tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 2; o tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 6, 8, 10 o 12, y todavía tiene la actividad del plasminógeno.

60 **[0052]** En las realizaciones mencionadas anteriormente, los aminoácidos del plasminógeno son como se muestran en las SEQ ID No. 2, 6, 8, 10 o 12. En algunas realizaciones, el plasminógeno es una proteína que tiene 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-45, 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácido añadido, eliminado y/o sustituido en SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 o 12, y todavía tiene la actividad del plasminógeno.

65 **[0053]** En las realizaciones mencionadas anteriormente, el plasminógeno se selecciona de Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, miniplasminógeno, microplasminógeno, delta-plasminógeno o sus variantes que conservan la actividad plasmínogena.

5 **[0054]** En las realizaciones mencionadas anteriormente, el plasminógeno es un plasminógeno humano natural o sintético, o una variante o fragmento del mismo que aún conserva la actividad plasminógena. En algunas realizaciones, el plasminógeno es un ortólogo del plasminógeno humano de un primate o un roedor, o una variante o fragmento del mismo que aún conserva la actividad plasminógena. Por ejemplo, el plasminógeno es un ortólogo del plasminógeno de primates o roedores, por ejemplo, un ortólogo del plasminógeno de gorilas, monos rhesus, murinos, vacas, caballos y perros. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del plasminógeno de la presente invención es como se muestra en SEQ ID NO: 2, 6, 8, 10 o 12.

10 **[0055]** En las realizaciones mencionadas anteriormente, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una falta o deficiencia de plasminógeno. Específicamente, la carencia o deficiencia es congénita, secundaria y/o local.

15 **[0056]** En una realización, el plasminógeno se administra por vía sistémica o tópica, preferiblemente por las siguientes vías: tópica, intravenosa, intramuscular, subcutánea, inhalación, intraespinal, inyección local, inyección intraarticular o vía rectal. En una realización, la administración tópica se realiza por administración directa en áreas osteoporóticas, por ejemplo, a través de un medio como un apósito y un catéter.

20 **[0057]** En una realización, el plasminógeno se administra en combinación con un vehículo o estabilizador polipeptídico adecuado. En una realización, el plasminógeno se administra a una dosificación de 0,0001-2000 mg/kg, 0,001-800 mg/kg, 0,01-600 mg/kg, 0,1-400 mg/kg, 1-200 mg/kg, 1-100 mg/kg o 10-100 mg/kg (por kg de peso corporal) o 0,0001-2000 mg/cm², 0,001-800 mg/cm², 0,01-600 mg/cm², 0,1-400 mg/cm², 1-200 mg/cm², 1-100 mg/cm² o 10-100 mg/cm² (por centímetro cuadrado de superficie corporal) diariamente, preferiblemente la dosificación se repite al menos una vez, preferiblemente la dosificación se administra al menos diariamente. En el caso de la administración local, las dosificaciones anteriores también pueden ajustarse según las circunstancias. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el plasminógeno para su uso en el método de la presente invención.

25 **[0058]** En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un kit preventivo o terapéutico que comprende: (i) el plasminógeno para su uso en el método de la presente invención, y (ii) un medio para administrar el plasminógeno al sujeto, en particular, el medio es una jeringa o un vial. En algunas realizaciones, el kit comprende además una etiqueta o unas instrucciones de uso que indican la administración del plasminógeno al sujeto para poner en práctica los métodos de la presente invención.

30 **[0059]** En otro aspecto, la presente divulgación se refiere además a un artículo de fabricación que comprende: un recipiente que comprende una etiqueta; y (i) el plasminógeno para su uso en los métodos de la presente invención o una composición farmacéutica que comprende el plasminógeno, en donde la etiqueta indica la administración del plasminógeno o la composición al sujeto para implementar los métodos de la presente invención.

35 **[0060]** En las realizaciones mencionadas anteriormente, el kit o el artículo de fabricación comprende además uno o más medios o recipientes adicionales que contienen otros medicamentos. En algunas realizaciones, los otros fármacos se seleccionan del grupo de fármacos antidiabéticos, fármacos contra enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, fármacos antitrombóticos, fármacos antihipertensivos, fármacos antihipérmicos, fármacos anticoagulantes y fármacos antiinfecciosos.

45 **Descripción Detallada de las Realizaciones**

50 **[0061]** La "diabetes mellitus" es una serie de síndromes dismetabólicos de carbohidratos, proteínas, grasas, agua, electrolitos y similares que son causados por la hipofunción de los islotes, resistencia a la insulina y similares como resultado de los efectos de factores genéticos, disfunción inmune, infecciones microbianas y toxinas de los mismos, toxinas de radicales libres, factores mentales y otros diversos factores patógenos en el cuerpo, y se caracteriza principalmente por hiperglucemia clínicamente.

55 **[0062]** Las "complicaciones diabéticas" son daños o disfunciones de otros órganos o tejidos del cuerpo causadas por un mal control de la glucosa en sangre durante la diabetes mellitus, incluidos daños o disfunciones del hígado, los riñones, el corazón, la retina, el sistema nervioso y similares. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, hay hasta 100 complicaciones diabéticas, y la diabetes mellitus es una enfermedad que actualmente se sabe que tiene más complicaciones.

60 **[0063]** "Resistencia a la insulina" se refiere a una disminución en la eficiencia de la insulina en la promoción de la captación y utilización de glucosa por varias razones, lo que resulta en la secreción compensatoria de exceso de insulina en el cuerpo, lo que causa hiperinsulinemia para mantener la estabilidad de la glucosa en sangre.

65 **[0064]** "Plasmina" es una enzima muy importante que existe en la sangre y es capaz de degradar los multímeros de fibrina.

5 [0065] "Plasminógeno (plg)" es la forma zimógena de la plasmina, que es una glicoproteína compuesta por 810 aminoácidos calculada en base a la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 4) del plasminógeno humano natural que contiene un péptido señal según la secuencia en el prot suizo, que tiene un peso molecular de aproximadamente 90 kD, que se sintetiza principalmente en el hígado y que es capaz de circular en la sangre, con la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID No. ID No. 3. PLG de longitud completa contiene siete dominios: un dominio de serina proteasa C-terminal, un dominio Panapple (PAP) N-terminal y cinco dominios Kringle (Kringles 1-5). En referencia a la secuencia en el prot suizo, el péptido señal comprende los residuos Met1-Gly19, PAP comprende los residuos Glu20-Val98, Kringle 1 comprende los residuos Cys103-Cys181, Kringle 2 comprende los residuos Glu184-Cys262, Kringle 3 comprende los residuos Cys275-Cys352, Kringle 4 comprende los residuos Cys377-Cys454, y Kringle 5 comprende los residuos Cys481-Cys560. Según los datos del NCBI, el dominio serina proteasa comprende los residuos Val581-Arg804.

15 [0066] Glu-plasminógeno es un minógeno plasmático natural de longitud completa y está compuesto por 791 aminoácidos (sin un péptido señal de 19 aminoácidos); la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia es como se muestra en la SEQ ID No. 1; y la secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID No. In vivo, Lys-plasminógeno, que se forma por hidrólisis de aminoácidos en las posiciones 76-77 del gen Glu-plasmino-, también está presente, como se muestra en SEQ ID No.6; y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es como se muestra en SEQ ID No.5. δ-plasminógeno es un fragmento de plasminógeno de longitud completa que carece de la estructura de Kringle 2-Kringle 5 y contiene solo Kringle 1 y el dominio de serina proteasa ^[39, 40]. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID No.8) del plasminógeno δ ha sido reportada en la literatura ^[40], y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es como se muestra en SEQ ID No.7. El miniplasminógeno está compuesto por Kringle 5 y el dominio serina proteasa, y se ha informado en la literatura que comprende los residuos Val443-Asn791 (con el residuo Glu de la secuencia Glu-plg que no contiene un péptido señal como aminoácido de partida) [41]; la secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID No. 10; y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID No. 9. Además, el microplasminógeno comprende solo el dominio de serina proteasa, cuya secuencia de aminoácidos se ha informado en la literatura que comprende los residuos Ala543-Asn791 (con el residuo Glu de la secuencia Glu-plg que no contiene un péptido de señal como aminoácido de partida) [42], y cuya secuencia también se ha informado en la patente CN 102154253 A que comprende los residuos Lys531-Asn791 (con el residuo Glu de la secuencia Glu-plg que no contiene un péptido señal como aminoácido de partida) (la secuencia en esta solicitud de patente se refiere a la patente CN 102154253 A); la secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID No. 12; y la secuencia de ADNc que codifica esta secuencia de aminoácidos es como se muestra en la SEQ ID No. 11.

35 [0067] En la presente descripción, "plasmina" se usa indistintamente con "fibrinolisisina" y "fibrinoclasa", y los términos tienen el mismo significado; y "plasminógeno" se usa indistintamente con "profibrinolisisina" y "zimógeno de fibrinoclasa", y los términos tienen el mismo significado.

40 [0068] En la presente solicitud, el significado de "falta" de plasminógeno es que el contenido o actividad de plasminógeno en el cuerpo de un sujeto es menor que el de una persona normal, que es lo suficientemente baja como para afectar la función fisiológica normal del sujeto; y el significado de "deficiencia" en el plasminógeno es que el contenido o actividad del plasminógeno en el cuerpo de un sujeto es significativamente menor que el de una persona normal, o incluso la actividad o expresión es extremadamente pequeña, y solo a través del suministro exógeno puede mantenerse la función fisiológica normal.

45 [0069] En la presente solicitud, el significado de "falta" de plasminógeno es que el contenido de plasminógeno en el cuerpo de un sujeto es menor que el de una persona normal, que es lo suficientemente bajo como para afectar la función fisiológica normal del sujeto; y el significado de "deficiencia" de plasminógeno es que el contenido de plasminógeno en el cuerpo de un sujeto es significativamente menor que el de una persona normal, o incluso la expresión es extremadamente pequeña, y solo a través del suministro exógeno puede mantenerse la vida.

50 [0070] En las realizaciones de la presente invención, "envejecimiento" y "envejecimiento prematuro" se usan indistintamente para significar el mismo significado.

55 [0071] En el curso de la circulación, el plasminógeno se encuentra en una conformación cerrada e inactiva, pero cuando se une a trombos o superficies celulares, se convierte en una PLM activa en una conformación abierta bajo la mediación de un activador PLG (activador del plasminógeno, PA). La PLM activa puede hidrolizar los coágulos de fibrina a productos de degradación de fibrina y dímeros D, disolviendo así los trombos. El dominio PAP de PLG comprende un determinante importante que mantiene el plasminógeno en una conformación cerrada e inactiva, y el dominio KR es capaz de unirse a residuos de lisina presentes en receptores y sustratos. Se conocen una variedad de enzimas que pueden servir como activadores de PLG, incluyendo: activador de plasminógeno tisular (tPA), activador de plasminógeno de uroquinasa (uPA), calicreína, factor de coagulación XII (factor de Hagmann) y similares.

60 [0072] "Fragmento activo de plasminógeno" se refiere a un fragmento activo en la proteína plasminógena que es capaz de unirse a una secuencia diana en un sustrato y ejercer la función proteolítica. Las soluciones técnicas de la presente divulgación que implican plasminógeno abarcan soluciones técnicas en las que el plasminógeno se reemplaza con un fragmento activo de plasminógeno. El fragmento activo de plasminógeno es una proteína que comprende una serina

5 proteasa principal del plasminógeno. Preferiblemente, el fragmento activo de plasminógeno comprende la SEQ ID No. 14, o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID No. Por lo tanto, el plasminógeno de la presente invención comprende una proteína que contiene el fragmento activo del plasminógeno y que todavía tiene la actividad plasminógena. El fragmento activo de plasminógeno de la presente invención es como se define en las reivindicaciones.

10 **[0073]** En la actualidad, los métodos para determinar el plasminógeno y su actividad en sangre incluyen: detección de la actividad activadora del plasminógeno tisular (t-PAA), detección del antígeno activador del plasminógeno tisular (t-PAAg) en plasma, detección de la actividad del plasminógeno tisular (plgA) en plasma, detección del antígeno plasminógeno tisular (plgAg) en plasma, detección de la actividad del inhibidor de los activadores plasminógenos tisulares en plasma, detección de antígenos inhibidores de los activadores plasminógenos tisulares en plasma y detección del complejo plasmina-antiplasmina (PAP) en plasma. El método de detección más utilizado es el método del sustrato cromogénico: la estreptoquinasa (SK) y un sustrato cromogénico se añaden a un plasma de prueba, el PLG en el plasma de prueba se convierte en PLM por la acción de SK, PLM actúa sobre el sustrato cromogénico, y luego se determina que el aumento de absorbancia es directamente proporcional a la actividad del plasminógeno utilizando un espectrofotómetro. Además, la actividad plasminógena en sangre también puede determinarse mediante inmunoquímica, electroforesis en gel, inmunonefelometría, radioinmunodifusión y similares.

20 **[0074]** "Ortólogos u ortólogos" se refieren a homólogos entre diferentes especies, incluyendo tanto homólogos de proteínas como homólogos de ADN, y también se conocen como homólogos ortólogos y homólogos verticales. El término se refiere específicamente a proteínas o genes que han evolucionado a partir del mismo gen ancestral en diferentes especies. El plasminógeno de acuerdo con la presente invención incluye plasminógeno natural humano, y también incluye ortólogos u ortólogos de plasminógenos derivados de diferentes especies y que tienen actividad plasminógena en la medida en que esté cubierto por la definición de plasminógeno en las reivindicaciones.

25 **[0075]** "Variante sustituida conservadoramente" se refiere a aquella en la que un residuo de aminoácido dado se cambia sin alterar la conformación y función general de la proteína o enzima, incluyendo, pero no limitado a, reemplazar un aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental por un aminoácido con propiedades similares (como acidez, alcalinidad, hidrofobicidad, etc.). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos básicos hidrófilos y son intercambiables. Del mismo modo, la isoleucina es un aminoácido hidrófobo que puede ser reemplazado por leucina, metio-9 o valina. Por lo tanto, la similitud de dos proteínas o secuencias de aminoácidos con funciones similares puede ser diferente. Por ejemplo, la similitud (identidad) es 70%-99% basado en el algoritmo MEGALIGN. "Variante sustituida conservativamente" también incluye un polipéptido o enzima que tiene una identidad de aminoácidos del 60% o más, preferentemente del 75% o más, más preferentemente del 85% o más, incluso más preferentemente del 90% o más según lo determinado por el algoritmo BLAST o FASTA, y que tiene las mismas propiedades o funciones o sustancialmente similares que la proteína o enzima natural o parental.

35 **[0076]** El plasminógeno "aislado" se refiere a la proteína plasminogénica que se aísla y/o recupera de su medio natural. En algunas realizaciones, el plasminógeno se purificará (1) hasta una pureza superior al 90%, superior al 95% o superior al 98% (en peso), determinada por el método Lowry, como por ejemplo superior al 99% (en peso); (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna utilizando un secuenciador de vaso giratorio; o (3) hasta la homogeneidad, que se determina mediante electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o tinción de plata. El plasminógeno aislado también incluye el plasminógeno preparado a partir de células recombinantes mediante técnicas de bioingeniería y separado mediante al menos un paso de purificación.

40 **[0077]** Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a formas poliméricas de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden incluir aminoácidos codificados genéticamente y no codificados genéticamente, aminoácidos modificados o derivatizados química o bioquímicamente y polipéptidos que tienen esqueletos peptídicos modificados. El término incluye proteínas de fusión, incluyendo, pero sin limitación, proteínas de fusión que tienen secuencias de aminoácidos heterólogas, fusiones que tienen secuencias líder heterólogas y homólogas (con o sin residuos de metionina N-terminales); y similares.

45 **[0078]** El "porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos (%)" con respecto a la secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia cuando se introduce un hueco según sea necesario para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia y no se consideran sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La comparación para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras con los expertos en la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles públicamente, como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la máxima comparación en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente invención, el valor de identidad de secuencia de aminoácidos porcentual se genera usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2.

50
55
60
65

[0079] En el caso de comparar secuencias de aminoácidos usando ALIGN-2, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada en relación con una secuencia de aminoácidos B dada (o puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o contiene un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos en relación con, con o para una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera:

$$\text{fracción } X/Y \times 100$$

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

[0080] Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento" y "prevención" se refieren a la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser la prevención total o parcial de una enfermedad o sus síntomas y/o la curación parcial o completa de la enfermedad y/o sus síntomas, e incluye: a) la prevención del desarrollo de la enfermedad en un sujeto que puede tener una predisposición a la enfermedad pero que no ha sido diagnosticado como portador de la enfermedad; b) la supresión de la enfermedad, es decir, el bloqueo de su formación; y c) el alivio de la enfermedad y/o sus síntomas, es decir, la eliminación de la enfermedad y/o sus síntomas.

[0081] Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a mamíferos, incluidos, entre otros, murinos (ratas y ratones), primates no humanos, seres humanos, perros, gatos, animales con pezuñas (por ejemplo, caballos, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras), etc.

[0082] "Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de plasminógeno suficiente para lograr la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad cuando se administra a un mamífero u otro sujeto para tratar la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará según el plasminógeno utilizado, la gravedad de la enfermedad y/o sus síntomas, así como la edad, el peso corporal del sujeto a tratar y similares.

2. Preparación del plasminógeno de la presente invención

[0083] El plasminógeno puede aislarse y purificarse de la naturaleza para usos terapéuticos adicionales, y también puede sintetizarse mediante técnicas estándar de síntesis química de péptidos. Cuando se sintetiza químicamente, un polipéptido puede someterse a síntesis en fase líquida o sólida. La síntesis de polipéptidos en fase sólida (SPPS) es un método adecuado para la síntesis química de plasminógeno, en el que el aminoácido C-terminal de una secuencia se une a un soporte insoluble, seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Varias formas de SPPS, como Fmoc y Boc, se pueden utilizar para sintetizar plasminógeno. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany and Solid-Phase Peptide Synthesis; págs. 3-284 en The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963); Stewart et al. Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984); y Ganesan A. 2006 Mini Rev. Med Chem. 6:3-10 and Camarero JA et al. 2005 Protein Pept Lett. 12:723-8. Brevemente, las pequeñas perlas porosas insolubles se tratan con una unidad funcional sobre la cual se construye una cadena peptídica. Después de ciclos repetidos de acoplamiento/desprotección, la amina N-terminal libre de fase sólida unida se acopla a una sola unidad de aminoácido N-protégido. Esta unidad es entonces desprotegida para exponer una nueva amina N-terminal que puede unirse a otro aminoácido. El péptido permanece inmovilizado en la fase sólida antes de ser cortado.

[0084] Los métodos recombinantes estándar pueden usarse para producir el plasminógeno de la presente invención. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica plasminógeno se inserta en un vector de expresión, de modo que se une operativamente a una secuencia reguladora en el vector de expresión. La secuencia reguladora de la expresión incluye, pero no se limita a, promotores (por ejemplo, promotores asociados naturalmente o heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. La regulación de la expresión puede ser un sistema promotor eucariota en un vector que es capaz de transformar o transfectar células huésped eucariotas (por ejemplo, células COS o CHO). Una vez que el vector se incorpora en un huésped adecuado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para la expresión de alto nivel de la secuencia de nucleótidos y la recolección y purificación del plasmígeno.

[0085] Un vector de expresión adecuado generalmente se replica en un organismo huésped como episoma o como parte integral del ADN cromosómico del huésped. En general, un vector de expresión contiene un marcador selectivo (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina, resistencia a kanamicina o resistencia a neomicina) para facilitar la detección de aquellas células exógenas transformadas con una secuencia de ADN deseada.

[0086] *Escherichia coli* es un ejemplo de células huésped procariontas que pueden usarse para clonar un polinucleótido que codifica el anticuerpo sujeto. Otros huéspedes microbianos adecuados para su uso incluyen *Bacillus*, por ejemplo,

Bacillus subtilis y otras especies de enterobacterias (como *Salmonella spp.* y *Serratia spp.*), y varias especies de *Pseudomonas spp.* En estos huéspedes procariotas, también se pueden generar vectores de expresión que normalmente contendrán una secuencia de control de la expresión (por ejemplo, origen de replicación) que es compatible con la célula huésped. Además, habrá muchos promotores conocidos, como el sistema promotor de lactosa, el sistema promotor de triptófano (*trp*), el sistema promotor de beta-lactamasa o el sistema promotor del fago lambda. Opcionalmente, en el caso de la manipulación de una secuencia génica, un promotor normalmente controlará la expresión, y tiene una secuencia de sitio de unión al ribosoma y similares para iniciar y completar la transcripción y traducción.

[0087] Otros microorganismos, como la levadura, también se pueden utilizar para la expresión. *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*) y *Pichia* son ejemplos de células huésped de levadura adecuadas, en las que un vector adecuado tiene una secuencia de control de la expresión (por ejemplo, promotor), un origen de replicación, una secuencia de terminación y similares, según se requiera. Un promotor típico comprende 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen específicamente promotores derivados de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

[0088] Además de microorganismos, las células de mamífero (por ejemplo, células de mamífero cultivadas en cultivo celular *in vitro*) también puede usarse para expresar el plasminógeno de la presente invención. Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, Nueva York, Nueva York. (1987). Las células huésped de mamífero adecuadas incluyen líneas celulares CHO, varias líneas celulares Cos, células HeLa, líneas celulares de mieloma y células B transformadas o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden comprender una secuencia de control de la expresión, tal como un origen de replicación, promotor y potenciador (Queen et al. Immunol. Rev. 89:49 (1986)), así como sitios de información de procesamiento necesarios, tales como un sitio de unión a ribosomas, sitio de corte y empalme de ARN, sitio de poliadenilación y secuencia terminadora de la transcripción. Ejemplos de secuencias de control de la expresión adecuadas son promotores derivados del gen de inmunoglobulina blanca, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co et al. J. Immunol. 148:1149 (1992).

[0089] Una vez sintetizado (química o recombinantemente), el plasminógeno de la presente invención puede purificarse de acuerdo con procedimientos estándar en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columna de afinidad, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis en gel y similares. El plasminógeno es sustancialmente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 80% a 85% puro, al menos aproximadamente 85% a 90% puro, al menos aproximadamente 90% a 95% puro, o 98% a 99% puro o más puro, por ejemplo, libre de contaminantes tales como residuos celulares, macromoléculas distintas del anticuerpo sujeto y similares.

3. Formulaciones farmacéuticas

[0090] Una formulación terapéutica puede prepararse mezclando plasminógeno de una pureza deseada con un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéutico opcional (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A. ed. (1980)) para formar una preparación liofilizada o una solución acuosa. Los portadores, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para el receptor en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, como fosfatos, citratos y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluidos el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (por ejemplo, cloruro de octadecil dimetil bencil amonio; cloruro de hexano diamina; cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio; fenol, butanol o alcohol bencilico; p-hidroxibenzoatos de alquilo, como el p-hidroxibenzoato de metilo o de propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de unos 10 residuos); proteínas, como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, como la glicina, la glutamina, la asparagina, la histidina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, como la glucosa, la manosa o las dextrinas; agentes quelantes, como el EDTA; azúcares, como la sacarosa, el manitol, la fucosa o el sorbitol; counteriones formadores de sal, como el sodio; complejos metálicos (e. g., complejos zinc-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones preferidas de anticuerpos liofilizados anti-VEGF se describen en el documento WO 97/04801.

[0091] Las formulaciones de la invención también pueden comprender uno o más compuestos activos necesarios para el estado particular a tratar, preferiblemente aquellos que son complementarios en actividad y no tienen efectos secundarios entre sí, por ejemplo, fármacos antihipertensivos, fármacos antiarrítmicos, fármacos para tratar la diabetes mellitus y similares.

[0092] El plasminógeno de la presente invención puede encapsularse en microcápsulas preparadas mediante técnicas tales como coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, puede incorporarse en un sistema de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o incorporarse en hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gel y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo) en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0093] El plasminógeno de la presente invención para administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se puede lograr fácilmente por filtración a través de una membrana de filtración estéril antes o después de la liofilización y reconstitución.

[0094] El plasminógeno de la presente invención se puede preparar en una preparación de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables poliméricas hidrófobas sólidas que tienen una forma y contienen glucoproteínas, como películas o microcápsulas. Algunos ejemplos de matrices de liberación sostenida son los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato)) (Langer et al. J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981); and Langer, Chem. Tech., 12:98-105 (1982)), o poli(alcohol vinílico), polilactidos (Patente estadounidense 3773919, y EP 58.481), copolímero de ácido L-glutámico y ácido γ -etil-L-glutámico (Sidman et al. Biopolymers 22:547(1983)), acetato de etileno-vinilo no degradable (Langer et al. supra), o copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como Lupron DepotTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli D-(-)-3-hidroxi-butírico. Los polímeros, como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico, son capaces de liberar moléculas persistentemente durante 100 días o más, mientras que algunos hidrogeles liberan proteínas durante un período de tiempo más corto. Se puede diseñar una estrategia racional para la estabilización de proteínas basada en los mecanismos pertinentes. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilidad se logra modificando residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

4. Administración y dosis

[0095] La composición farmacéutica de la presente invención se administra de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intracraneal, intratecal, intraarterial (por ejemplo, a través de la carótida), intramuscular, intranasal, tópica o intradérmica o parto de médula espinal o cerebro. Una preparación en aerosol, como una preparación en aerosol nasal, comprende soluciones acuosas purificadas u otras soluciones del agente activo junto con un conservante y un agente isotónico. Dichos preparados se ajustan a un pH y estado isotónico compatibles con la mucosa nasal.

[0096] En algunos casos, la composición farmacéutica de plasminógeno de la presente invención puede modificarse o formularse de tal manera que proporcione su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.

[0097] Los preparados para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua y soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluida la solución salina y los medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen suplementos líquidos y nutrientes, suplementos electrolíticos y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

[0098] En algunas realizaciones, el plasminógeno de la invención se formula con un agente que promueve que el plasminógeno cruce la barrera hematoencefálica. En algunos casos, el plasminógeno de la presente invención se fusiona directamente o a través de un conector a una molécula portadora, péptido o proteína que promueve la fusión para cruzar la barrera hematoencefálica. En algunas realizaciones, el plasminógeno de la presente invención se fusiona a un polipéptido que se une a un receptor endógeno de barrera hematoencefálica (BHE). El polipéptido que está unido al plasminógeno y se une a un receptor endógeno de la BHE promueve la fusión para cruzar la BHE. Los polipéptidos adecuados que se unen a receptores endógenos de BHE incluyen anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a receptores endógenos de BHE. Los receptores de BHE endógenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, receptores de insulina. En algunos casos, los anticuerpos están encapsulados en liposomas. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º 2009/0156498.

[0099] El personal médico determinará el régimen posológico en función de diversos factores clínicos. Como es bien sabido en el campo médico, la dosificación de cualquier paciente depende de una variedad de factores, incluyendo el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el compuesto específico a administrar, el sexo, la frecuencia y la vía de administración, sobre toda la salud y otros fármacos administrados simultáneamente. El intervalo de dosificación de la composición farmacéutica que comprende plasminógeno de la presente invención puede ser, por ejemplo, tal como aproximadamente 0,0001 a 2000 mg/kg, o aproximadamente 0,001 a 500 mg/kg (tal como 0,02 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,75 mg/kg, 10 mg/kg y 50 mg/kg) del peso corporal del sujeto diariamente. Por ejemplo, la edad de dosificación puede ser de 1 mg/kg de peso corporal o 50 mg/kg de peso corporal, o en el intervalo de 1 mg/kg-50 mg/kg, o al menos 1 mg/kg. También se contemplan dosis por encima o por debajo de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores anteriores. Las dosificaciones intermedias en el intervalo anterior también están incluidas en el alcance de la presente invención. Un sujeto puede ser administrado con dichas dosis diariamente, en días alternos, semanalmente o con base en cualquier otro esquema determinado por análisis empírico. Un programa de dosificación ejemplar incluye 1-10 mg/kg durante días consecutivos. La administración duradera del fármaco de la presente invención, el efecto terapéutico y la seguridad de la trombosis y una enfermedad relacionada con la trombosis deben evaluarse en tiempo real y regularmente.

5. Eficacia del tratamiento y seguridad del tratamiento

[0100] Se puede evaluar la eficacia del tratamiento y la seguridad del tratamiento después de tratar a un sujeto con plasminógeno. Los contenidos comunes de seguimiento y evaluación del efecto terapéutico de la osteoporosis comprenden una encuesta de bajo aumento (reacciones adversas, medicamentos estandarizados, medidas básicas, reevaluación de los factores de riesgo de fractura, etc.), una nueva evaluación de fracturas (fractura clínica, reducción de la altura corporal y examen imagineológico), medición de la densidad mineral ósea (DMO) y detección de marcadores de recambio óseo (BTM), una reevaluación exhaustiva basada en estos datos, etc. Entre ellos, la DMO es actualmente el método más utilizado para monitorear y evaluar el efecto terapéutico. Por ejemplo, la DMO puede medirse por medio de absorciometría de rayos X de energía dual (DXA), tomografía computarizada cuantitativa (QCT), medición de absorción de un solo fotón (SPA) o ultrasonometría. La DMO puede detectarse una vez al año después del inicio del tratamiento, y después de que la DMO se haya estabilizado, el intervalo puede extenderse adecuadamente, por ejemplo, a una vez cada 2 años. Para BTM, entre los indicadores serológicos, el propéptido N-terminal (PINT) del procolágeno sérico tipo 1 se utiliza con relativa frecuencia en la actualidad como indicador de la formación ósea, y el péptido C-terminal del procolágeno sérico tipo 1 (telopéptido C-terminal sérico, S-CTX) sirve como indicador de la resorción ósea. En función de los avances de la investigación, se ajustan, en su caso, indicadores de detección más razonables. Los valores basales deben medirse antes del inicio del tratamiento, y las detecciones se realizan 3 meses después de la aplicación de una terapia farmacológica promotora de la formación, y de 3 a 6 meses después de la aplicación de una terapia farmacológica inhibidora de la resorción. La BTM puede proporcionar información dinámica de los huesos, es independiente de la BMD en efecto y función, y también es un medio de monitoreo complementario a la BMD. La combinación de ambos tiene un mayor valor clínico. En general, si la DMO aumenta o se estabiliza después del tratamiento, la DMO tiene un cambio esperado y no se produce fractura durante el tratamiento, la respuesta al tratamiento puede considerarse buena. Además, la sentencia de la seguridad del régimen terapéutico durante y después del tratamiento de un sujeto con plasminógeno y sus variantes incluye, pero no se limita a, estadísticas de la semivida sérica, la semivida del tratamiento, la mediana de la dosis tóxica (TD50) y la mediana de la dosis letal (DL50) del fármaco en el cuerpo del sujeto, o la observación de diversos acontecimientos adversos como la sensibilización que se produce durante o después del tratamiento.

6. Artículos de fabricación o kits

[0101] Un artículo manufacturado o un kit puede comprender el plasminógeno de la presente invención. El artículo incluye preferiblemente un envase, etiqueta o prospecto. Los recipientes adecuados incluyen botellas, viales, jeringas y similares. El contenedor puede estar hecho de varios materiales, como vidrio o plástico. El envase contiene una posición que es eficaz para tratar la enfermedad o afección de la presente invención y tiene un acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que contiene un tapón que puede ser perforado por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es el plasminógeno. La etiqueta en o unida al envase indica que la composición se usa para tratar el envejecimiento o afecciones relacionadas con el envejecimiento según la presente invención. El artículo puede comprender además un segundo recipiente que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de glucosa. Puede comprender además otras sustancias necesarias desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. Además, el artículo comprende un prospecto con instrucciones de uso, incluidas, por ejemplo, instrucciones para indicar a un usuario de la composición que administre a un paciente la composición de plasminógeno y otros fármacos para tratar una enfermedad acompañante.

Breve descripción de los dibujos

[0102] La **Figura 1** muestra los resultados de detección de glucosa en sangre después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad durante 10 días y 31 días. Los resultados muestran que el nivel de glucosa en sangre en ratones del grupo al que se administró plasminógeno fue notablemente inferior al del grupo control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística fue significativa (* indica $P < 0,05$ y ** indica $P < 0,01$). Además, con la prolongación del tiempo de administración, el nivel de glucosa en sangre de los ratones del grupo control al que se administró PBS vehicular tiende a elevarse, mientras que el nivel de glucosa en sangre del grupo al que se administró plasminógeno disminuye gradualmente. Esto indica que el plasminógeno tiene un efecto hipoglucémico. La **Figura 2** muestra el efecto de la administración de plasminógeno sobre la concentración de fructosamina sérica en ratones diabéticos. Los resultados de la detección muestran que la concentración de fructosamina sérica disminuye notablemente tras la administración de plasminógeno y, en comparación con la de antes de la administración, la diferencia estadística es extremadamente significativa (** indica $P < 0,01$). Esto indica que el plasminógeno puede reducir significativamente la glucemia en ratones diabéticos. La **Figura 3** muestra los resultados de detección de la hemoglobina glicosilada en plasma tras la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas durante 35 días. Los resultados muestran que el valor DO de la hemoglobina glicosilada en los ratones del grupo administrado con plasminógeno es notablemente inferior al del grupo de control administrado con el vehículo PBS, y la diferencia estadística es extremadamente significativa (** indica $P < 0,01$). Esto indica que el plasminógeno tiene un efecto de reducción de la glucemia en los ratones diabéticos. La **Figura 4** muestra los resultados de detección de IPGTT después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 10 días. Los resultados muestran que después de la inyección intraperitoneal de glucosa, el nivel de glucosa en sangre de los ratones del grupo al que se administró plasminógeno es inferior al del grupo control al que se administró vehículo PBS, y en comparación con el grupo control al que se administró vehículo PBS, la curva de tolerancia a la glucosa del grupo al que se administró plasminógeno es más cercana a la del grupo de

ratones normales. Esto indica que el plasminógeno puede mejorar notablemente la tolerancia a la glucosa de ratones diabéticos. La **Figura 5** muestra los resultados de la detección de glucosa en sangre después del ayuno después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG normal en un modelo T1DM durante 10 días. Los resultados muestran que el nivel de glucosa en sangre de los ratones en el grupo de control al que se administró vehículo PBS es notablemente mayor que en el grupo al que se administró plasminógeno, y la diferencia estadística es extremadamente significativa (***) indica $P < 0,001$). Esto indica que el plasminógeno puede reducir significativamente el nivel de glucosa en sangre en ratones con actividad PLG normal en el modelo T1 DM.

La **Figura 6** muestra los resultados de detección de IPGTT después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG normal en un modelo T1DM durante 28 días. Los resultados muestran que, tras la inyección de glucosa, la concentración de glu- cosa en sangre de los ratones del grupo de control administrado con vehículo PBS es notablemente superior a la del grupo administrado con plasminógeno, y en comparación con el grupo de control administrado con vehículo PBS, la curva de tolerancia a la glucosa del grupo administrado con plasminógeno se aproxima más a la de los ratones normales. Esto indica que el plasminógeno puede aumentar la tolerancia a la glucosa de los ratones con actividad SPLG normal en el modelo de T1DM.

La **Figura 7** muestra los resultados de detección de insulina sérica después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 35 días. Los resultados muestran que el nivel sérico de insulina en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente mayor que el grupo de control administrado con vehículo PBS, y la diferencia estadística es significativa (* indica $P < 0,05$). Esto indica que el plasminógeno puede promover eficazmente la secreción de insulina.

La **Figura 8** muestra imágenes teñidas con HE del páncreas y las proporciones de área de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 31 días. A y B representan grupos de control administrados con vehículo PBS, C y D representan grupos administrados con plasminógeno, y E- representa los resultados del análisis cuantitativo del área de los islotes pancreáticos. Los resultados muestran que la mayoría de los islotes pancreáticos en los grupos de control administrados con PBS vehicular están atrofiados, las células de los islotes pancreáticos atrofiados son reemplazadas por acinos (indicado por ↓), y hay hiperplasia acinar en el borde de los islotes pancreáticos, lo que hace que el límite entre los islotes pancreáticos y los acinos no esté claro; en los grupos administrados con plasminógeno, la mayoría de los islotes pancreáticos son más grandes que los de los grupos de control, no hay hiperplasia acinar en los islotes pancreáticos, solo queda un pequeño número de acinos en unos pocos islotes pancreáticos, y el límite entre los islotes pancreáticos y los acinos es claro. Comparando los grupos a los que se administró plasminógeno con los grupos control en términos de la relación de área de islote pancreático a páncreas, se encontró que la relación de área en los grupos de administración es casi el doble que en los grupos control. Esto indica que el plasminógeno puede promover la reparación de los islotes pancreáticos deteriorados en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad, mediante los cuales se trata la diabetes mellitus reparando los islotes pancreáticos deteriorados.

La **Figura 9** muestra los resultados observados de la tinción roja de Sirius para islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad durante 31 días. A representa el grupo control administrado con vehículo PBS, B representa el grupo administrado con plasminógeno y C representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados mostraron que la deposición de colágeno (indicada por flecha) en el islote pancreático de ratones en el grupo al que se administró plasminógeno fue notablemente menor que en el grupo control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística fue significativa (* indica $P < 0,05$). Esto indica que el plasminógeno puede mejorar la fibrosis de los islotes pancreáticos en animales diabéticos.

La **Figura 10** muestra los resultados observados de la tinción inmunohistoquímica para Caspasa-3 de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 31 días. A representa el grupo de control administrado con vehículo PBS, y B representa el grupo administrado con plasminógeno. Los resultados muestran que la expresión de Caspasa-3 (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente inferior a la del grupo control al que se administró PBS vehicular. Esto indica que el plasminógeno puede reducir la apoptosis de las células de los islotes pancreáticos y proteger el tejido pancreático de los ratones diabéticos.

La **Figura 11** muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica para insulina de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 18 semanas durante 35 días. A representa el grupo control administrado con vehículo PBS, B representa el grupo administrado con plasminógeno y C representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión de insulina (indicada por ar-fila) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente mayor que en el grupo control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística es casi significativa ($P = 0,15$). Esto indica que el plasminógeno puede promover la reparación de la función de los islotes pancreáticos y promover la producción y secreción de insulina.

La **Figura 12** muestra los resultados observados de la tinción inmunohistoquímica para insulina de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 35 días. A representa el grupo control administrado con vehículo PBS, B representa el grupo administrado con plasminógeno, y C representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión de insulina (indicada por flecha) en el grupo administrado con plasminógeno es notablemente superior a la del grupo control administrado con vehículo PBS, y la diferencia estadística es significativa (* indica $P < 0,05$). Esto indica que el plasminógeno puede promover la reparación de la función de los islotes pancreáticos y promover la producción y secreción de insulina.

La **Figura 13** muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica para insulina de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 35 días. A representa el grupo control administrado con vehículo PBS, B representa el grupo administrado con plasminógeno y C representa los

resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión de insulina (indicada por ar-fila) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente superior a la del grupo control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística es extremadamente significativa (** indica $P < 0,01$). Esto indica que el plasminógeno puede promover eficazmente la reparación de la función de los islotes pancreáticos y promover la producción y secreción de insulina.

La **Figura 14** muestra los resultados observados de la tinción inmunohistoquímica para NF- κ B de los tejidos pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 31 días. A representa un grupo control normal, B representa el grupo control administrado con vehículo PBS, C representa el grupo administrado con plasminógeno y D representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión de NF- κ B (indicada por ar-fila) en el grupo administrado con plasminógeno es notablemente superior a la del grupo de control administrado con vehículo PBS, y la diferencia estadística es significativa (* indica $P < 0,05$). Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B, favoreciendo así la reparación de una inflamación en el islote pancreático de ratones diabéticos de 24 a 25 semanas.

La **Figura 15** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para el glucagón de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 18 semanas durante 35 días. A representa un grupo control normal, B representa el grupo control administrado con vehículo PBS, C representa el grupo administrado con plasminógeno y D representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que el glucagón se expresa en la región de células α en la periferia del islote pancreático en ratones de control normales. En comparación con el grupo al que se administró el plasminógeno, las células positivas para glucagón (indicadas por flecha) en el grupo de control al que se administró vehículo PBS aumentan notablemente, las células positivas para glucagón se filtran en la región central del islote pancreático, y los resultados del análisis cuantitativo de densidad óptica media muestran que la diferencia estadística es extremadamente significativa (** indica $P < 0,01$); y las células positivas para glucagón en el grupo al que se administró plasminógeno se dispersan en la periferia del islote pancreático, y en comparación con el grupo PBS, la morfología del islote pancreático en el grupo al que se administró plasminógeno es más cercana a la de los ratones normales. Esto indica que el plasminógeno puede inhibir significativamente la proliferación de células de los islotes pancreáticos α y la secreción de glucagón, y corregir la distribución desordenada de células de los islotes pancreáticos, promoviendo así la reparación de los islotes pancreáticos deteriorados.

La **Figura 16** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para el glucagón de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 35 días. A representa un grupo control normal, B representa un grupo control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados muestran que el glucagón se expresa en la región de células α en la periferia del islote pancreático en ratones de control normales. En comparación con el grupo administrado con plasminógeno, las células positivas para glucagón (indicadas por flecha) en el grupo de control administrado con vehículo PBS aumentan notablemente, y las células positivas se infiltran en la región central del islote pancreático; y las células positivas para glucagón en el grupo administrado con plasminógeno se dispersan en la periferia del islote pancreático, y en comparación con el grupo PBS, la morfología del islote pancreático en el grupo administrado con plasminógeno es más cercana a la de ratones normales. Esto indica que el plasminógeno puede inhibir significativamente la proliferación de las células del islote pancreático α y la secreción de glucagón, y corregir la distribución desordenada de las células del islote pancreático α , favoreciendo así la reparación del islote pancreático dañado.

La **Figura 17** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para el glucagón de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 35 días. A representa un grupo control normal, B representa el grupo control administrado con vehículo PBS, C representa el grupo administrado con plasminógeno y D representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que el glucagón se expresa en la región de células α en la periferia del islote pancreático en ratones de control normales. En comparación con el grupo al que se administró el gen plasminógeno, las células positivas (indicadas por flecha) en el grupo de control al que se administró vehículo PBS aumentan notablemente, las células positivas para glucagón se infiltran en la región central del islote pancreático, y los resultados del análisis cuantitativo de densidad óptica media muestran una diferencia estadística (* indica $P < 0,05$); y las células positivas para glucagón en el grupo al que se administró plasminógeno se dispersan en la periferia del islote pancreático, y en comparación con el grupo PBS, la morfología del islote pancreático en el grupo al que se administró plasminógeno es más cercana a la de ratones normales. Esto indica que el plasminógeno puede inhibir significativamente la proliferación de células α de los islotes pancreáticos y la secreción de glucagón, y corregir la distribución desordenada de células de los islotes pancreáticos, promoviendo así la reparación de islotes pancreáticos deteriorados.

La **Figura 18** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para el glucagón del islote pancreático después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG normal en un modelo T1DM durante 28 días. A representa el grupo control blanco, B representa el grupo control administrado con vehículo PBS, C representa el grupo administrado con plasminógeno y D representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión positiva de glucagón en el grupo control administrado con vehículo PBS es notablemente mayor que en el grupo administrado con plasminógeno, y los resultados del análisis cuantitativo de densidad óptica media muestran que la diferencia estadística es significativa (* indica $P < 0,05$). Esto indica que el plasminógeno puede reducir significativamente la secreción de glucagón de las células del islote pancreático a en ratones diabéticos y promover la reparación de los islotes pancreáticos emparejados.

La **Figura 19** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para IRS-2 del islote pancreático después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 18 semanas durante 35 días. A representa un grupo control normal, B representa el grupo control administrado con vehículo PBS, C representa el grupo administrado con plasminógeno y D representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión positiva

de IRS-2 (indicado por flecha) en los islotes pancreáticos de ratones en el grupo de control administrado con vehículo PBS es notablemente menor que el del grupo al que se administró plasminógeno, y la diferencia estadística es extremadamente significativa (** indica $P < 0,01$); y El nivel de expresión de IRS-2 en el grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al de los ratones del grupo control normal que en el grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede aumentar efectivamente la expresión de IRS-2 en las células de los islotes pancreáticos, mejorar la transducción de señales de insulina y reducir la lesión de las células β de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos.

La **Figura 20** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para IRS-2 de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 31 días. A representa un grupo control normal, B representa el grupo control administrado con vehículo PBS, C representa el grupo administrado con plasminógeno y D representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión positiva de IRS-2 (indicada por flecha) en los islotes pancreáticos de ratones en el grupo control administrado con vehículo PBS es notablemente menor que en el grupo administrado con plasminógeno, y la diferencia estadística es significativa (* indica $P < 0,05$); y El nivel de expresión de IRS-2 en el grupo administrado con plasminógeno es más cercano al de ratones en el grupo control normal que en el grupo administrado con vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede aumentar efectivamente la expresión de IRS-2 en las células de los islotes pancreáticos, mejorar la transducción de señales de insulina y reducir la lesión de las células β de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos.

La **Figura 21** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para IRS-2 del islote pancreático después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas durante 35 días. A representa un grupo control normal, B representa el grupo control administrado con vehículo PBS, C representa el grupo administrado con plasminógeno y D representa los resultados del análisis cuantitativo. Los resultados muestran que la expresión positiva de IRS-2 (indicada por flecha) en los islotes pancreáticos de ratones en el grupo de control al que se administró vehículo PBS es notablemente menor que en el grupo al que se administró plasminógeno; y El nivel de expresión de IRS-2 en el grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al de ratones en el grupo de control normal que en el grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede aumentar efectivamente la expresión de IRS-2 en las células de los islotes pancreáticos, mejorar la transducción de señales de insulina y reducir la lesión de las células β de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos.

La **Figura 22** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para IRS-2 del islote pancreático de ratones T1DM con actividad PLG normal después de la administración de plasminógeno durante 28 días. A representa un grupo control normal, B representa un grupo control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados muestran que la expresión positiva del IRS-2 (indicada por la flecha) en los islotes pancreáticos de los ratones del grupo de control administrado con PBS vehicular es notablemente inferior a la del grupo administrado con plasminógeno, y el nivel de expresión del IRS-2 en el grupo administrado con plasminógeno se aproxima más al de los ratones del grupo de control normal que al del grupo administrado con PBS vehicular. Esto indica que el plasminógeno puede aumentar eficazmente la expresión del IRS-2 en las células de los islotes pancreáticos, mejorar la transducción de la señal de la insulina y reducir la lesión de las células β de los islotes pancreáticos en ratones con T1DM con actividad normal de PLG.

La **Figura 23** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para los neutrófilos de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 35 días. A representa un grupo control normal, B representa un grupo control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados muestran que las células de expresión positiva (indicadas por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno son menores que las del grupo control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo control normal que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede reducir la infiltración de neutrófilos.

La **Figura 24** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para los neutrófilos de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM durante 28 días. A representa un grupo de control blanco, B representa un grupo de control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados muestran que las células de expresión positiva (indicadas por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno son menores que las del grupo de control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control blanco que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede reducir la infiltración de neutrófilos de islotes pancreáticos en ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM.

La **Figura 25** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para los neutrófilos de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG normal en un modelo T1DM durante 28 días. A representa un grupo de control blanco, B representa un grupo de control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados muestran que las células de expresión positiva (indicadas por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno son menores que las del grupo de control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control blanco que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la infiltración de neutrófilos de los islotes pancreáticos en ratones con actividad PLG normal en un modelo de T1DM.

La **Figura 26** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para insulina de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM durante 28 días. A representa un grupo de control blanco, B representa un grupo de control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados inmunohistoquímicos muestran que la expresión positiva de insulina (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al

del grupo de control en blanco que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la síntesis y secreción de insulina en ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM.

La **Figura 27** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para insulina de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG normal en un modelo T1DM durante 28 días. A representa un grupo de control blanco, B representa un grupo de control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados inmunohistoquímicos muestran que la expresión positiva de insulina (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control en blanco que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la síntesis y expresión de insulina en ratones con actividad PLG normal en un modelo T1DM.

La **Figura 28** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para NF- κ B de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM durante 28 días. A representa un grupo de control blanco, B representa un grupo de control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados muestran que la expresión de NF- κ B (indicada por flecha) en el grupo al que se administró el gen plasminogénico es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de reparación de la inflamación NF- κ B, promoviendo así la reparación de una inflamación en el islote pancreático.

La **Figura 29** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para κ B NF del islote pancreático después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 18 semanas durante 35 días. A representa el grupo de control administrado con vehículo PBS, y B representa el grupo administrado con plasminógeno. Los resultados experimentales muestran que la expresión de NF- κ B (indicado por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente superior al del grupo control al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B, promoviendo así la reparación de una inflamación en el islote pancreático de ratones diabéticos relativamente jóvenes (18 semanas de edad).

La **Figura 30** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para NF- κ B del islote pancreático después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 35 días. A representa un grupo control normal, B representa un grupo control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados del experimento de la presente invención muestran que la expresión de NF- κ B (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente mayor que en el grupo de control al que se administró PBS vehicular. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B, promoviendo así la reparación de una inflamación en el islote pancreático de ratones diabéticos relativamente viejos (26 semanas de edad).

La **Figura 31** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para el TNF- α de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 31 días. A representa un grupo control normal, B representa un grupo control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados de la investigación muestran que la expresión positiva de TNF- α (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control normal que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión de TNF- α , promoviendo así la reparación de los islotes pancreáticos deteriorados en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad.

La **Figura 32** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para el TNF- α de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 31 días. A representa un grupo control normal, B representa un grupo control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados de la investigación muestran que la expresión positiva de TNF- α (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control normal que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión de TNF- α , promoviendo así la reparación de los islotes pancreáticos deteriorados en ratones diabéticos de 26 semanas de edad.

La **Figura 33** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para TNF- α de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM durante 28 días. A representa el grupo de control administrado con vehículo PBS, y B representa el grupo administrado con plasminógeno. Los resultados de la investigación muestran que la expresión positiva de TNF- α (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión de TNF- α promoviendo así la reparación de islotes pancreáticos deteriorados en ratones con actividad PLG deteriorada en un modelo T1DM.

La **Figura 34** muestra los resultados inmunohistoquímicos observados para IgM de los islotes pancreáticos después de la administración de plasminógeno a ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM durante 28 días. A representa un grupo de control blanco, B representa un grupo de control administrado con vehículo PBS y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados de la investigación de este experimento muestran que la expresión positiva de IgM (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente inferior a la del grupo control al que se administró vehículo PBS, y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo control normal que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede reducir la expresión de IgM, reduciendo así la alteración de los islotes pancreáticos en ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM.

La **Figura 35** muestra los resultados de la tinción TUNEL de los islotes pancreáticos tras la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 24 a 25 semanas durante 31 días. A representa un grupo control normal, B representa un grupo control administrado con vehículo PBS, y C representa un grupo administrado con plasminógeno. Los resultados de este experimento muestran que el número de células positivas (indicadas por flecha) en el grupo administrado con plasminógeno es notablemente menor que en el grupo de control administrado con vehículo PBS. La tinción positiva con TUNEL es extremadamente baja en el grupo de control normal. La tasa de apoptosis del grupo de control normal es de aproximadamente un 8%, la tasa de apoptosis en el grupo administrado con PBS vehículo es de aproximadamente un 93%, y la tasa de apoptosis en el grupo administrado con plasminógeno es de aproximadamente un 16%. Esto indica que el grupo de plasminógeno puede reducir significativamente la apoptosis de las células de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos.

La **Figura 36** muestra los resultados de detección de fructosamina sérica después de la administración de plasminógeno a ratones diabéticos de 26 semanas de edad durante 35 días. Los resultados de la detección muestran que la concentración de fructosamina sérica en el grupo administrado con plasminógeno es notablemente inferior a la del grupo de control administrado con el vehículo PBS, y la diferencia estadística es casi significativa ($P = 0,06$). Esto indica que el plasminógeno puede reducir significativamente el nivel de glucosa en sangre de los ratones diabéticos.

La **Figura 37** muestra los resultados de la detección de glucosa en sangre después de la administración de plasminógeno a ratones en un modelo T1DM durante 20 días. Los resultados muestran que el nivel de glucosa en sangre de los ratones en el grupo control administrado con vehículo PBS es notablemente mayor que el de los ratones en el grupo administrado con plasminógeno, y la diferencia estadística es significativa ($P = 0,04$). Esto indica que el plasminógeno puede promover la capacidad de descomposición de la glucosa en ratones T1DM, reduciendo así la glucosa en sangre.

La **Figura 38** muestra los resultados de detección de insulina sérica después de la administración de plasminógeno a ratones en un modelo T1DM durante 20 días. Los resultados muestran que la concentración de insulina sérica en los ratones del grupo de control administrado con vehículo PBS es notablemente inferior a la de los ratones del grupo administrado con plasminógeno, y la diferencia estadística es casi significativa ($P = 0,08$). Esto indica que el plasminógeno puede promover la secreción de insulina en ratones T1DM.

Ejemplos

Ejemplo 1. El plasminógeno reduce la glucemia en ratones diabéticos

[0103] Ocho ratones macho db/db de 24 a 25 semanas de edad se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo de 5 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 3 ratones administrados con vehículo PBS. Los ratones fueron pesados y agrupados el día que comenzó el experimento, es decir, el día 0. El plasminógeno o PBS se administró a partir del día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 31 días consecutivos. Después de ayunar durante 16 horas los días 10 y 31, la prueba de glucosa en sangre se llevó a cabo utilizando un papel de prueba de glucosa en sangre (Roche, Mannheim, Alemania).

[0104] Los resultados muestran que el nivel de glucosa en sangre en ratones del grupo al que se administró plasminógeno fue notablemente inferior al del grupo de control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística fue significativa (* indica $P < 0,05$ y ** indica $P < 0,01$). Además, con la prolongación del tiempo de administración, el nivel de glucosa en sangre de los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS tiende a aumentar, mientras que el nivel de glucosa en sangre del grupo al que se administró plasminógeno disminuye gradualmente (figura 1). Esto indica que el plasminógeno tiene un efecto de reducción de la glucosa en sangre en animales diabéticos.

Ejemplo 2. Plasminógeno reduce el nivel de fructosamina en ratones diabéticos

[0105] Para cinco ratones macho db/db de 24 a 25 semanas de edad, se recogieron 50 ml de sangre del plexo venoso en los globos oculares de cada ratón un día antes de la administración, registrada como día 0, para detectar una concentración de fructosamina sérica; y a partir del día 1, se administra plasminógeno durante 31 días consecutivos. El día 32, se extrajo sangre de los globos oculares extraídos para detectar la concentración de fructosamina sérica. La concentración de fructosamina se midió utilizando un kit de detección de fructosamina (A037-2, Nanjing Jiancheng).

[0106] La concentración de fructosamina refleja el nivel promedio de glucosa en sangre dentro de 1 a 3 semanas. Los resultados muestran que la concentración de fructosamina sérica disminuye notablemente después de la administración de plasminógeno, y en comparación con la anterior a la administración, la diferencia estadística es extremadamente significativa (Figura 2). Esto indica que el plasminógeno puede reducir eficazmente la glucosa en sangre en animales diabéticos.

Ejemplo 3. Plasminógeno reduce el nivel de hemoglobina glicosilada en ratones diabéticos

[0107] Nueve ratones db/db machos de 26 semanas de edad fueron pesados y luego divididos aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 5 ratones administrados con el vehículo PBS, el día en que se inició el experimento. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2

mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 35, los ratones estuvieron en ayunas durante 16 horas, y el día 36, se extrajo la sangre de los globos oculares extraídos para detectar la concentración de hemoglobina glucosilada en plasma.

[0108] El contenido de hemoglobina glicosilada puede reflejar generalmente el control de la glucosa en sangre en un paciente con- en las últimas 8 a 12 semanas. Los resultados muestran que la concentración de hemoglobina glucosilada en los ratones del grupo al que se administró plasminógeno es notablemente inferior a la del grupo control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística es significativa (Figura 3). Esto indica que el plasminógeno puede reducir efectivamente el nivel de glucosa en sangre en animales diabéticos.

Ejemplo 4. Plasminógeno mejora la tolerancia a la glucosa de ratones diabéticos

[0109] Nueve ratones macho db/db de 26 semanas de edad y tres ratones db/m estuvieron involucrados. El día que se inició el experimento, se pesaron los ratones db/db y luego se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones a los que se administró plasminógeno y un grupo control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, y los ratones db/m se utilizaron como grupo control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró el gen del plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 10 días consecutivos. El día 11, después de que los ratones estuvieron en ayunas durante 16 horas, a cada ratón se le inyectó por vía intraperitoneal una solución de glucosa al 5% a 5 g/kg de peso corporal, y la concentración de glucosa en sangre se detectó 0, 30, 60, 90, 120 y 180 minutos usando un papel de prueba de glucosa en sangre (Roche, Mannheim, Alemania).

[0110] Una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) puede detectar la tolerancia de un cuerpo a la glucosa. Se sabe en la técnica anterior que la tolerancia a la glucosa de un paciente diabético disminuye.

[0111] Los resultados experimentales muestran que después de la inyección intraperitoneal de glucosa, el nivel de glucosa en sangre de los ratones en el grupo al que se administró plasminógeno es menor que en el grupo de control al que se administró vehículo PBS, y en comparación con el grupo de control al que se administró vehículo PBS, la curva de tolerancia a la glucosa del grupo al que se administró plasminógeno es más cercana a la del grupo de ratones normales (Figura 4). Esto indica que el plasminógeno puede mejorar notablemente la tolerancia a la glucosa de los ratones diabéticos.

Ejemplo 5. El plasminógeno reduce el nivel de glucosa en sangre en ratones con actividad PLG normal en el modelo T1DM

[0112] Diez ratones macho db/db de 9 a 10 semanas de edad con actividad nor-mal PLG se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo control administrado con vehículo PBS y un grupo administrado con plasminógeno, con 5 ratones en cada grupo. Los dos grupos de ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de tozotocina estreptocócica (STZ) (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir T1DM [43]. 12 días después de la inyección de STZ, se realizó la administración y este día se registró como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 10 días consecutivos. El día 11, después de ayunar a los ratones durante 6 horas, se llevó a cabo la prueba de glucosa en sangre utilizando un papel de prueba de glucosa en sangre (Roche, Mannheim, Alemania).

[0113] Los resultados muestran que el nivel de glucosa en sangre de los ratones en el grupo de control administrado con vehículo PBS es notablemente mayor que el de los ratones en el grupo administrado con plasminógeno, y la diferencia estadística es extremadamente significativa (Figura 5). Esto indica que el plasminógeno puede reducir significativamente el nivel de glucosa en sangre en ratones con actividad PLG normal en el modelo T1DM.

Ejemplo 6. Plasminógeno mejora la tolerancia a la glucosa en ratones modelo T1DM

[0114] Quince ratones macho db/db de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG normal se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco, un grupo control al que se administró vehículo PBS y un grupo al que se administró plasminógeno, con 5 ratones en cada grupo. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y después se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir T1DM [43], mientras que el grupo blanco no se trató. 12 días después de la inyección de STZ, se realizó la administración y este día se registró como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 28 días consecutivos. El día 28, después de ayunar a los ratones durante 6 horas, se inyectó solución de glucosa al 5% por vía intraperitoneal a 5 g/kg de peso

corporal, y se detectó la concentración de glucosa en sangre 0, 15, 30, 60 y 90 minutos después de la inyección utilizando un papel de prueba de glucosa en sangre (Roche, Mannheim, Alemania).

5 **[0115]** Una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) puede detectar la tolerancia de un cuerpo a la glucosa. Se sabe en la técnica anterior que la tolerancia a la glucosa de un paciente diabético disminuye.

10 **[0116]** Los resultados muestran que después de la inyección de glucosa, la concentración de glucosa en sangre de los ratones en el grupo de control administrado con vehículo PBS es notablemente más alta que en el grupo administrado con plasminógeno, y en comparación con el grupo de control administrado con vehículo PBS, la curva de tolerancia a la glucosa del grupo administrado con plasminógeno es más cercana a la de los ratones normales (Figura 6). Esto indica que el plasminógeno puede aumentar la tolerancia a la glucosa de ratones con actividad PLG normal en el modelo T1DM.

Ejemplo 7. Plasminógeno promueve la función de secreción de insulina en ratones diabéticos

15 **[0117]** Nueve ratones macho db/db de 26 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. En el día 35, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas; y en el día 36, se extrajo la sangre de los globos oculares extraídos, y se centrifugó para obtener un sobrenadante, y se detectó el nivel de insulina en suero usando un kit de detección de insulina (Mercodia AB) según las instrucciones de uso.

25 **[0118]** Los resultados de la detección muestran que el nivel sérico de insulina en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente mayor que en el grupo de control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística es significativa (Figura 7). Esto indica que el plasminógeno puede aumentar significativamente la secreción de insulina en ratones diabéticos.

Ejemplo 8. Efecto protector del plasminógeno sobre los pliegues pancreáticos de ratones diabéticos

35 **[0119]** Siete ratones macho db/db de 24 a 25 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 3 ratones administrados con vehículo PBS, el día del inicio del experimento que se registró como día 0. A partir del día 1, se administró minógeno plasmático o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. Las secciones de tejido tenían 3 µm de espesor. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas, teñidas con hematoxilina y eosina (tinción HE), diferenciadas con ácido clorhídrico al 1% en alcohol, y devueltas a azul con agua amoniacal. Las secciones fueron selladas después de deshidratación con gradiente de alcohol, y observadas bajo un microscopio óptico a 200x y 400x.

45 **[0120]** Los resultados muestran que la mayoría de los islotes pancreáticos en los grupos de control administrados con vehículo PBS (Figuras 8A y 8B) están atrofiados, las células de los islotes pancreáticos atrofiadas se reemplazan por acinos (indicados por ar-fila), y hay hiperplasia acinar en el borde de los islotes pancreáticos, lo que hace que el límite entre los islotes pancreáticos y los acinos no esté claro; en los grupos administrados con plasminógeno (Figuras 8C y 8D), la mayoría de los islotes pancreáticos son más grandes que los de los grupos de control, no hay hiperplasia acinar en los islotes pancreáticos, solo un pequeño número de acinos permanece en unos pocos islotes pancreáticos y el límite entre los islotes pancreáticos y los acinos es claro. Comparando los grupos de administración con los grupos control en términos de la relación de área de islote pancreático a páncreas, se encuentra que la relación de área en los grupos de administración es casi el doble que en los grupos control (Figura 8E). Esto indica que el plasminógeno puede promover la reparación de los islotes pancreáticos deteriorados en ratones diabéticos, lo que sugiere que el plasminógeno puede curar fundamentalmente la diabetes mellitus promoviendo la reparación de los islotes pancreáticos deteriorados.

Ejemplo 9. Plasminógeno reduce la deposición de colágeno en el islote pancreático de ratones diabéticos

60 **[0121]** Dieciséis ratones macho db/db de 24 a 25 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 10 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 6 ratones administrados con vehículo PBS, el día del inicio del experimento que se registró como día 0. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con

5 gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. Las secciones de tejido tenían 3 μm de espesor. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Después de tefir con rojo Sirius al 0,1% durante 60 min, las secciones se lavaron con agua corriente. Después de tefir con hematoxilina durante 1 min, las secciones se lavaron con agua corriente, se diferenciaron con ácido clorhídrico al 1% en alcohol y se devolvieron a azul con agua amoniacal, se lavaron con agua corriente, se secaron y sellaron. Las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

[0122] La tinción con rojo Sirio permite una tinción duradera del colágeno. Como método de tinción especial para secciones patológicas, la tinción roja de Sirius puede mostrar el tejido de colágeno específicamente.

10 [0123] Los resultados de la tinción muestran que la deposición de colágeno (indicada por flecha) en el islote pancreático de los ratones en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 9B) fue notablemente menor que en el grupo control al que se administró vehículo PBS (Figura 9A), y la diferencia estadística fue significativa (Figura 9C). Esto indica que el plasminógeno puede reducir la fibrosis de los islotes pancreáticos en animales diabéticos.

15 **Ejemplo 10. Plasminógeno reduce apoptosis de células de islotes pancreáticos en ratones diabéticos**

[0124] Se pesaron seis ratones macho db/db de 24 a 25 semanas de edad y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 2 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados y se tomó el páncreas y se fijó en paraformaldehído al 4%. Los tejidos de páncreas fijados se embebieron en parafina tras deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 3 m m. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con líquido de suero de cabra normal al 5% (Vector laboratories, Inc., EE.UU.) durante 1 hora y, a continuación, se desechó el líquido de suero de cabra y se marcaron los tejidos con un rotulador PAP. Las secciones se incubaron con conejo anti-ratón Caspasa-3 (Abeam) a 4°C durante toda la noche y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., EE.UU.). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contrateñían con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaban con agua corriente durante 5 minutos. Tras la deshidratación con gradiente, la permeabilización y el sellado, las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

[0125] La caspasa-3 es la enzima de escisión terminal más importante en el proceso de apoptosis celular, y cuanta más expresión de la misma, más células en estado apoptótico^[44].

40 [0126] Los resultados del experimento de la presente invención muestran que la expresión de Caspasa-3 (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 10B) es notablemente inferior a la del grupo control al que se administró vehículo PBS (Figura 10A). Esto indica que el plasminógeno puede reducir la apoptosis de las células de los islotes pancreáticos.

45 **Ejemplo 11. Plasminógeno promueve la expresión y secreción de insulina en ratones diabéticos de 18 semanas**

[0127] Ocho ratones macho db/db de 18 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo al que se le administró plasminógeno y un grupo control al que se le administró vehículo PBS, con 4 ratones en cada grupo, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró PBS vehicular se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 31 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μm . Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra líquido normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 1 hora, y posteriormente, el suero de cabra líquido se descartó, y los tejidos se rodearon con una pluma PAP. Las secciones se incubaron con anticuerpo de conejo anti-insulina de ratón (Abeam) a 4 °C durante la noche y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después del gradiente de deshidratación, permeabilización y sellado, las secciones se observaron bajo un microscopio a 200x.

[0128] Los resultados muestran que la expresión de insulina (indicada por flecha) en el grupo administrado con plasminógeno (Figura 11A) es notablemente mayor que en el grupo control administrado con PBS vehicular (Figura 11A), y la diferencia estadística es casi significativa ($P = 0,15$) (Figura 11C). Esto indica que el plasminógeno puede promover la reparación de la función de los islotes pancreáticos y promover la expresión y secreción de insulina.

5

Ejemplo 12. El plasminógeno promueve la expresión y secreción de insulina en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas

[0129] Ocho ratones macho db/db de 24 a 25 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 5 ratones administrados con minógeno plasmático y un grupo control de 3 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μm . Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero líquido de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 1 hora, y posteriormente, el suero líquido de cabra se descartó y los tejidos se rodearon con una pluma PAP. Las secciones se incubaron con anticuerpo de conejo anti-insulina de ratón (Abeam) a 4 °C durante la noche y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en gradiente, permeabilización y sellado, las secciones se sirvieron al microscopio a 200x.

[0130] Los resultados muestran que la expresión de insulina (indicada por flecha) en el grupo administrado con minógeno plasmático es notablemente mayor que en el grupo de control administrado con PBS vehicular, y la diferencia estadística es significativa ($P = 0,02$) (Figura 12). Esto indica que el plasminógeno puede reparar eficazmente la función de los islotes pancreáticos y promover la expresión y secreción de insulina.

Ejemplo 13. Plasminógeno promueve la reparación de la síntesis de insulina y la función de secreción de ratones diabéticos

[0131] Nueve ratones macho db/db de 26 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 35, los ratones estuvieron en ayunas durante 16 horas; y el día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en dehído paraformal al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron encamados en parafina después de deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μm . Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero líquido de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 1 hora, y posteriormente, el suero líquido de cabra se descartó y los tejidos se rodearon con una pluma PAP. Las secciones se incubaron con anticuerpo de conejo anti-insulina de ratón (Abeam) a 4 °C durante la noche y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en gradiente, permeabilización y sellado, las secciones se sirvieron al microscopio a 200x.

[0132] Los resultados muestran que la expresión de insulina (indicada por la flecha) en el grupo administrado con plasminógeno es notablemente superior a la del grupo de control administrado con el vehículo PBS, y la diferencia estadística es extremadamente significativa ($P = 0,005$) (figura 13). Esto indica que el plasminógeno puede reparar eficazmente la función de los islotes pancreáticos de los ratones diabéticos y mejorar la expresión y secreción de insulina.

60

Ejemplo 14. El plasminógeno promueve la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B, en islotes pancreáticos de ratones diabéticos de 24 a 25 semanas

[0133] Diez ratones macho db/db de 24 a 25 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, de acuerdo con el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con minógeno plasmático y un grupo control de 6 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0; además, se usaron cuatro ratones db/m adicionales como grupo control normal y este grupo control normal no se trató. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró PBS vehicular se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Las secciones se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con agua dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra líquido normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 1 hora, y posteriormente, el suero de cabra líquido se descartó, y los tejidos se rodearon con una pluma PAP. Las secciones se incubaron con conejo anti-ratón NF KB (Abeam) a 4 °C durante la noche y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación en gradiente, permeabilización y sellado, las secciones se observaron al microscopio a 200x.

[0134] NF- κ B es un miembro de la familia de proteínas del factor de transcripción y juega un papel importante en el proceso de reparación de una inflamación ^[45].

[0135] Los resultados del experimento de la presente invención muestran que la expresión de NF- κ B (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno es notablemente mayor que en el grupo de control al que se administró vehículo PBS, y la diferencia estadística es significativa (Figura 14). Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B.

Ejemplo 15. El plasminógeno reduce la proliferación de células α en ratones diabéticos de 18 semanas, restaura la distribución normal de células α y reduce la secreción de glucagón.

[0136] Se pesaron ocho ratones macho db/db y tres ratones macho db/m, de 18 semanas de edad, y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo al que se le administró plasminógeno y un grupo control al que se le administró vehículo PBS, con 4 ratones en cada grupo, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0; además, los ratones db/m se usaron como grupo control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-glucagón de ratón (Abcam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0137] Las células del islote pancreático sintetizan y secretan glucagón, que se distribuye principalmente en la región periférica del islote pancreático.

[0138] Los resultados muestran que, en comparación con el grupo administrado con plasminógeno (figura 15C), las células positivas para el glucagón (indicadas con una flecha) en el grupo de control administrado con el vehículo PBS (figura 15B) aumentan notablemente, las células positivas se infiltran en la región central del islote pancreático y los resultados del análisis cuantitativo de la densidad óptica media muestran una diferencia estadística (** indica $P < 0,01$) (figura 15D). 01) (figura 15D); y las células positivas para el glucagón en el grupo administrado con plasminógeno se dispersan en la periferia del islote pancreático, y en comparación con el grupo administrado con el vehículo PBS, la morfología del islote pancreático en el grupo ad- ministrado con plasminógeno se aproxima más a la del grupo de control normal (figura 15A). Esto indica que el plasminógeno puede inhibir significativamente la proliferación de las células del islote pancreático a y la secreción de glucagón en ratones diabéticos de 18 semanas, y corregir la distribución

desordenada de las células del islote pancreático α , lo que sugiere que el plasminógeno promueve la reparación del islote pancreático dañado.

Ejemplo 16. El plasminógeno reduce la proliferación de células en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad, restaura la distribución normal de células y reduce la secreción de glucagón.

[0139] Once ratones macho db/db y cinco ratones macho db/m, de 24-25 semanas de edad, se pesaron y los ratones db/db se pesaron y luego se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo de 5 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 6 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0; además, los ratones db/m se usaron como grupo control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola o sin líquido, ambos con una duración de 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-glucagón de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector Laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con una goma neutra, las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

[0140] Las células del islote pancreático sintetizan y secretan glucagón, que se distribuye principalmente en la región periférica del islote pancreático.

[0141] Los resultados muestran que en comparación con el grupo administrado con plasminógeno (Figura 16C), las células positivas para glucagón (indicadas por flecha) en el grupo de control administrado con vehículo PBS (Figura 16B) aumentan notablemente, y las células positivas se infiltran en la región central del islote pancreático; y las células positivas para glucagón en el grupo administrado con plasminógeno se dispersan en la periferia del islote pancreático, y en comparación con el grupo administrado con vehículo PBS, la morfología del islote pancreático en el grupo administrado con plasminógeno es más cercana a la del grupo de control normal (Figura 16A). Esto indica que el gen plasminógeno puede inhibir significativamente la proliferación de células pancreáticas y la secreción de glucagón en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad, y corregir la distribución desordenada de las células del islote pancreático α , lo que sugiere que el plasminógeno promueve la reparación del islote pancreático deteriorado.

Ejemplo 17. El plasminógeno inhibe la proliferación de células α en ratones diabéticos de 26 semanas de edad, restaura la distribución normal de células α y reduce la secreción de glucagón.

[0142] Se pesaron nueve ratones macho db/db y tres ratones macho db/m, de 26 semanas de edad, y los ratones db/db se pesaron y luego se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0; además, los ratones db/m se usaron como grupo control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-glucagón de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron incubadas con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector Laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con una goma neutra, las secciones se observaron bajo un microscopio óptico a 200x.

[0143] Las células del islote pancreático sintetizan y secretan glucagón, que se distribuye principalmente en la región periférica del islote pancreático.

5 **[0144]** Los resultados muestran que en comparación con el grupo administrado con plasminógeno (Figura 17C), las células positivas para glucagón (indicadas por flecha) en el grupo de control administrado con vehículo PBS (Figura 17B) aumentan notablemente, las células positivas se infiltran en la región central del islote pancreático, y los resultados del análisis cuantitativo de densidad óptica media muestran una diferencia estadística (** indica $P < 0,01$) (Figura 17D); y las células positivas para glucagón en el grupo administrado con plasminógeno se dispersan en la periferia del islote pancreático, y en comparación con el grupo administrado con vehículo PBS, la morfología del islote pancreático en el grupo administrado con plasminógeno es más cercana a la del grupo de control normal (Figura 17A). Esto indica que el plasminógeno puede inhibir significativamente la proliferación de células pancreáticas α y la secreción de glucagón en ratones diabéticos de 26 semanas de edad, y corregir la distribución desordenada de las células α de los islotes pancreáticos, lo que sugiere que el plasminógeno promueve la reparación de los islotes pancreáticos deteriorados.

15 **Ejemplo 18. El plasminógeno reduce la secreción de glucagón en ratones con actividad PLG normal en el modelo de T1DM**

[0145] Quince ratones macho db/db de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG normal se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco, un grupo control al que se administró vehículo PBS y un grupo al que se administró plasminógeno, con 5 ratones en cada grupo. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y después se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma, Cat# S0130), en una dosis única, para inducir el modelo T1DM [43], mientras que el grupo blanco no fue tratado. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 28 días consecutivos. El día 29, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μm . Las secciones fueron depiladas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-glucagón de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con una goma neutra, las secciones se observaron bajo un microscopio óptico a 200x.

[0146] Las células α del islote pancreático sintetizan y secretan glucagón, que se distribuye principalmente en la región periférica del islote pancreático.

45 **[0147]** Los resultados muestran que la expresión positiva de glucagón en el grupo control administrado con PBS vehicular (Figura 18B) es notablemente mayor que la del grupo administrado con plasminógeno (Figura 18C), y los resultados del análisis cuantitativo de densidad óptica media muestran que la diferencia estadística es significativa (Figura 18D); además, el resultado del grupo administrado con plasminógeno es más cercano al del grupo control en blanco que al del grupo administrado con PBS vehicular (Figura 18A). Esto indica que el plasminógeno puede reducir significativamente la secreción de glucagón de las células del islote pancreático a en ratones diabéticos inducidos por STZ.

55 **Ejemplo 19. El plasminógeno promueve la expresión del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) en los islotes pancreáticos de ratones diabéticos de 18 semanas**

[0148] Se pesaron siete ratones macho db/db y tres ratones macho db/m, de 18 semanas de edad, y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 3 ratones administrados con minógeno plasmático y un grupo control de 4 ratones administrados con PBS vehicular, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0; además, los ratones db/m se utilizaron como grupo control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día por la vena de la cola, y a los ratones del grupo control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS por la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μm . Las secciones fueron desparafinadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15

minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-IRS-2 de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0149] El sustrato del receptor de insulina 2 (IRS-2) es un sustrato sobre el que puede actuar una tirosina quinasa receptora de insulina activada, es una molécula importante en la ruta de transducción de señales de insulina y es muy importante para la supervivencia de las células β pancreáticas de los islotes. El IRS-2 tiene un efecto protector sobre las células β de los islotes pancreáticos cuando aumenta su expresión y es crucial para el mantenimiento de las células β de los islotes pancreáticos funcionales ^[46, 47].

[0150] Los resultados inmunohistoquímicos de IRS-2 muestran que la expresión positiva de IRS-2 (indicada por flecha) en los islotes pancreáticos de ratones en el grupo de control al que se administró vehículo PBS (Figura 19B) es notablemente inferior a la del grupo al que se administró vehículo PBS (Figura 19C), y la diferencia estadística es extremadamente significativa (Figura 19D); además, el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control en blanco que al del grupo al que se administró vehículo PBS (Figura 19A). Esto indica que el plasminógeno puede aumentar efectivamente la expresión de IRS-2 en células de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos de 18 semanas de edad.

Ejemplo 20. Plasminógeno promueve la expresión de IRS-2 en islotes pancreáticos de ratones diabéticos de 24 a 25 semanas

[0151] Se pesaron once ratones macho db/db y cinco ratones macho db/m, de 24-25 semanas de edad, y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 5 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 6 ratones administrados con vehículo PBS, el día que se inició el experimento que se registró como día 0; además, se utilizaron los ratones db/m como grupo de control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola o sin líquido, ambos con una duración de 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos por afinidad parcial después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-IRS-2 de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4°C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector Laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0152] Los resultados inmunohistoquímicos de IRS-2 muestran que la expresión positiva de IRS-2 (indicada por flecha) en los islotes pancreáticos de ratones en el grupo control administrado con vehículo PBS (Figura 20B) es notablemente menor que la del grupo administrado con plasminógeno (Figura 20C), y la diferencia estadística es significativa (Figura 20D); además, el resultado del grupo administrado con plasminógeno es más cercano al del grupo control normal que al del grupo administrado con vehículo PBS (Figura 21A). Esto indica que el plasminógeno puede aumentar efectivamente la expresión de IRS-2 en células de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad.

Ejemplo 21. Plasminógeno promueve expresión de IRS-2 en islote pancreático de ratones diabéticos de 26 semanas

[0153] Nueve ratones macho db/db y tres ratones macho db/m, de 26 semanas de edad, se pesaron y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, de acuerdo con el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con minógeno plasmático y un grupo control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, el día en que se inició el experimento, es decir, el día 0; además, los ratones db/m se utilizaron como grupo de control. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se

administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-IRS-2 de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4°C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con una goma neutra, las secciones se observaron bajo un microscopio óptico a 200x.

[0154] Los resultados inmunohistoquímicos de IRS-2 muestran que la expresión positiva de IRS-2 (indicada por flecha) en los islotes pancreáticos de ratones en el grupo de control administrado con vehículo PBS (Figura 21B) es notablemente inferior a la del grupo administrado con plasminógeno (Figura 21C); y el nivel de expresión de IRS-2 en el grupo administrado con plasminógeno es más cercano al de los ratones en el grupo de control normal (Figura 21A). Esto indica que el plasminógeno puede aumentar efectivamente la expresión de IRS-2 en células de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos de 26 semanas de edad.

Ejemplo 22. El plasminógeno promueve la expresión de IRS-2 en islotes pancreáticos de ratones T1DM con actividad PLG normal

[0155] Quince ratones macho db/db de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG normal se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco, un grupo control al que se administró vehículo PBS y un grupo al que se administró plasminógeno, con 5 ratones en cada grupo. Los ratones del grupo administrado con vehículo PBS y del grupo administrado con plasminógeno fueron ayunados durante 4 horas y luego se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma, Cat# S0130), en una dosis única, para inducir la diabetes mellitus de tipo I^[43], mientras que el grupo en blanco no fue tratado. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo administrado con plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 mL/ratón/día por la vena de la cola, y al grupo de control administrado con vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS por la vena de la cola, ambos durante 28 días consecutivos. El día 29, se sacrificó a los ratones y se tomó el páncreas y se fijó en paraformaldehído al 4%. Los tejidos de páncreas fijados se incluyeron en parafina tras deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Los tejidos se marcaron con un rotulador PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos y, una vez transcurrido el tiempo, se desechó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo IRS-2 de conejo anti-ratón (Abeam) a las secciones, se incubaron a 4°C durante toda la noche y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., EE.UU.). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se teñían con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaban con agua corriente durante 5 minutos. Tras la deshidratación con alcohol en gradiente, la permeabilización con xileno y el sellado con una goma neutra, las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

[0156] Los resultados inmunohistoquímicos de IRS-2 muestran que la expresión positiva de IRS-2 (indicada por flecha) en los islotes pancreáticos de ratones en el grupo de control administrado con vehículo PBS (Figura 22B) es notablemente inferior a la del grupo administrado con minógeno plasmático (Figura 22C), y el resultado del grupo administrado con plasminógeno es más cercano al del grupo de control en blanco que al del grupo administrado con vehículo PBS (Figura 22A). Esto indica que el gen plasmino puede aumentar efectivamente la expresión de IRS-2 en células de islotes pancreáticos en ratones de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG normal.

Ejemplo 23. El plasminógeno reduce la infiltración de neutrófilos pancreáticos en ratones diabéticos de 24 a 26 semanas

[0157] Se incluyeron nueve ratones macho db/db y tres ratones macho db/m, de 24-26 semanas de edad, en los que los ratones db/db se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, y los ratones db/m se usaron como grupo control normal. El día en que comenzó el experimento se registró el Día 0, y los ratones fueron pesados y agrupados. A partir del segundo día del experimento, se administró plasminógeno o PBS a los ratones, y el día se registró como Día 1. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un

volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones fueron depiladas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo antineutrófilos de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de la deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con una goma neutra, las secciones se observaron bajo un microscopio óptico a 200x.

[0158] Los neutrófilos son un miembro importante del sistema inmunitario celular no específico, y cuando ocurre la inflamación, son atraídos al sitio de inflamación por sustancias quimiotácticas.

[0159] Los resultados inmunohistoquímicos de los neutrófilos muestran que las células de expresión positiva en el grupo administrado con plasminógeno (Figura 23C) son menores que las del grupo de control administrado con vehículo PBS (Figura 23B), y el resultado del grupo administrado con plasminógeno es más cercano al del grupo de control normal (Figura 23A) que al del grupo administrado con vehículo PBS.

Ejemplo 24. El plasminógeno reduce la infiltración de neutrófilos de islotes pancreáticos en ratones con actividad PLG alterada en el modelo T1DM

[0160] Diez ratones macho de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG alterada se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco de 3 ratones, un grupo control de 3 ratones administrados con PBS y un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno. Los ratones del grupo administrados con vehículo PBS y el grupo administrado con plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y luego se inyectaron por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una sola dosis, para inducir diabetes mellitus tipo I [43], mientras que el grupo blanco no fue tratado. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 28 días consecutivos. El día 29, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo antineutrófilos de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratificaron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 400x.

[0161] Los resultados inmunohistoquímicos de los neutrófilos muestran que las células de expresión positiva (indicadas por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno (figura 24C) son menores que las del grupo de control al que se administró vehículo PBS (figura 24B), y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control en blanco (figura 24A) que al del grupo al que se administró vehículo PBS.

Ejemplo 25. El plasminógeno reduce la infiltración de neutrófilos de islotes pancreáticos en ratones con actividad PLG normal en el modelo T1DM

[0162] Once ratones macho de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG normal, se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco de 3 ratones, un grupo control de 4 ratones administrados con vehículo PBS y un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y después se inyectaron por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir diabetes mellitus tipo I [43], mientras que el grupo blanco no fue tratado. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó

un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 28 días consecutivos. El día 29, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo antineutrófilos de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector Laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 400x.

[0163] Los resultados inmunohistoquímicos de los neutrófilos muestran que las células de expresión positiva (indicadas por flecha) en el grupo administrado con plasminógeno (Figura 25C) son menores que las del grupo de control administrado con vehículo PBS (Figura 25B), y el resultado del grupo administrado con plasminógeno es más cercano al del grupo de control en blanco (Figura 25A) que al del grupo administrado con vehículo PBS.

Ejemplo 26. El plasminógeno promueve la síntesis y secreción de insulina en ratones con actividad PLG alterada en el modelo T1DM

[0164] Diez ratones macho de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG alterada, se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco de 3 ratones, un grupo control de 3 ratones administrados con PBS y un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y luego se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir diabetes mellitus tipo I ^[43], mientras que el grupo blanco no fue tratado. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo administrado con plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 mL/ratón/día por la vena de la cola, y al grupo control administrado con vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS por la vena de la cola, ambos durante 28 días consecutivos. El día 29, se sacrificó a los ratones y se tomó el páncreas y se fijó en paraformaldehído al 4%. Los tejidos de páncreas fijados se embebieron en parafina tras deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Los tejidos se marcaron con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos y, una vez transcurrido el tiempo, se desechó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota a las secciones anticuerpo de insulina de conejo anti-ratón (Abeam), se incubaron a 4°C durante toda la noche y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contrateñían con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaban con agua corriente durante 5 minutos. Tras la deshidratación con alcohol en gradiente, la permeabilización con xileno y el sellado con una goma neutra, las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

[0165] Los resultados inmunohistoquímicos muestran que la expresión positiva de insulina (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 26C) es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS (Figura 26B), y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control en blanco (Figura 26A) que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la síntesis y la secreción de insulina en ratones con una actividad PLG deficiente en un modelo de T1DM.

Ejemplo 27. El plasminógeno promueve la síntesis y expresión de insulina en ratones con actividad PLG normal en el modelo T1DM

[0166] Once ratones macho de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG normal, se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo de control en blanco de 3 ratones, un grupo de control de 4 ratones administrados con vehículo PBS y un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y luego se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir diabetes mellitus tipo I ^[43], mientras que el grupo blanco no fue tratado. 12 días después la inyección, se realizó la administración y se fijó este día como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 mL/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, ambos con una duración de 28 días consecutivos. El día 29, los

ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-insulina de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0167] Los resultados inmunohistoquímicos muestran que la expresión positiva de insulina (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 27C) es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS (Figura 27B), y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control en blanco (Figura 27A) que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la síntesis y la expresión de insulina en ratones con una actividad PLG normal en un modelo de T1DM.

Ejemplo 28. El plasminógeno promueve la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF-κB, en islotes pancreáticos de ratones con actividad PLG alterada en el modelo T1DM

[0168] Diez ratones macho de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG alterada, se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco de 3 ratones, un grupo control de 3 ratones administrados con PBS y un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y luego se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una sola dosis, para inducir diabetes mellitus tipo I ^[43], mientras el grupo en blanco no fue tratado. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 28 días consecutivos. El día 29, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 µm. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo anti-ratón NF KB (Cell Signal) a las secciones, se incubó a 4°C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0169] Como factor de transcripción nuclear multidireccional, NF-κB está involucrado en varias regulaciones genéticas después de ser activado, como la proliferación celular, apoptosis, inflamación e inmunidad ^[24].

[0170] Los resultados experimentales muestran que la expresión de NF-κB (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 28C) es notablemente mayor que en el grupo de control al que se administró vehículo PBS (Figura 28B). Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF-κB.

Ejemplo 29. El plasminógeno promueve la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF-κB, en islotes pancreáticos de ratones diabéticos de 18 semanas

[0171] Siete ratones macho db/db de 18 semanas de edad se pesaron y se dividieron aleatoriamente, según el peso corporal, en dos grupos, un grupo de 3 ratones administrados con plasminógeno y un grupo control de 4 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día por la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS por la vena de la cola, durando ambos 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron

5 embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo anti-ratón NF- κ B (Cell Signal) a las secciones, se incubó a 4°C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 10 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

15 **[0172]** Los resultados del experimento de la presente invención muestran que la expresión de NF- κ B (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno (figura 29B) es notablemente mayor que en el grupo de control al que se administró vehículo PBS (figura 29A). Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B.

20 **Ejemplo 30. El plasminógeno promueve la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B, en ratones diabéticos**

25 **[0173]** Se pesaron nueve ratones db/db machos y tres ratones db/m machos, de 26 semanas de edad, y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, según su peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento, es decir, el día 0; además, los ratones db/m se utilizaron como grupo de control normal. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS y este día se registró como día 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados y se tomó el páncreas y se fijó en paraformaldehído al 4%. Los tejidos de páncreas fijados se parafinaron tras deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos y, una vez transcurrido el tiempo, se desechó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo NF- κ B de conejo anti-ratón (Cell Signal) a las secciones, se incubaron a 4°C durante toda la noche y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., EE.UU.). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contrateñían con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaban con agua corriente durante 5 minutos. Tras la deshidratación con alcohol en gradiente, la permeabilización con xileno y el sellado con una goma neutra, las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

45 **[0174]** Los resultados experimentales muestran que la expresión de NF- κ B (indicada por flecha) en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 30C) es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS (Figura 30B), y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control normal (Figura 30A) que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión del factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B en ratones diabéticos relativamente viejos (de 26 semanas).

50 **Ejemplo 31. Plasminógeno promueve la expresión de TNF- α en islotes pancreáticos de ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad**

55 **[0175]** Se pesaron 11 ratones db/db machos y 5 ratones db/m machos, de 24-25 semanas de edad, y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, según su peso corporal, en dos grupos, un grupo de 5 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 6 ratones administrados con vehículo PBS, el día en que comenzó el experimento que se registró como día 0; además, los ratones db/m se utilizaron como grupo de control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola o sin líquido, ambos con una duración de 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos de páncreas fijados se incluyeron en parafina tras deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El grosor de las secciones de tejido fue de 3 m m. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Los tejidos se marcaron con un rotulador PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos y, una vez

transcurrido el tiempo, se desechó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo anti-TNF- α de conejo y ratón (Abeam) a las secciones, se incubaron a 4°C durante toda la noche y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., EE.UU.). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se contrateñían con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaban con agua corriente durante 5 minutos. Tras la deshidratación con alcohol en gradiente, la permeabilización con xilenohe y el sellado con una goma neutra, las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

[0176] El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es producido principalmente por monocitos/macrófagos activados y es un factor proinflamatorio importante ^[48].

[0177] Los resultados de la investigación de este experimento muestran que la expresión positiva de TNF- α en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 31C) es notablemente superior a la del grupo de control al que se administró vehículo PBS (Figura 31B), y el resultado del grupo al que se administró plasminógeno es más cercano al del grupo de control normal (Figura 31A) que al del grupo al que se administró vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión de TNF- α en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas.

Ejemplo 32. Plasminógeno promueve expresión de TNF- α en islote pancreático de ratones diabéticos de 26 semanas

[0178] Se pesaron nueve ratones db/db machos y tres ratones db/m machos, de 26 semanas de edad, y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, según su peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento, es decir, el día 0; además, los ratones db/m se utilizaron como grupo de control normal. A partir del día 1, se administró plasminógeno o PBS. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y a los ratones del grupo control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola o sin líquido, ambos con una duración de 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de conejo anti-TNF- α de ratón (Abeam) a las secciones, se incubó a 4 °C durante la noche y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contrateñieron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0179] Los resultados de la investigación muestran que la expresión positiva de TNF- α en el grupo administrado con plasminógeno (figura 32C) son notablemente superiores a los del grupo de control administrado con vehículo PBS (figura 32B), y el resultado del grupo administrado con plasminógeno se aproxima más al del grupo de control normal (figura 32A) que al del grupo administrado con vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión de TNF- α en ratones diabéticos de 26 semanas de edad.

Ejemplo 33. Plasminógeno promueve la expresión de TNF- α en islotes pancreáticos de ratones con actividad PLG alterada en modelo T1DM

[0180] Siete ratones macho de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG deteriorada se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo de control de 3 ratones administrados con PBS y un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno. Los dos grupos de ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir diabetes mellitus tipo I ^[43]. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmína humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró PBS vehicular se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 28 días consecutivos. El día 29, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron y se lavaron con agua una vez. Los tejidos se marcaron con un rotulador PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector laboratories, Inc., EE.UU.) durante 30 minutos y, una vez transcurrido el tiempo, se desechó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de

conejo anti-ratón TNF- α (Abeam) a las secciones, se incubaron a 4°C durante toda la noche y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario, anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (HRP) (Abeam), durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se revelaron con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., EE.UU.). Después de lavarlas con agua tres veces, las secciones se teñían con hematoxilina durante 30 segundos y se enjuagaban con agua corriente durante 5 minutos. Tras la deshidratación con alcohol en gradiente, la permeabilización con xileno y el sellado con una goma neutra, las secciones se observaron al microscopio óptico a 200x.

[0181] Los resultados de la investigación de este experimento muestran que la expresión positiva de TNF- α en el grupo al que se administró plasminógeno (Figura 33B) es notablemente mayor que en el grupo de control al que se administró vehículo PBS (Figura 33A). Esto indica que el plasminógeno puede promover la expresión de TNF- α en ratones con actividad PLG alterada en un modelo de T1DM.

Ejemplo 34. El plasminógeno alivia el deterioro de los islotes pancreáticos en ratones con actividad PLG alterada en el modelo T1DM

[0182] Diez ratones macho de 9 a 10 semanas de edad con actividad PLG alterada, se dividieron aleatoriamente en tres grupos, un grupo control en blanco de 3 ratones, un grupo control de 3 ratones administrados con PBS y un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y luego se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de STZ (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir diabetes mellitus tipo I^[43], mientras que el grupo blanco no fue tratado. 12 días después de la inyección, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmina humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola, durando ambos 28 días consecutivos. El día 29, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en para-formaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Los tejidos se rodearon con una pluma PAP, se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos y se lavaron con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones se bloquearon con suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, Inc., EE. UU.) durante 30 minutos, y una vez transcurrido el tiempo, se descartó el líquido de suero de cabra. Se añadió gota a gota anticuerpo de cabra anti-IgM de ratón (HRP) (Abeam) a las secciones, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó con PBS 0,01 M dos veces durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desarrolladas con un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA). Después de lavar con agua tres veces, las secciones se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos y se lavaron con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0183] Los anticuerpos IgM desempeñan un papel importante durante el aclaramiento de las células apoptóticas y necróticas, y el nivel local de anticuerpos IgM en el lugar de la lesión en los tejidos y órganos se correlaciona positivamente con el grado de lesión^[49, 50]. Por lo tanto, la detección del nivel local de anticuerpos IgM en tejidos y órganos puede reflejar la lesión de los tejidos y órganos.

[0184] Los resultados de la investigación muestran que la expresión positiva de IgM en el grupo administrado con plasminógeno (figura 34C) es notablemente inferior a la del grupo de control administrado con vehículo PBS (figura 34B), y el resultado del grupo administrado con plasminógeno es más próximo al del grupo de control en blanco (figura 34A) que al del grupo administrado con vehículo PBS. Esto indica que el plasminógeno puede reducir la expresión de IgM, sugiriendo que el plasminógeno puede aliviar la alteración de los islotes pancreáticos en ratones con actividad PLG alterada en un modelo T1DM.

Ejemplo 35. El plasminógeno reduce la apoptosis de las células de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos de 24 a 25 semanas de edad

[0185] Se pesaron 11 ratones db/db machos y 5 ratones db/m machos, de 24-25 semanas de edad, y los ratones db/db se dividieron aleatoriamente, según su peso corporal, en dos grupos, un grupo de 5 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 6 ratones administrados con vehículo PBS, el día en que comenzó el experimento que se registró como día 0; además, los ratones db/m se utilizaron como grupo de control normal. A partir del primer día, se administró plasminógeno o PBS. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola o sin líquido, ambos con una duración de 31 días consecutivos. El día 32, los ratones fueron sacrificados, y el páncreas fue tomado y fijado en paraformaldehído al 4%. Los tejidos páncreas fijados fueron embebidos en parafina después de la deshidratación con gradiente de alcohol y permeabilización con xileno. El espesor de las secciones de tejido fue de 3 μ m. Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas y lavadas con agua una vez. Se rodeó un tejido con una pluma PAP, y se añadió gota a gota una solución de proteinasa K a cubrir el tejido, incubar a temperatura ambiente durante 7 min, y lavar tres veces con PBS 0,01 M durante 3 min cada vez. Un líquido mixto de reactivo 1 y reactivo 2 (5 : 45) del kit TÚNEL (Roche) se añadió a las secciones

gota a gota, se incubó a una temperatura constante de 37 °C durante 40 min, y se lavó con PBS 0,01 M tres veces durante 3 minutos cada vez. Una solución acuosa de peróxido de hidrógeno al 3% (peróxido de hidrógeno:metanol = 1 : 9) preparado utilizando metanol se añadió a las secciones gota a gota, se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad, y se lavó con PBS 0,01 M tres veces durante 3 minutos cada vez. Se añadió gota a gota un reactivo 3 del kit de túnel a las secciones, se incubó a una temperatura constante de 37 °C durante 30 min y se lavó con PBS 0,01 M tres veces. Se aplicó un kit DAB (Vector laboratories, Inc., USA) para el desarrollo. Después de lavar con agua tres veces, se llevó a cabo la contratinción con hematoxilina durante 30 segundos seguido de enjuague con agua corriente durante 5 minutos. Después de deshidratación con gradiente de alcohol, permeabilización con xileno y sellado con goma neutra, se observaron las secciones bajo microscopio óptico a 200x.

[0186] La tinción TUNEL puede usarse para detectar la rotura del ADN nuclear en las células tisulares durante la etapa tardía de la apoptosis.

[0187] Los resultados de este experimento muestran que el número de células positivas (indicado por la flecha) en el grupo administrado con plasminógeno (Figura 35C) es notablemente menor que en el grupo de control administrado con vehículo PBS (Figura 35B). La tinción positiva con TUNEL es extremadamente baja en el grupo control normal (Figura 35A). La tasa de apoptosis del grupo de control normal es de aproximadamente 8%, la tasa de apoptosis en el grupo administrado con vehículo PBS es de aproximadamente 93% y la tasa de apoptosis en el grupo administrado con plasminógeno es de aproximadamente 16%. Esto indica que el grupo de plasminógeno puede reducir significativamente la apoptosis de las células de los islotes pancreáticos en ratones diabéticos.

Ejemplo 36. Plasminógeno reduce el nivel de fructosamina sérica en ratones diabéticos de 26 semanas de edad

[0188] Nueve ratones db/db machos de 26 semanas de edad fueron pesados y divididos aleatoriamente, según su peso corporal, en dos grupos, un grupo de 4 ratones administrados con plasminógeno y un grupo de control de 5 ratones administrados con vehículo PBS, el día que comenzó el experimento que se registró como día 0. A los ratones del grupo al que se administró plasminógeno se les inyectó plasminógeno humano a una dosis de 2 mg/0,2 ml/ratón/día por la vena de la cola, y a los ratones del grupo de control al que se administró vehículo PBS se les inyectó un volumen igual de PBS por la vena de la cola. Se administró plasminógeno o PBS a los ratones desde el día 1 durante 35 días consecutivos. El día 36, los ratones fueron sacrificados para detectar la concentración de fructosamina sérica. La concentración de fructosamina se midió utilizando un kit de detección de fructosamina (A037-2, Nanjing Jiancheng).

[0189] Los resultados de la detección muestran que la concentración de fructosamina sérica en el grupo administrado con plasminógeno es notablemente menor que en el grupo de control administrado con vehículo PBS, y la diferencia estadística es casi significativa ($P = 0,06$) (Figura 36). Esto indica que el plasminógeno puede reducir la glucosa en sangre glicosamina en ratones diabéticos de 26 semanas de edad.

Ejemplo 37. El plasminógeno aumenta la capacidad de descomposición de la glucosa en ratones modelo T1DM

[0190] Ocho ratones macho C57 de 9 a 10 semanas de edad se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo de control al que se administró vehículo PBS y un grupo al que se administró plasminógeno, con 4 ratones en cada grupo. Los ratones del grupo al que se administró vehículo PBS y el grupo al que se administró plasminógeno se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y después se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de estreptozotocina (STZ) (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir T1DM [43]. 12 días después de la inyección de STZ, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmína humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día por la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS por la vena de la cola. La administración se llevó a cabo durante 19 días consecutivos. El día 20, después de ayunar a los ratones durante 6 horas, se administró glucosa al 20% por vía intragástrica a 2 g/kg de peso corporal, y después de 60 minutos, se extrajo sangre del plexo venoso orbital y se centrifugó para obtener un sobrenadante, que se detectó para glucosa en sangre mediante un kit de ensayo de glucosa (Rongsheng, Shanghai, 361500).

[0191] Los resultados muestran que el nivel de glucosa en sangre de los ratones en el grupo de control administrado con vehículo PBS es notablemente mayor que el de los ratones en el grupo administrado con plasminógeno, y la diferencia estadística es significativa ($P = 0,04$) (Figura 37). Esto indica que el plasminógeno puede mejorar la capacidad de descomposición de la glucosa en ratones T1DM, reduciendo así la glucosa en sangre.

Ejemplo 38. El plasminógeno mejora la secreción de insulina en ratones modelo de T1DM

[0192] Seis ratones macho C57 de 9 a 10 semanas de edad se dividieron aleatoriamente en dos grupos, un grupo de control al que se administró vehículo PBS y un grupo al que se administró plasminógeno, con 3 ratones en cada grupo. Los dos grupos de ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 horas y se les inyectó por vía intraperitoneal 200 mg/kg de estreptozotocina (STZ) (Sigma S0130), en una dosis única, para inducir T1DM [43]. 12 días después de la inyección de STZ, se llevó a cabo la administración y este día se fijó como día de administración 1. Al grupo al que se administró plasminógeno se le inyectó plasmína humana a una dosis de 1 mg/0,1 ml/ratón/día a través de la vena de la cola, y al grupo de control al que se administró vehículo PBS se le inyectó un volumen igual de PBS a través de la vena de la cola.

La administración se llevó a cabo durante 20 días consecutivos. El día 21, los ratones estuvieron en ayunas durante 6 horas, y luego se extrajo sangre del plexo venoso en los globos oculares, se centrifugó la sangre para obtener un supracurtido y se detectó la concentración de insulina sérica utilizando un kit de detección de insulina (Mercodia AB) según las instrucciones de operación.

[0193] Los resultados muestran que la concentración de insulina en los ratones en el grupo de control administrado con vehículo PBS es notablemente menor que la de los ratones en el grupo administrado con plasminógeno, y la diferencia estadística es casi significativa ($P = 0.08$) (Figura 38). Esto indica que el plasminógeno puede promover la secreción de insulina en ratones T1DM.

Referencias:

[0194]

- [1] International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas [M]. 7th ed. Brussels: Karakas Print, 2015: 13.
- [2] Lopez AP, de Dios A, Chiesa I, et al. Analysis of mutations in the glucokinase gene in people clinically characterized as MODY2 without a family history of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016, 118: 38-43.
- [3] Fan M, Li W, Wang L, et al. Association of SLC30A8 gene polymorphism with type 2 diabetes, evidence from 46 studies: a meta-analysis. *Endocrine*, 2016, 53: 381-94.
- [4] Liang J, Slingerland JMI Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression[J]. *Cell Cycle*, 2003,2(4):339-451.
- [5] Dhand R, Hiles I, Panayotou G, et al. PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity[J]. *Embo J*, 1994,13(3):522-331.
- [6] Perrin AJ, Gunda M, Yu B, Yen K, Ito S, Forster S, Tissenbaum HA, Derry WB. Noncanonical control of *C. elegans* germline apoptosis by the insulin/IGF-1 and Ras/MAPK signaling pathways. *Cell Death Differ*. 2013 Jan;20(1):97-107.
- [7] Aguirre V, Uchida T, Yenush L, et al. The c-Jun N-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of ser(307)[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:9047-9054.
- [8] Hirosumi J, Tuneman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*[J]. 2002,420:333-336.
- [9] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance[J]. *Science*, 1993, 259(5091): 87-91.
- [10] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders[J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 860- 867.
- [11] Swaroop JJ, Rajarajeswari D, Naidu JN. Association of TNF- α with insulin resistance in type 2 diabetes mellitus[J]. *Indian J Med Res*, 2012, 135:127-130.
- [12] Kentish SJ, O'Donnell TA, Isaacs NJ, et al. Gastricvagal afferent modulation by leptin is influenced by food intake status[J]. *J Physiol*, 2013, 591(7): 1921-1934.
- [13] Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PI Jr, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:181643
- [14] LUOTOLA K, PIETILÄ A, ZELLER T, et al. Associations between interleukin-1(IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes[J]. *J Intern Med*, 2011, 269(3):322-332.
- [15] DONATH M Y, SHOELSON S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(2):98-107.
- [16] Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009;16(4): 763-774.
- [17] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 343-353.
- [18] Ceretta LB, Reus GZ, Abelaira HM, Ribeiro KF, Zappellini G, Felisbino FF, Steckert AV, Dal-Pizzol F, Quevedo J. Increased oxidative stress and imbalance in antioxidant enzymes in the brains of alloxan-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 302682.
- [19] Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic β -cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 168-176.
- [20] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
- [21] Drews G, Krippeit-Drews P, Dufer M. Oxidative stress and β -cell dysfunction. *Pflugers Arch* 2010; 460(4): 703-718.
- [22] Patel S, Santani D. Role of NF- κ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 595-603.
- [23] Hayden MR, Sowers JR. Isletopathy in type 2 diabetes mellitus: implications of islet RAS, islet fibrosis, islet amyloid, remodeling, and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(7): 891-910.
- [24] Mariappan N, Elks CM, Sriramula S, Guggilam A, Liu Z, Borkhsenius O, Francis J. NF- κ B-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type II diabetes. *Cardiovasc Res* 2010; 85(3): 473-483.
- [25] Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, Borcea V, Khalek A, Amiral J, Tritschler H, Ritz E, Wahl P, Ziegler R, Bierhaus A, Nawroth PP. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B. *Diabetologia* 1999; 42(2): 222-232.

- [26] Eldor R, Yeffet A, Baum K, Doviner V, Amar D, Ben-Neriah Y, Christofori G, Peled A, Carel JC, Boitard C, Klein T, Serup P, Eizirik DL, Melloul D. Conditional and specific NF-kappaB blockade protects pancreatic beta cells from diabetogenic agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(13): 5072-5077.
- 5 [27] Caamano J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(3): 414-429.
- [28] Lacraz G, Giroix MH, Kassis N, Coulaud J, Galinier A, Noll C, Cornut M, Schmidlin F, Paul JL, Janel N, Irminger JC, Kergoat M, Portha B, Donath MY, Ehes JA, Homo-Delarche F. Islet endothelial activation and oxidative stress gene expression is reduced by IL-1Ra treatment in the type 2 diabetic GK rat. *PLoS One* 2009; 4(9): e6963.
- 10 [29] Cheng CY, Hsieh HL, Sun CC, Lin CC, Luo SF, Yang CM. IL-1 beta induces urokinase-plasminogen activator expression and cell migration through PKC alpha, JNK1/2, and NF-kappaB in A549 cells. *J Cell Physiol* 2009; 219(1):183-193.
- [30] Mahadev K, Motoshima H, Wu X, Ruddy JM, Arnold RS, Cheng G, Lambeth JD, Goldstein BJ. The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* 2004; 24(5): 1844-1854.
- 15 [31] Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Insulin action is facilitated by insulin stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 2005; 54(2): 311-321.
- [32] Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawrence JTR, Goldstein BJ. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 48662-48669.
- 20 [33] Loh K, et al., Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab* 2009; 10(4): 260-272.
- [34] Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(3): 343-353.
- [35] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52(1): 1-8.
- 25 [36] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54(6): 1615-1625.
- [37] Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(5): 993-999.
- [38] Wang J, Ma H, Tong C, Zhang H, Lawlis GB, Li Y, Zang M, Ren J, Nijland MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Li J. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB J* 2010; 24(6): 2066-2076.
- 30 [39] Marder V J, Novokhatny V Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2010, 8(3): 433-444.
- [40] Hunt J A, Petteway Jr S R, Scuderi P, et al. Simplified recombinant plasmin: production and functional comparison of a novel thrombolytic molecule with plasma-derived plasmin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100(3): 413-419.
- 35 [41] Sottrup-Jensen L, Claeys H, Zajdel M, et al. The primary structure of human plasminogen: Isolation of two lysine-binding fragments and one "mini"plasminogen (MW, 38, 000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis [J]. *Progress in chemical fibrinolysis and thrombolysis*, 1978, 3: 191-209.
- [42] Nagai N, Demarsin E, Van Hoef B, et al. Recombinant human microplasmin: production and potential therapeutic properties [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 1(2): 307-313.
- 40 [43] Brian L. Furman. Streptozotocin-Induced Diabetic Models UNIT 5.47 in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70:5.47.1-5.47.20.
- [44] Parvesh Chaudhry, Mohan Singh, Sophie Parent et al. Prostate Apoptosis Response 4 (Par-4), a Novel Substrate of Caspase-3 during Apoptosis Activation. *Mol Cell Biol*. 2012 Feb; 32(4): 826-839.
- 45 [45] Patrick Viatour, Marie-Paule Merville, Vincent Bours et al. Phosphorylation of NF-kB and Ikb proteins: implications in cancer and inflammation .*TRENDS in Biochemical Science*, 2005, 30 (1) :43-52.
- [46] Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998;391:900-904.
- [47] Withers DJ, Burks DJ, Towery HH et al. White MF. Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 1999;23:32-40.
- 50 [48] Jacob CO1, Aiso S, Michie SA, McDevitt HO et al. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Feb;87(3):968-72.
- [49] Zhang M, Takahashi K, Alicot EM, Vorup-Jensen T, Kessler B, et al. Activation of the lectin pathway by natural IgM in a model of ischemia/reperfusion injury. *J Immunol*.2006. 177: 4727-4734.
- 55 [50] Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB (2002) I-PLA2 Activation during Apoptosis Promotes the Exposure of Membrane Lysophosphatidylcholine Leading to Binding by Natural Immunoglobulin M Antibodies and Complement Activation. *The Journal of Experimental Medicine* 196: 655-665.:

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de plasminógeno para su uso en el tratamiento de la diabetes reduciendo la glucosa en sangre en un sujeto diabético, en la que el plasminógeno:
- (a) tiene al menos un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 2; o (b) tiene al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 6, 8, 10 o 12, y todavía tiene la actividad del plasminógeno.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la glucosa en sangre se selecciona de uno o más de: un nivel de glucosa en suero, un nivel de fructosamina en suero y un nivel de hemoglobina glicosilada en suero.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que la glucosa en sangre es un nivel de glucosa en suero.
4. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la diabetes mellitus es T1DM o T2DM.
- 20 5. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el plasminógeno mejora la tolerancia a la glucosa en un sujeto diabético.
- 25 6. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el plasminógeno favorece el descenso postprandial de la glucemia en el sujeto diabético.
7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que el plasminógeno se administra de 30 minutos a 1,5 horas antes de que el sujeto coma.
- 30 8. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el plasminógeno promueve la utilización de glucosa o promueve la secreción de insulina en un sujeto diabético.
9. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el plasminógeno promueve la expresión y/o secreción de insulina mientras reduce la expresión y/o secreción de glucagón en el sujeto.
- 35 10. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el plasminógeno promueve la expresión del sustrato receptor de insulina 2 (IRS-2) y/o factor de transcripción nuclear multidireccional NF- κ B.
- 40 11. Composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1 a 10, en la que el plasminógeno promueve la reparación de una inflamación en el islote pancreático.
12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que el plasminógeno reduce la fibrosis pancreática de los islotes o inhibe la apoptosis de las células de los islotes pancreáticos.
- 45 13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el plasminógeno se administra en combinación con uno o más fármacos o terapias.
14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el plasminógeno tiene al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID No. 2, y todavía tiene la actividad plasminógena.
- 50 15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el plasminógeno se selecciona de Glu-plasminógeno, Lys-plasminógeno, miniplasminógeno, microplasminógeno, delta-plasminógeno o sus variantes que retienen la actividad del plasminógeno.
- 55

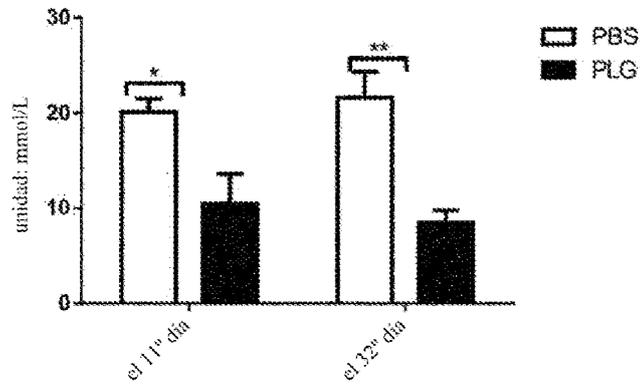


Fig.1

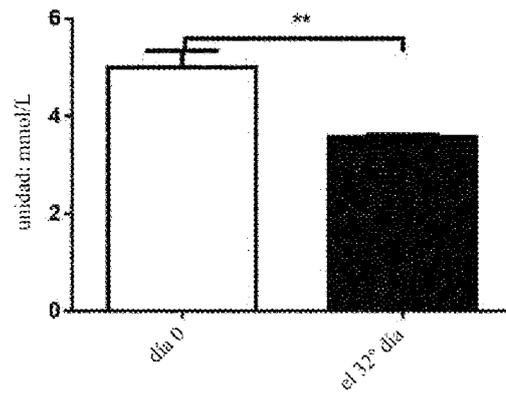


Fig.2

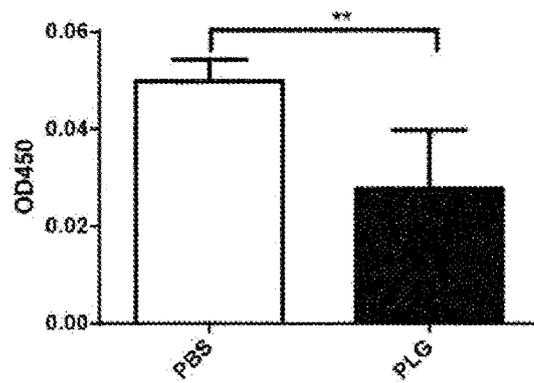


Fig.3

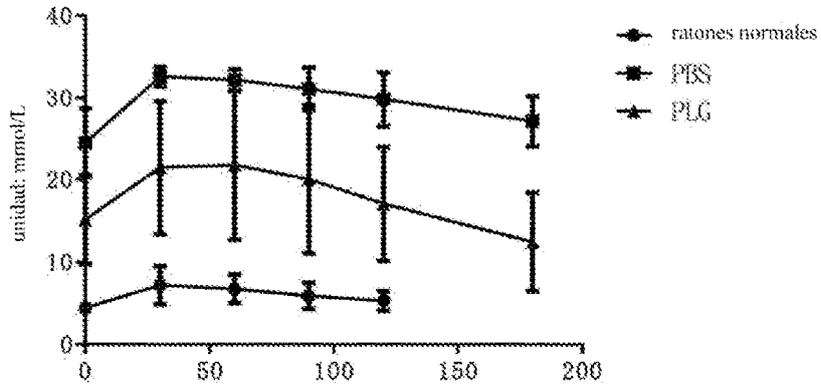


Fig.4

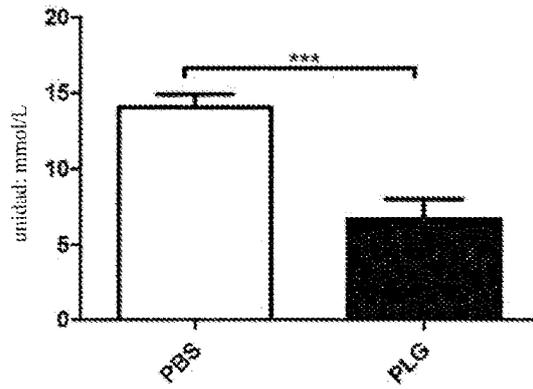


Fig.5

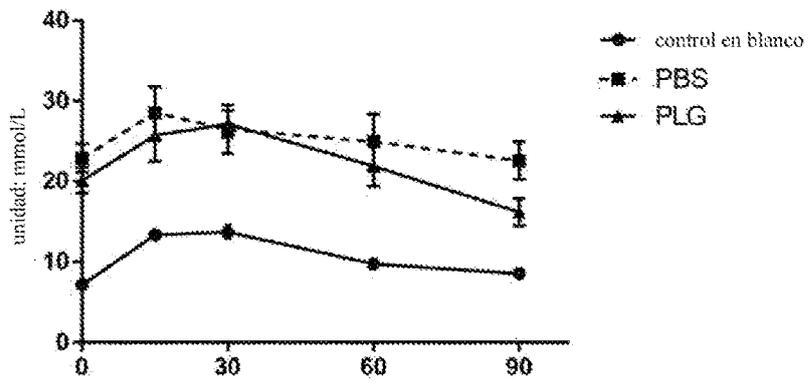


Fig.6

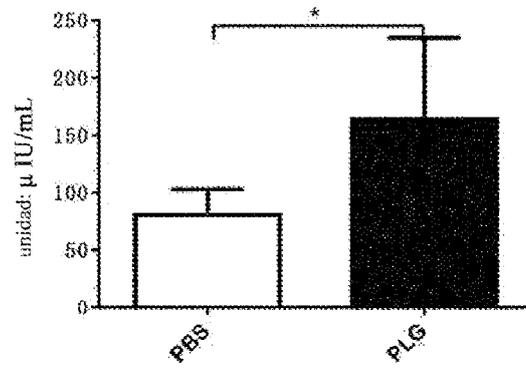


Fig.7

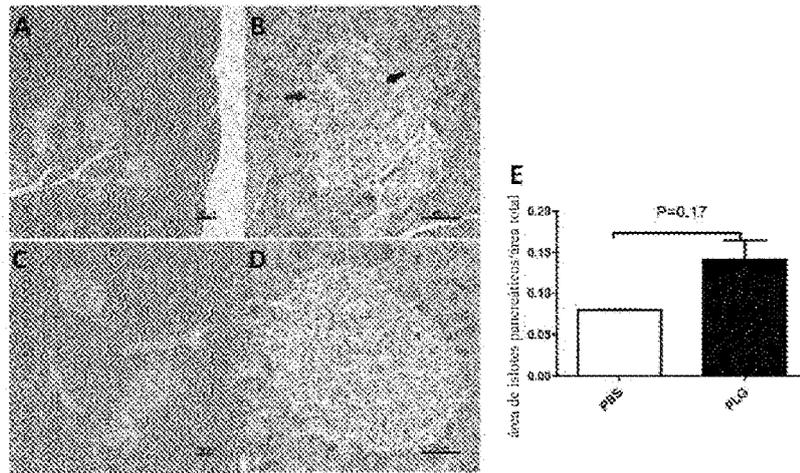


Fig.8

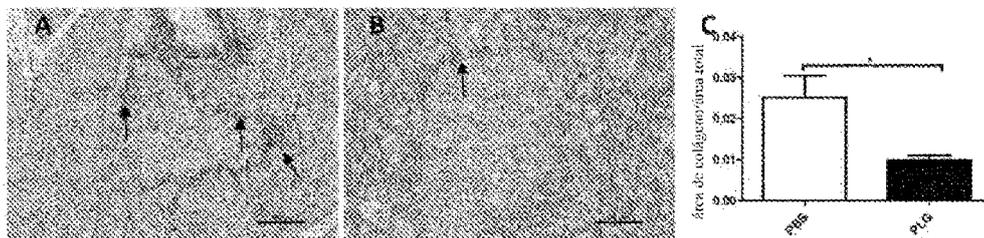


Fig.9

EP 3 556 383 B1

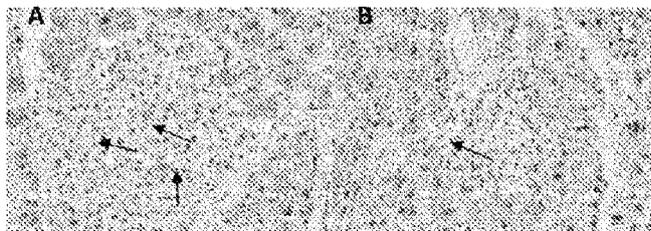


Fig.10

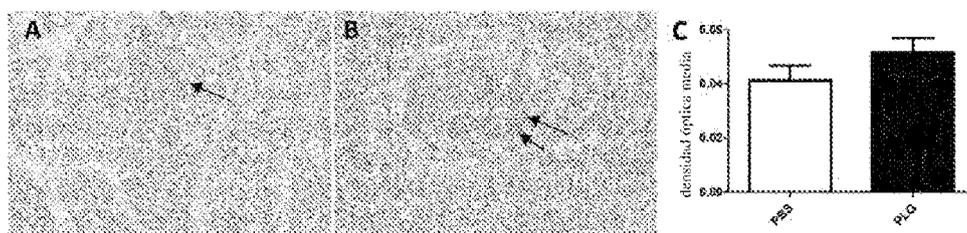


Fig.11

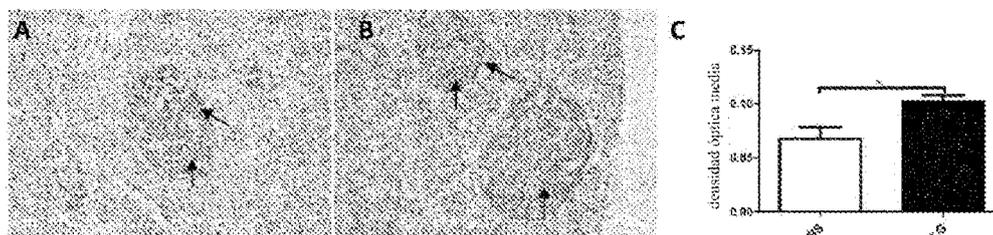


Fig.12

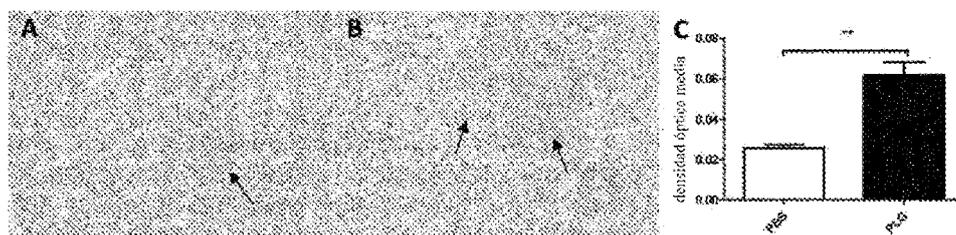


Fig.13

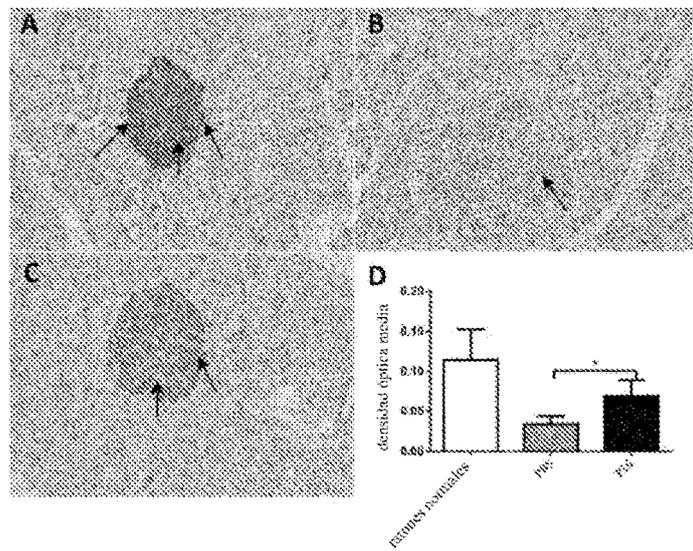


Fig.14

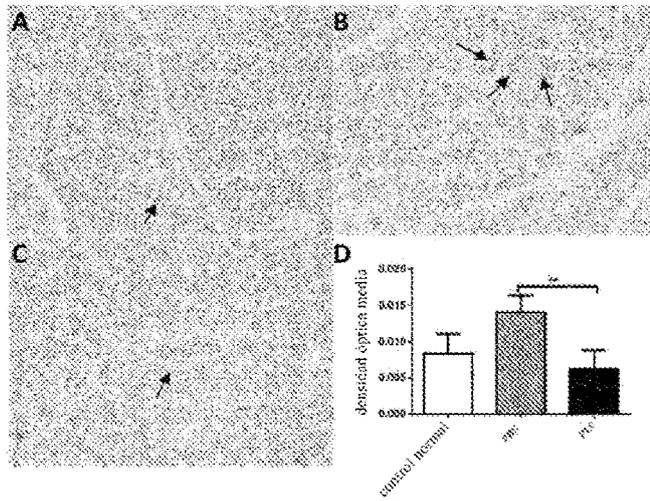


Fig.15

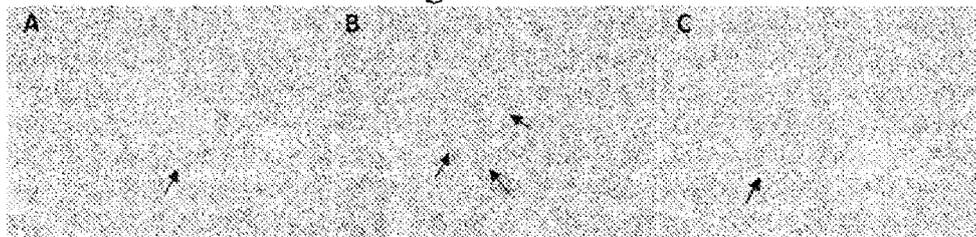


Fig.16

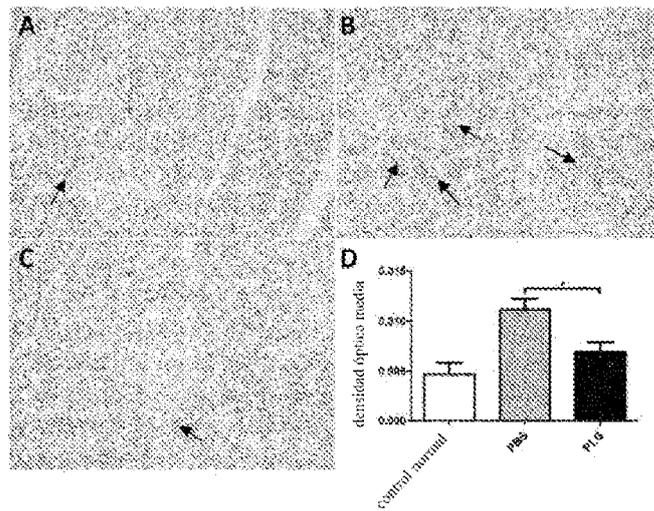


Fig.17

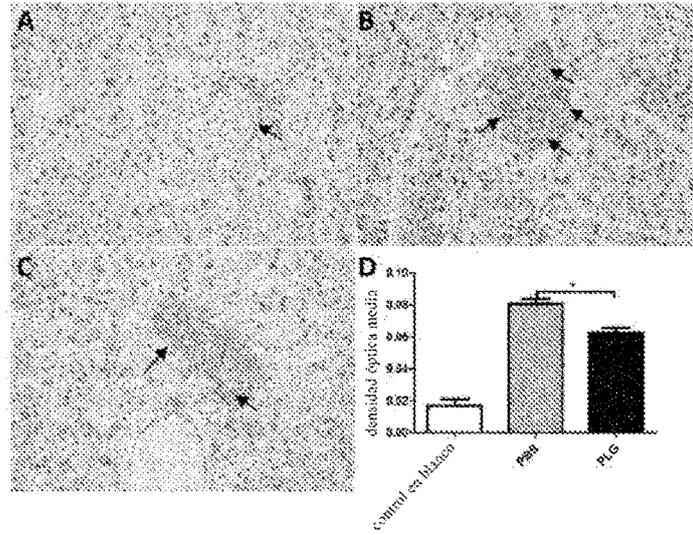


Fig.18

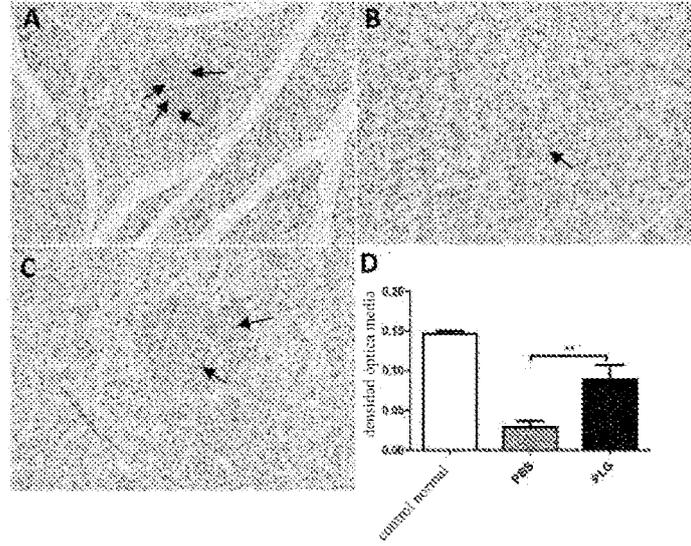


Fig.19

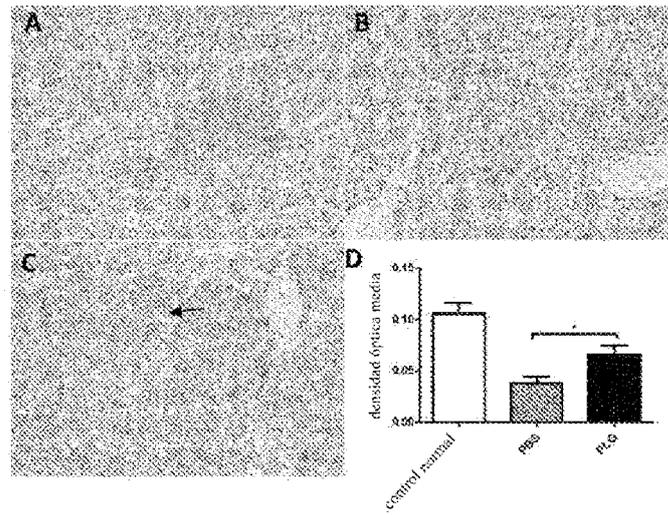


Fig.20

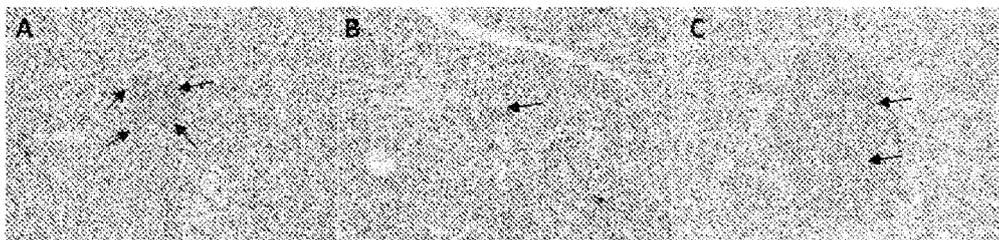


Fig.21

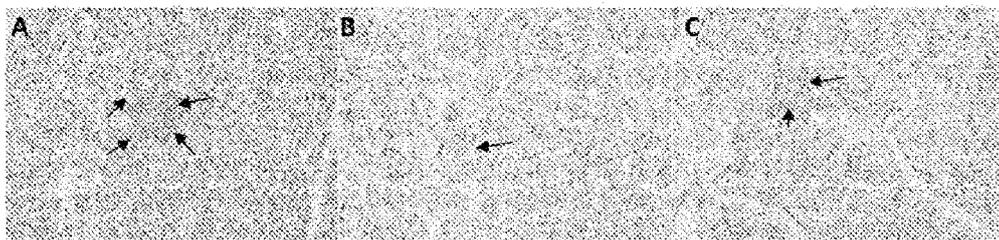


Fig.22

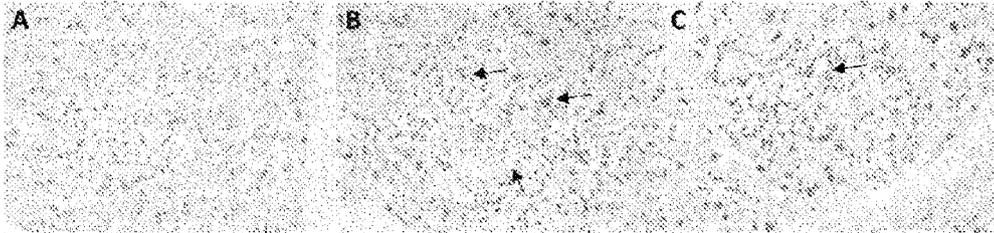


Fig.23

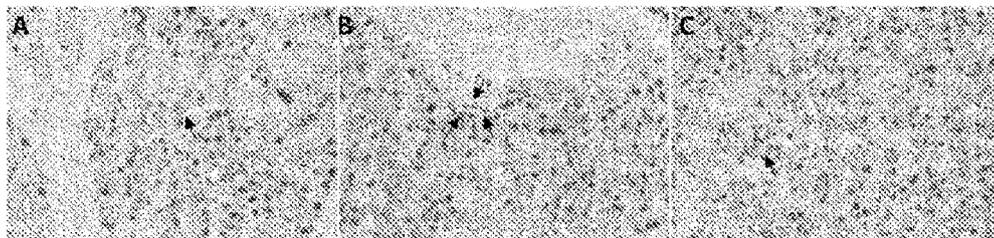


Fig.24

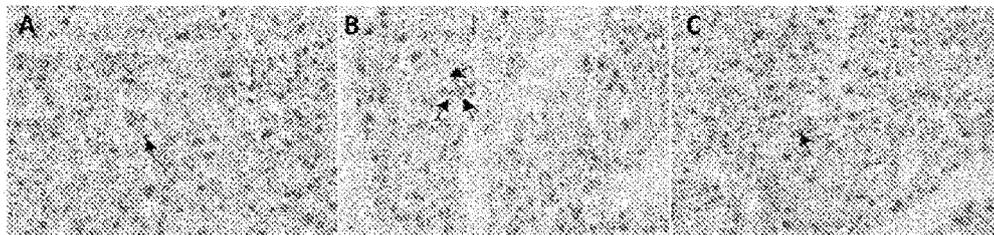


Fig.25

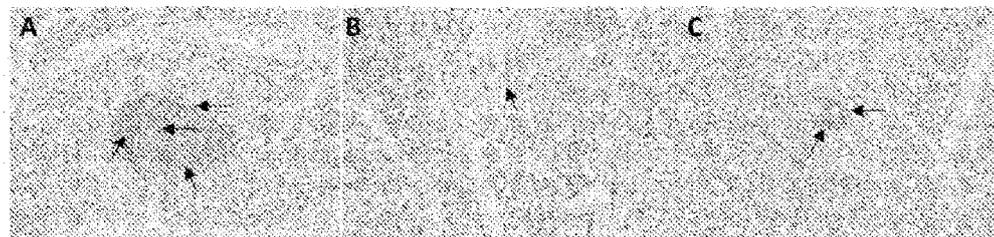


Fig.26

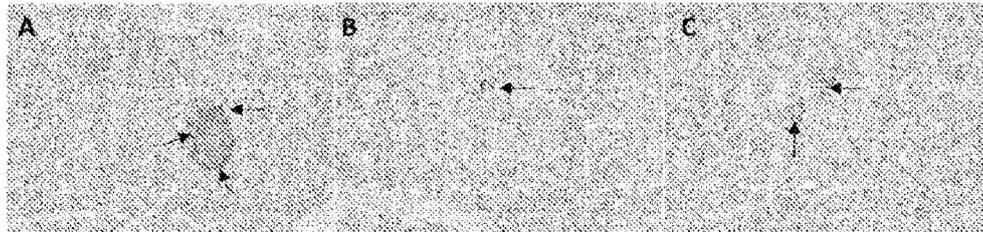


Fig.27

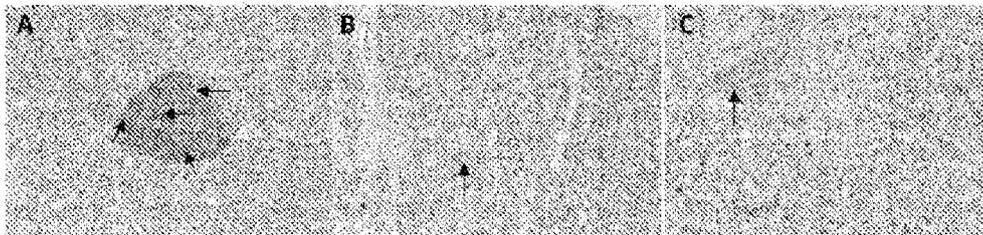


Fig.28

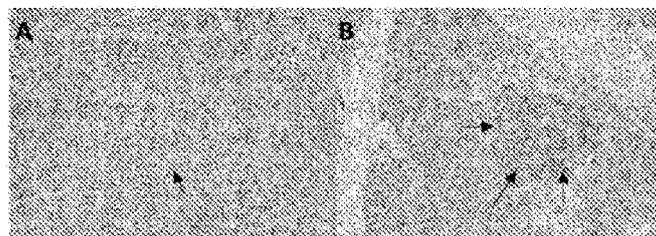


Fig.29

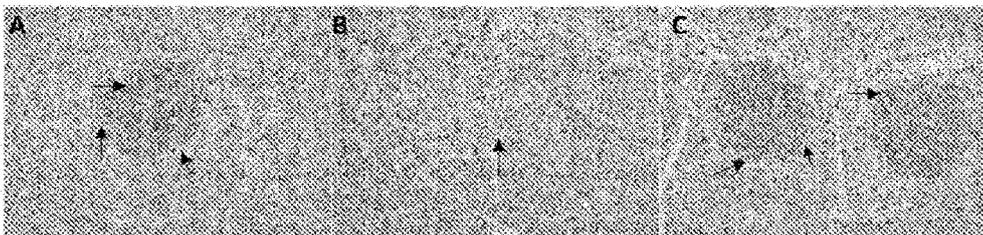


Fig.30

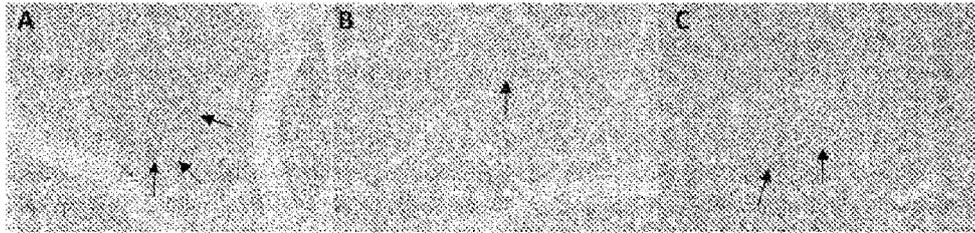


Fig.31

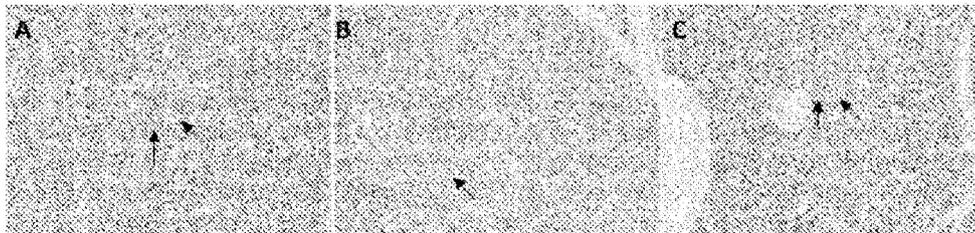


Fig.32

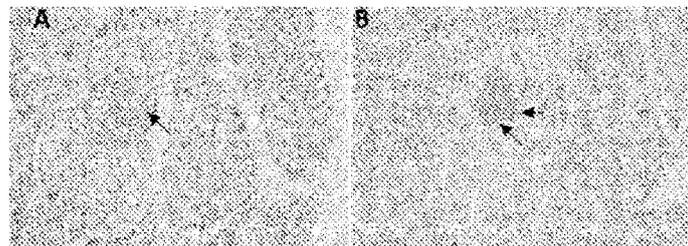


Fig.33

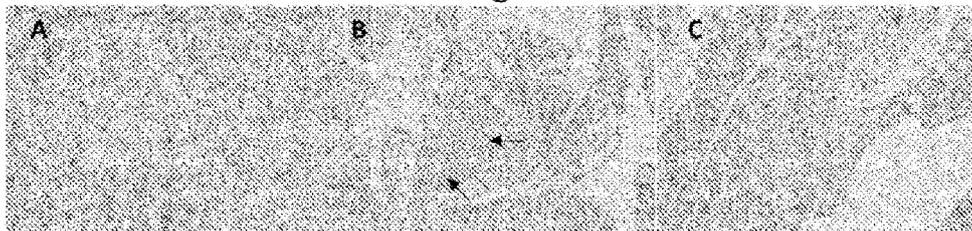


Fig.34

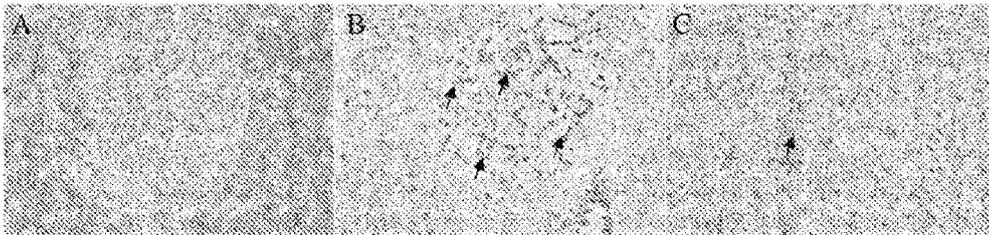


Fig.35

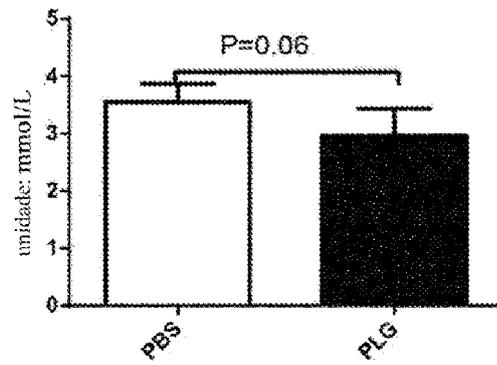


Fig.36

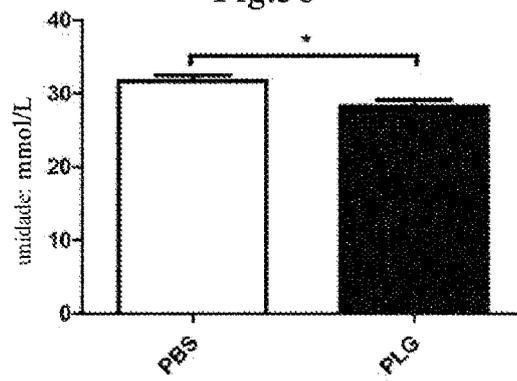


Fig.37

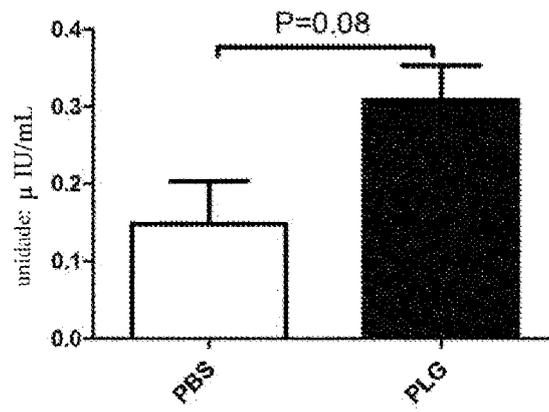


Fig.39