



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 137**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 38/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04019502 .6**

86 Fecha de presentación : **27.09.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **1486565**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.12.2004**

54

Título: **Combinación de PDGF, KGF, IGF e IGFBP para curación de heridas.**

30

Prioridad: **11.10.1995 US 5075 P**
11.07.1996 US 21540 P
25.09.1996 US 719742 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73

Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72

Inventor/es: **Williams, Lewis T.**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 293 137 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

Combinación de PDGF, KGF, IGF e IGFBP para curación de heridas.

5 **Área de la invención**

Esta invención se refiere a la utilización de un polipéptido que tiene la actividad biológica de un factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y de un polipéptido que tiene la actividad biológica del factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) y de un polipéptido que tiene la actividad biológica de un factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1 o IGF-2) en la fabricación de un medicamento. La combinación es útil para el tratamiento o prevención del daño en células epiteliales, constituyendo una mejora respecto a métodos previos para el tratamiento del daño en células epiteliales. La invención se refiere además a la utilización de un polipéptido que tiene la actividad biológica de una proteína transportadora del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP) en combinación con la combinación PDGF/KGF/IGF de la invención.

15 **Antecedentes de la invención**

La solicitud de patente EP 0 619 370 describe la utilización de KGF para la cicatrización de heridas. También puede utilizarse PDGF para la cicatrización de heridas debido a su capacidad de estimular células derivadas del mesénquima, como se describe en la Patente de EEUU No. 5.187.263.

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina, IGF e IGF-2, han sido descritos y estudiados en este campo. IGF está descrito en Rinderknecht, *J. Biol. Chem.* 253: 2769 (1978), y se ha visto que actúa como un mitógeno en varios tipos celulares distintos como se describe en EP 0 128 733. De manera similar a la insulina, los IGF estimulan la fosforilación de restos de tirosina específicos del dominio citoplásmico de los receptores a los que se unen los IGF, como se describe en WO 93/98826. IGF-II se describe en Rinderknecht, *FEBS Letters*, (1978) 89: 283.

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina también se conocen como somatomedinas, y se han identificado en varias especies de animales como polipéptidos que actúan estimulando el crecimiento de células en diferentes tejidos y tipos celulares, particularmente durante el desarrollo. Los efectos de estimulación del crecimiento de las somatomedinas incluyen incremento de la multiplicación celular y la estimulación de la proliferación del cartílago, estimulación del transporte de aminoácidos, estimulación de la síntesis de ARN, ADN y proteínas, y estimulación de la incorporación de sulfato en proteoglicanos y de prolina en colágeno. Una gran parte del crecimiento postnatal en mamíferos se debe a la estimulación del crecimiento del cartílago por las somatomedinas y el crecimiento en el útero también puede ser dependiente de las somatomedinas.

Los usos de IGF como un agente conocido que estimula y promueve el crecimiento, incluyen su utilización en la reparación de huesos y en terapia de reemplazamiento, como se describe en EP 303 855; como un medio para contrarrestar determinados efectos secundarios perjudiciales de los medicamentos carcinostáticos, como se describe en JP 63-196.524; y como un medio para incrementar la producción de leche y de carne del ganado vacuno y de otros animales de granja, como se describe en la Patente de EEUU No. 4.783.524.

También se ha visto que IGF-I es útil en el tratamiento de la osteoporosis en mamíferos que presentan una densidad disminuida de los minerales en los huesos corticales y en aquellos expuestos a medicamentos o a condiciones medioambientales que resultan en una reducción de la densidad ósea y en una condición potencial de osteoporosis, como se describe en EP 560 723 y en EP 436 469.

Se ha administrado IGF-I con polisulfato de pentosán sódico (PPS) a caninos osteoartroticos graves con el efecto de reducir la gravedad de la enfermedad mediante una disminución de los niveles de metaloproteínasa neutra activa en el cartílago. En el modelo de caninos osteoartroticos leves, la intervención terapéutica con IGF-I y PPS juntos, parece que mantiene de manera exitosa la estructura y la bioquímica del cartílago, mientras que IGF solo no resultó eficaz, como se describe en Rogachefsky, *Osteoarthritis and Cartilage*, (1993) 1:105-114.

Las proteínas transportadoras de los IGF se han estudiado de manera extensa, y actualmente se conocen seis IGFBP (IGFBP1-6). Las IGFBP forman complejos con IGF-I e IGF-II en el plasma y se cree que funcionan como proteínas transportadoras de hormonas proteicas, regulando la disponibilidad, la actividad, y alargando la vida media de la hormona proteica que transportan. Mientras IGFBP-3, un complejo de 150 kDa, es la IGFBP más abundante en el plasma y se cree que funciona como un transportador y reservorio de IGF-I en el plasma, IGFBP-1 es una proteína de transporte pequeña de 25 kDa producida principalmente en el hígado y en los fibroblastos, y puede distribuirse entre la circulación y los tejidos, regulando, de esta manera, la biodisponibilidad de IGF en ambos compartimentos como se describe en Tsuboi *et al.*, *J. of Inv. Derm.* 104:199-203 (1995). Se ha descrito que IGF es útil para la cicatrización de heridas en combinación con IGFBP, como se describe en Tsuboi *et al.*, *J. of Inv. Derm.* 104: 199-203 (1995), Kratz *et al.*, *Scand J. Plast Reconstr Hand Surg.* 28: 107-112 (1994), y Jyung *et al.*, *Surgery* 115: 233-239 (1994).

La expresión de IGF se ha asociado a la cicatrización de heridas como se describe en Gartner *et al.*, *J. Surg. Res.* 52: 389-394 (1992), y Steenfos y Jansson, *Eur. J. Surg.* 158: 327-331 (1992). Adicionalmente, se ha descrito que IGF

es útil cuando se administra en combinación con PDGF para la cicatrización de heridas como se describe en la Patente de EEUU No. 4.861.757.

Por lo tanto, sería ventajoso si se pudiera encontrar una composición mejorada que tuviera propiedades mejoradas respecto a la administración de PDGF solo, respecto a la administración de KGF solo, respecto a PDGF con IGF, y respecto a IGF solo, y respecto a IGF con IGFBP.

Además, EP 0 568 334 A1 proporciona esponjas que contienen colágeno que comprenden una esponja de gelatina absorbible, colágeno, y un ingrediente activo, así como métodos para incrementar la cicatrización de heridas de las heridas externas e internas utilizando dichas esponjas. El ingrediente activo preferido es PDGF.

Además, WO 92/14480 describe un método que utiliza GM-CSF y G-CSF para promover la cicatrización acelerada de heridas en mamíferos. Este método comprende administrar tópicamente al mamífero una cantidad eficaz terapéuticamente de uno de estos dos polipéptidos, o una mezcla de uno de estos dos polipéptidos y al menos otra proteína más.

Compendio de la invención

Es, por lo tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar una composición mejorada para el tratamiento o prevención del daño en células epiteliales.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona la utilización de un primer polipéptido que tiene la actividad biológica de un factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y un segundo polipéptido que tiene la actividad biológica del factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) y un tercer polipéptido que tiene la actividad biológica del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) en la fabricación de un medicamento para utilizarse en la reparación o prevención del daño en células epiteliales.

La utilización puede incluir además un cuarto polipéptido que tiene la actividad biológica de una proteína transportadora de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFBP).

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona la utilización de una primera molécula de ADN, una segunda molécula de ADN y una tercera molécula de ADN, donde la primera molécula de ADN comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica PDGF, la segunda molécula de ADN comprende una segunda secuencia de nucleótidos que codifica KGF y la tercera molécula de ADN comprende una tercera secuencia de nucleótidos que codifica IGF en la fabricación de un medicamento para utilizarse en la reparación o prevención del daño en células epiteliales.

La utilización puede comprender además una cuarta molécula de ADN que comprende una cuarta secuencia de nucleótidos que codifica IGFBP.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Esta descripción que aparece en la presente memoria se inspira en trabajos publicados previamente tales como artículos científicos, patentes publicadas o solicitudes de patentes.

La presente invención puede entenderse mejor gracias a las definiciones siguientes.

Definiciones

A no ser que se proporcione otra cosa de manera expresa en la presente memoria, el término "factor de crecimiento derivado de las plaquetas" o "PDGF" incluye el polipéptido de la cadena A del PDGF y el polipéptido de la cadena B del PDGF y los dímeros AA, BB, y AB, y los fragmentos, análogos, y derivados de éstos activos biológicamente, como se describe en la Patente de EEUU No. 5.187.263; Waterfield *et al.*, *Nature* 304: 35-39 (1983); Wang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 259: 10645-48 (1984), Antoniades *et al.*, *Biochem. Pharm.* 33: 2833-38 (1984); y Westermarck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7197-7200 (1986); Patente de EEUU No. 5.219.759.

También, a no ser que se proporcione otra cosa de manera expresa en la presente memoria, el término "factor de crecimiento de los queratinocitos" o "KGF" se refiere a uno cualquiera de los polipéptidos maduros y a los fragmentos, análogos y derivados de éstos activos biológicamente, como se describe en WO 90/08771 y en WO 95/01434.

El término "factor de crecimiento semejante a la insulina", tal y como se utiliza en la presente memoria, incluye IGF-I e IGF-II en sus formas purificada, nativa, producida de manera recombinante, o sintetizada químicamente, e incluye los fragmentos, análogos, mutéfnas, incluyendo las mutéfnas con delección en el extremo C-terminal, y derivados de éstos activos biológicamente, que retienen la actividad IGF y/o la capacidad de unirse a los receptores de IGF, como se describe, por ejemplo, en EP 135 094, WO 85/00831, Patente de EEUU No. 4.738.921, WO 92/04363, Patente de EEUU No. 5.158.875, EP 123 228, y EP 128 733. Un análogo de IGF o un análogo del fragmento incluye IGF nativo que ha sido modificado por uno o más de inserción, delección o sustitución de aminoácidos que no afectan sustancialmente sus propiedades. Preferiblemente, el análogo tiene una actividad incrementada comparado con el IGF

nativo. Más preferiblemente, un incremento de al menos 2 veces, más preferiblemente un incremento de al menos 7-10 veces. Por ejemplo, el análogo puede incluir sustituciones conservativas de aminoácidos. Un análogo de IGF también incluye péptidos que tienen uno o más mimetizadores de péptidos (“peptoides”), como los descritos en WO 91/04282. Una muteína de IGF es una variante de polipéptido con uno o más aminoácidos alterados para producir una característica deseada, como reemplazar un resto de cisteína por un aminoácido que no forme enlaces disulfuro. Las muteínas, los análogos y los derivados pueden generarse utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, se puede utilizar mutagénesis PCR. Aunque la discusión siguiente se refiere a ADN, se entiende que la técnica también se puede aplicar a ARN. Un ejemplo de una técnica PCR se describe en WO 92/22653. Otro método para obtener análogos, muteínas, y derivados, es mutagénesis en cassette basada en la técnica descrita por Wells, *Gene*, (1985) 34: 315.

El término “proteína transportadora de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFBP)” se refiere a una proteína transportadora que se ha visto una IGF como se describe e identifica en Keifer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266: 9043-9 (1991), Camacho-Hubner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 11949-56 (1992), McCusker y Clemens, THE INSULIN LIKE GROWTH FACTORS: STRUCTURE AND BIOLOGICAL FUNCTIONS, Oxford Univ. Press, N.Y. pág. 110-150 (1992).

Un polipéptido “que tiene la actividad biológica de PDGF” se refiere a un polipéptido que tiene la misma capacidad o una capacidad incrementada de estimular, de manera preferente, el crecimiento de células de la capa de la dermis de la piel. Este polipéptido puede ser un PDGF de longitud completa, un fragmento de PDGF, un análogo de PDGF con sustitución, delección o adición de aminoácidos o un derivado de PDGF, como el descrito en la Patente de EEUU No. 5.149.792 y EP 458 959 B1; y en las Patentes de EEUU Nos. 4.769.328; 4.801.542; 4.766.073; 4.849.407; 4.845.075; 4.889.919; 5.045.633; y 5.128.321.

Un polipéptido “que tiene la actividad biológica de KGF” se refiere a un polipéptido que tiene la misma capacidad o una capacidad incrementada de estimular, de manera preferente, el crecimiento de células de la capa de la epidermis de la piel. Este polipéptido puede ser un KGF de longitud completa, un fragmento de KGF, un análogo de KGF con sustitución, delección o adición de aminoácidos; o un derivado de KGF como se describe en WO 90/08771, y WO 95/01434.

Un polipéptido “que tiene la actividad biológica de IGF” se refiere a un polipéptido que tiene la misma capacidad o una capacidad incrementada de actuar como un factor de crecimiento con efectos semejantes a los de la insulina, como, por ejemplo, estimulación de la fosforilación de restos específicos de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor al que se une como se describe en WO 93/98826, o, en algunos casos, por ejemplo, efectos mitogénicos en determinadas células como se describe en EP 0 128 733. Este polipéptido puede ser un IGF de longitud completa, un fragmento de IGF, un análogo de IGF con sustitución, delección, o adición de aminoácidos, o cualquier derivado de IGF.

Un polipéptido “que tiene la actividad biológica de IGFBP” se refiere a un polipéptido que tiene aproximadamente la misma capacidad o una capacidad incrementada de actuar como una proteína transportadora de IGF uniéndose y transportando IGF a tejidos y células donde el IGF puede tener un efecto biológico. Como actualmente se conocen al menos seis IGFBP, muchas de las cuales son significativamente distintas de las otras IGFBP, las cualidades específicas respecto a la actividad biológica de una determinada IGFBP no incluyen necesariamente al grupo completo de proteínas transportadoras de IGF. De esta manera, la actividad biológica de una IGFBP puede tener algunas similitudes con otras IGFBP, pero también puede tener diferencias que la identifiquen como una IGFBP única.

“PDGF de longitud completa” o “PDGF maduro” y “KGF de longitud completa” o “KGF maduro” e “IGF de longitud completa” o “IGF maduro” e “IGFBP de longitud completa” e “IGFBP madura” se refiere al polipéptido nativo respectivo tal y como se encuentra en los tejidos de mamíferos o de los seres humanos.

El término “análogo” en la presente memoria en referencia a PDGF, KGF, IGF y proteína IGFBP, se refiere a truncaciones, variantes, alelos y derivados de éstos. A no ser que se mencione específicamente otra cosa, estos términos incluyen las bioactividades de KGF “maduro” o PDGF “maduro”, IGF “maduro” o IGFBP “madura”. Así, se incluyen en esta definición los polipéptidos que son idénticos o contienen al menos 60%, preferiblemente 70%, más preferiblemente 80% y más preferiblemente 90% de identidad de secuencia con la proteína madura de la que derivan, de fuentes humanas o no humanas. Los análogos de la presente memoria incluyen además péptidos que tienen uno o más mimetizadores de péptidos, también conocidos como peptoides, que poseen la bioactividad de la proteína. También están incluidos en la definición polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos análogos (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con uniones sustituidas, así como otras modificaciones conocidas en este campo, tanto las que ocurren naturalmente como las que no ocurren naturalmente. El término polipéptido tampoco excluye modificaciones del polipéptido posteriores a su expresión, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y semejantes.

Las “variantes” y “derivados” de la presente memoria contienen sustituciones, delecciones, o inserciones de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas de aminoácidos o sustituciones para eliminar restos de aminoácidos no esenciales para alterar un sitio de glicosilación, un sitio de fosforilación, un sitio de acetilación, o para minimizar el plegamiento inadecuado mediante la sustitución o delección de uno o más restos de cisteína que no son necesarios para esta función. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son aquellas que conservan la carga general, la hidrofobicidad/hidrofiliidad y/o el tamaño estérico del aminoácido sustituido, por

ejemplo, sustituciones entre miembros de los grupos siguientes son sustituciones conservativas: Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Asp/Glu, Lys/Arg, Asn/Gln, Ser/Cys/Thr y Phe/Trp/Tyr.

5 El término “polinucleótido” tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de ADN, a una molécula de ARN o a la cadena complementaria de éstas. Una molécula de polinucleótido puede ser de cadena simple o doble.

10 Una “cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico” tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a la cantidad de una composición que es eficaz para lograr un resultado deseado que, en la presente memoria, es la reparación de tejidos epiteliales. Esta cantidad puede ser administrada en una dosis única o como parte de una serie de dosis. La cantidad precisa variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, tamaño, peso y salud del sujeto, y de la naturaleza y gravedad de la condición que se va a tratar. No es posible especificar con antelación la cantidad exacta que es eficaz desde un punto de vista terapéutico. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación determinada puede determinarse mediante experimentación rutinaria o en base a la experiencia de la persona que administra la composición en base a la información proporcionada en la presente memoria. Se espera que la dosis esté dentro de un intervalo relativamente amplio.

20 “Un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico” se refiere en la presente memoria a cualquier vehículo que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Vehículos aceptables son típicamente macromoléculas grandes, que se metabolizan lentamente como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y una partícula vírica inactiva. Estos vehículos son conocidos para aquellos especializados en el tema. Una discusión en profundidad de excipientes aceptables desde un punto de vista farmacéutico puede encontrarse en REMINGTON’S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Merck Pub. Co., N.J. 1991). Vehículos ejemplares aceptables desde un punto de vista farmacéutico pueden incluir sales, por ejemplo, sales de ácidos minerales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, y semejantes; y las sales de ácidos orgánicos como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y semejantes.

30 Las “composiciones farmacéuticas” de la presente memoria pueden contener además uno o más componentes como agua, disolución salina, glicerol, o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en estas composiciones sustancias auxiliares, como agentes humidificadores o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, estabilizantes, antioxidantes y semejantes. Las composiciones farmacéuticas de la presente memoria pueden prepararse como una crema para aplicarse por vía tópica, o como disoluciones o suspensiones líquidas, o como formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en vehículos líquidos para inyección. La composición farmacéutica de la presente memoria puede prepararse en formato liposomal como las encapsuladas en liposomas o en DepoFoam®; como se describe en la Patente de EEUU No. 5.442.120; WO 95/13796; y WO 91/14445.

40 “Co-administración” tal y como se utiliza en la presente memoria significa administración de KGF y de PDGF de acuerdo con el método de la invención en combinación el uno con el otro, co-administración de KGF/PDGF y un IGF, y co-administración de KGF/PDGF/IGF/IGFBP. Co-administración también significa administración de una combinación PDGF/KGF también en combinación con IGF o de una combinación PDGF/KGF/IGF también en combinación con IGFBP. La co-administración puede ser simultánea, por ejemplo, por administración de una mezcla de KGF y de PDGF, o una mezcla de PDGF, KGF, e IGF, o IGF e IGFBP, o puede lograrse por la administración de los agentes por separado, como dentro de un periodo de tiempo corto. La co-administración también incluye la administración sucesiva de KGF y de PDGF, o la administración sucesiva de KGF, PDGF, e IGF, o la administración sucesiva de KGF, PDGF, y la co-administración de IGF y de IGFBP. También, en el caso de todas estas administraciones, por ejemplo en el caso de la administración de KGF y de PDGF, uno de los dos puede administrarse de manera preventiva mientras que el otro se administra posteriormente para el tratamiento, dentro de un periodo de tiempo razonable después de la administración preventiva. Por ejemplo, en el caso de la administración de KGF, PDGF, e IGF, o de IGF e IGFBP uno o dos o tres pueden administrarse de manera preventiva, mientras que uno o dos o tres pueden administrarse posteriormente para el tratamiento, dentro de un periodo de tiempo razonable después de la administración preventiva. La dosificación para el tratamiento para la administración o co-administración puede ser un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis.

55 El término “kit” se refiere a un paquete que contiene el material especificado y que incluye instrucciones impresas para la utilización del material. Por ejemplo, un kit para el método de la invención puede incluir polipéptidos PDGF y KGF por separado o en mezcla o ADN que codifica PDGF y KGF por separado o en mezcla, o como una combinación de ADN y polipéptidos, por ejemplo, el ADN de PDGF y el polipéptido KGF. También, por ejemplo, un kit para el método de la invención puede incluir polipéptidos PDGF, KGF, e IGF por separado o en mezcla o ADN que codifica PDGF, KGF e IGF por separado o en mezcla, o en una combinación de ADN y polipéptidos, por ejemplo, el ADN de PDGF y de KGF, con el polipéptido IGF. También, por ejemplo, un kit para el método de la invención puede incluir polipéptidos PDGF, KGF, e IGF e IGFBP por separado o en mezcla o ADN que codifica PDGF, KGF e IGF IGFBP por separado o en mezcla, o en una combinación de ADN y polipéptidos, por ejemplo, el ADN de PDGF y de KGF, con el polipéptido IGF y el polipéptido IGFBP. Las “instrucciones impresas” pueden estar escritas o impresas en papel u otro medio, o en medio electrónico como cinta magnética, discos de ordenador, CD-ROM, y semejantes. Los kits también pueden incluir placas, tubos, diluyentes, disolventes, líquidos de lavado u otros reactivos convencionales.

El inventor de la presente memoria ha descubierto que la adición de IGF a una combinación PDGF/KGF mejora el tratamiento o prevención del daño en células epiteliales mucho más de lo que podría esperarse con cualquiera de los tres medicamentos solos; y además el inventor de la presente memoria ha descubierto que la adición de IGF y de IGFBP a la combinación PDGF/KGF mejora el tratamiento o prevención del daño a células epiteliales mucho más de los que podría esperarse con cualquiera de los cuatro medicamentos solos, e incluso más que las mejoras del daño a células epiteliales derivadas de la administración de la combinación PDGF/KGF, o de la combinación IGF/IGFBP.

Tanto PDGF como KGF pueden obtenerse mediante cualquier técnica convencional o pueden purificarse a partir de sus fuentes naturales. En una realización preferida de la presente invención, tanto PDGF como KGF se obtienen mediante la expresión de una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína respectiva en anfitriones independientes o mediante la coexpresión de ésta en un único anfitrión. La célula anfitriona puede ser procariota o eucariota. Por ejemplo, PDGF puede obtenerse como se describe en la Patente de EEUU No. 5.219.759. KGF puede obtenerse como se describe en WO 95/01434. Pueden utilizarse otros sistemas de expresión como se describe con más detalle más abajo.

Una composición farmacéutica puede contener una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico de PDGF, KGF, e IGF. PDGF, KGF, e IGF pueden obtenerse mediante cualquier técnica convencional o pueden purificarse a partir de sus fuentes naturales. En una realización preferida de la presente invención, PDGF, KGF e IGF se obtienen mediante la expresión de una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína respectiva en anfitriones independientes o mediante la coexpresión de ésta en un anfitrión único. La célula anfitriona puede ser procariota o eucariota. IGF puede obtenerse como se describe en la Patente de EEUU No. 4.738.921. IGF también puede sintetizarse mediante el método de fase sólida como se describe en Li, *PNAS*, (1983) 80: 2216-2220. En este método, la secuencia de polipéptido para IGF-I puede obtenerse mediante el acoplamiento de los restos de aminoácidos.

Las composiciones de PDGF, KGF e IGF, si se mantienen por separado, pueden administrarse por separado o simultáneamente. La administración directa de las composiciones se conseguirá generalmente por inyección, bien por vía subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraluminal, intragástrica, intrainestinal, intravenosa o intramuscular. Otros medios de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas. La dosificación del tratamiento puede ser un programa de una dosis única o un programa de múltiples dosis.

En otra realización, una composición farmacéutica puede contener una cantidad eficaz desde un punto de vista terapéutico de PDGF, KGF, e IGF con IGFBP. PDGF, KGF, e IGF e IGFBP pueden obtenerse mediante cualquier técnica convencional o pueden purificarse a partir de sus fuentes naturales. En una realización preferida de la presente invención, PDGF, KGF e IGF e IGFBP se obtienen mediante la expresión de una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína respectiva en anfitriones independientes o mediante la coexpresión de ésta en un anfitrión único. La célula anfitriona puede ser procariota o eucariota.

Las composiciones de PDGF, KGF, IGF e IGFBP, si se mantienen por separado, pueden administrarse por separado o simultáneamente. La administración directa de las composiciones se conseguirá generalmente por inyección, bien por vía subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraluminal, intragástrica, intrainestinal, intravenosa o intramuscular. Otros medios de administración incluyen administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas. La dosificación del tratamiento puede ser un programa de una dosis única o un programa de múltiples dosis.

IGF se puede obtener mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, como se describe en *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, (1990) 169: 832-839 (IGF-II) y *Cell Regulation*, (1990) 1: 197-213, (IGF-II), y *Biotechnology News*, (1983) 3: 1-3 (IGF-I y II). Por ejemplo, IGF puede producirse en *E. coli* como una proteína de fusión con el gen *trpE* bajo el control de un operon de triptófano modificado, como se describe en la Patente de EEUU No. 4.738.921. De manera alternativa, IGF puede sintetizarse en *E. coli* bajo el control de las secuencias del promotor y del protector del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), como se describe en EP 478 333. Los sistemas de expresión de *E. coli* utilizados para la expresión en la presente memoria pueden modificarse como se describe en la Patente de EEUU No. 5.158.875, para incluir una secuencia líder modificada cargada positivamente para permitir el plegamiento adecuado de la proteína IGF. Más aún, IGF puede producirse en transformantes de levadura metilotróficos con la secuencia que codifica IGF unida a una secuencia señal que dirige la secreción y el procesamiento proteolítico de la proteína producida. La secuencia señal adecuada en la presente memoria incluye la secuencia pre-pro del factor de apareamiento alfa de *S. cerevisiae* en cepas de *P. pastoris* deficientes en proteasa, como se describe en WO 92/04363. Las construcciones de ADN para la producción de IGF-II pueden hacerse y expresarse en *E. coli* como se describe en WO 89/03423. La síntesis de IGF-II recombinante también puede conseguirse siguiendo el protocolo descrito en EP 434 605, que se refiere a la producción de IGF-II recombinante con una fracción extraña unida covalentemente y que no posee la metionina unida al extremo N-terminal. IGF también puede obtenerse en levaduras como se describe en EP 123 228 y en la solicitud de patente de EEUU S.N. 06/922.199. Otro método para producir IGF utilizando técnicas de ADN recombinante que es adecuado en la presente memoria es el que se describe en *Biotechnology News*, (1983) 10: 1-3. Las secuencias que codifican IGF-I o IGF-II pueden insertarse en vectores de ADN víricos o de plásmidos circulares para formar vectores híbridos, y los vectores híbridos resultantes pueden utilizarse para transformar microorganismos anfitriones como células de bacteria, o de levadura. Los microorganismos transformados pueden crecerse en las condiciones apropiadas de nutrientes para expresar IGF, como se describe en EP 135 094. IGF también puede obtenerse como se describe en EP 434 625.

Una IGFBP puede ser cualquier IGFBP conocida, por ejemplo, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6. IGFBP puede obtenerse como se describe en Brinkman *et al.*, *EMBO J.* 7: 2417-2423 (1988), Mohan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8338-42 (1989), Patente de EEUU No. 5.407.913, WO 92/12243, 92/03471, 92/03470, WO 92/03469, y Brewer *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 1289-97 (1988).

5 La composición farmacéutica, en una realización de la presente invención, puede ser una composición que contiene PDGF solo, KGF solo, IGF solo e IGF con IGFBP, o dos cualquiera de los cuatro mezclados juntos, y el tercero y el cuarto solos, o tres cualquiera de los cuatro mezclados juntos y el cuarto solo, o los cuatro mezclados juntos en una composición única, bien en una dosis única o en múltiples dosis. En otra realización de la presente invención,
10 para fines de terapia génica, la composición farmacéutica puede ser una composición que contiene un polinucleótido que codifica PDGF solo, una composición que contiene un polinucleótido que codifica KGF solo, una composición que contiene un polinucleótido que codifica IGF solo, una composición que contiene IGF e IGFBP sólo, o los cuatro polinucleótidos mezclados juntos en una composición única.

15 Las composiciones de PDGF, KGF, IGF e IGF con IGFBP, si se mantienen por separado, pueden administrarse de forma separada o simultáneamente. Adicionalmente, las concentraciones de cada uno pueden ser diferentes, dependiendo de la potencia del factor, y de las necesidades del paciente. La administración directa de las composiciones se conseguirá generalmente por inyección, bien por vía subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraluminal, intragástrica, intrainestinal, intravenosa o intramuscular. Otros medios de administración incluyen administración oral y
20 pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas. La dosificación del tratamiento puede ser un programa de una dosis única o un programa de múltiples dosis.

Cuando PDGF, KGF, IGF o IGFBP se administran como polipéptidos, bien juntos o en una composición única, o en composiciones múltiples, los polipéptidos pueden expresarse mediante cualquier sistema de expresión apropiado
25 para el polipéptido.

Los sistemas de expresión ejemplares para generar los polipéptidos PDGF, KGF, IGF e IGFBP o para clonar los polinucleótidos que los codifican para su aplicación en un protocolo de terapia génica, se listan más abajo.

30 *Expresión en Células Bacterianas*

Los sistemas de expresión bacterianos pueden utilizarse con las construcciones presentes. Los elementos de control para utilizarse en bacterias incluyen promotores, que contienen de manera opcional secuencias de operador, y sitios de unión a ribosomas. Los promotores útiles incluyen secuencias derivadas de enzimas del metabolismo de los azúcares,
35 como galactosa, lactosa (*lac*) y maltosa. Ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas como triptofano (*trp*), el sistema de promotor de β -lactamasa (*bla*), el bacteriófago λ PL, y T7. Además, se pueden utilizar promotores sintéticos, como el promotor *tac*. Los sistemas de promotor de la β -lactamasa y de la lactosa se describen en Chang *et al.*, *Nature* (1978) 275: 615, y Goeddel *et al.*, *Nature* (1979) 281: 544; el sistema de promotor de la fosfatasa alcalina y del triptófano (*trp*) se describen en Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.* (1980) 8:
40 4057 y EP 36.776 y promotores híbridos como el promotor *tac* se describen en la Patente de EEUU No. 4.551.433 y deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80: 21-25. Sin embargo, también son adecuados otros promotores bacterianos conocidos útiles para la expresión de proteínas eucariotas. Una persona especializada en el tema será capaz de ligar de manera operativa estos promotores a las secuencias que codifican PDGF y KGF, por ejemplo, como se describe en Siebenlist *et al.*, *Cell* (1980) 20: 269, utilizando uniones o adaptadores para proporcionar cualquier sitio
45 de restricción que se requiera. Los promotores para utilizarse en sistemas bacterianos también contienen generalmente una secuencia Shine-Dalgano (SD) unida de manera operativa al ADN que codifica el polipéptido diana. Para las células anfitrionas procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal del polipéptido diana nativo, la secuencia señal puede sustituirse por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o enterotoxina II estable en calor. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas.
50

Los sistemas precedentes son particularmente compatibles con *Escherichia coli*. Sin embargo, existen otros sistemas que se pueden utilizar en anfitriones bacterianos incluyendo organismos Gram negativos o Gram positivos como *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Streptomyces spp.*, especies de *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, o *Serratia marcescans*, entre otros. Los métodos para introducir ADN exógeno en estos anfitriones incluyen habitualmente la utilización de CaCl_2 o de otros agentes, como cationes divalentes y DMSO. El ADN también puede introducirse en las células bacterianas por electroporación, inyección nuclear, o fusión de protoplastos como se describe de manera general en Sambrook *et al.*, (1989), citado más arriba. Estos ejemplos son ilustrativos más que
55 limitantes. Preferiblemente, la célula anfitriona debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. De manera alternativa, son adecuados métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

También son útiles para la expresión de PDGF para la invención vectores descritos en EP 0 622 456-A1, incorporada por referencia en la presente memoria, que describe ADN para selección y replicación autónoma en células
60 bacterianas.

Las células procariotas utilizadas para producir el polipéptido diana de esta invención se cultivan en medio apropiado, como se describe de manera general en Sambrook *et al.*, citado más arriba.

Expresión en Células de Levadura

Los vectores de expresión y transformación, bien replicones extra cromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para la transformación en numerosas levaduras. Por ejemplo, los vectores de expresión se han desarrollado para, entre otras, las levaduras siguientes: *Saccharomyces cerevisiae* como se describe en Hinnen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75: 1929; Ito *et al.*, *J. Bacteriol.* (1983) 153: 163; *Candida albicans* como se describe en Kurtz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1986) 6: 142; *Candida maltosa* como se describe en Kunze *et al.*, *J. Basic Microbiol.* (1985) 25: 141; *Hansenula polymorpha*, como se describe en Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* (1986) 132: 3459 y Roggenkamp *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* (1986) 202: 302; *Kluyveromyces fragilis*, como se describe en Das *et al.*, *J. Bacteriol.* (1984) 158: 1165; *Kluyveromyces lactis*, como se describe en De Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.* (1983) 154: 737 y Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology* (1990) 8: 135; *Pichia guilliermondii*, como se describe en Kunze *et al.*, *J. Basic Microbiol.* (1985) 25: 141; *Pichia pastoris*, como se describe en Cregg *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1985) 5: 3376 y Patentes de EEUU Nos. 4.837.148 y 4.929.555; *Schizosaccharomyces pombe*, como se describe en Beach y Nurse, *Nature* (1981) 300: 706; y *Yarrowia lipolytica*, como se describe en Davidow *et al.*, *Curr. Genet.* (1985) 10: 380 y Gaillardin *et al.*, *Curr. Genet.* (1985) 10: 49, anfitriones de *Aspergillus* como *A. nidulans*, como se describe en Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1983) 112: 284-289; Tilburn *et al.*, *Gene* (1983) 26: 205-221 y Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81: 1470-1474, y *A. niger*, como se describe en Kelly y Hynes, *EMBO J.* (1985) 4: 475-479; *Trichoderma reesia*, como se describe en EP 0 244 234, y en hongos filamentosos como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, como se describe en WO 91/00357.

Las secuencias de control para los vectores de levadura son conocidas e incluyen regiones promotoras de genes como alcohol deshidrogenasa (ADH), como se describe en EP 284.044, enolasa, glucoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexoquinasa, fosfofructoquinasa, 3-fosfoglicerato mutasa, y piruvato quinasa (PyK), como se describe en EP 329.203. El gen de levadura *PHO5*, que codifica la fosfatasa ácida, también proporciona secuencias de promotor útiles, como se describe en Myanohara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1983) 80: 1. Otras secuencias de promotor adecuadas para utilizarse con anfitriones de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfogliceratoquinasa, como se describe en Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 2073, u otras enzimas glicolíticas, como piruvato descarboxilasa, triosafosfato isomerasa, y fosfoglucosa isomerasa, como se describe en Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.* (1968) 7: 149 y en Holland *et al.*, *Biochemistry* (1978) 17: 4900. Los promotores de levadura inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, incluyen de la lista anterior y de otras, las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para utilizarse en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en Hitzeman, EP 073.657. Los amplificadores de levaduras también se utilizan de manera ventajosa con los promotores de levaduras. Además, los promotores sintéticos no naturales también funcionan como promotores en levaduras. Por ejemplo, las secuencias de activación (UAS) situadas arriba de un promotor de levaduras pueden unirse con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levaduras, creando un promotor híbrido sintético. Ejemplos de estos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora de ADH unida a la región de activación de la transcripción de GAP, como se describe en las Patentes de EEUU Nos. 4.876.197 y 4.880.734. Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten en las secuencias reguladoras de los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10*, o *PHO5*, combinadas con la región de activación de la transcripción de un gen de una enzima glicolítica como *GAP* o *PyK*, como se describe en EP 164.556. Es más, un promotor de levadura puede incluir promotores que aparecen en la naturaleza que no son de levadura que tienen la capacidad de unirse a la polimerasa de ARN de levaduras e iniciar la transcripción.

Otros elementos de control que pueden incluirse en los vectores de expresión de levaduras son terminadores, por ejemplo, de *GAPDH* y del gen de la enolasa, como se describe en Holland *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 1385, y secuencias líder que codifican secuencias señal para la secreción. El ADN que codifica secuencias señal adecuadas puede derivarse de genes para proteínas de levaduras que se secretan, como el gen de la invertasa de levaduras como se describe en EP 012.873 y JP 62.096.086 y el gen del factor α , como se describe en las Patentes de EEUU Nos. 4.588.684, 4.546.083 y 4.870.008; EP 324.274; y WO 89/02463. De manera alternativa, líderes que no son de levadura, como un líder de interferón, también proporcionan secreción en levaduras, como se describe en EP 060.057.

Los métodos para introducir ADN exógeno en anfitriones de levaduras son conocidos en el campo, e incluyen habitualmente bien la transformación de esferoblastos o de células de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Las transformaciones en levaduras pueden llevarse a cabo de acuerdo con el método descrito en Van Solingen *et al.*, *J. Bact.* (1977) 130: 946 y en Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76: 3829. Sin embargo, también pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células como inyección nuclear, electroporación, o fusión de protoplastos como se describe de manera general en Sambrook *et al.*, citado más arriba.

Para la secreción en levaduras la secuencia señal del polipéptido diana nativo puede sustituirse por los líderes de la invertasa, del factor α o de la fosfatasa ácida de levaduras. El origen de replicación del origen del plásmido 2μ es adecuado para levaduras. Un gen de selección adecuado para utilizarse en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras descrito en Kingsman *et al.*, *Gene* (1979) 7: 141 o en Tschemper *et al.*, *Gene* (1980) 10: 157. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa de levadura mutante que no tiene la capacidad de crecer en presencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes *Leu2* (ATCC 20.622 ó 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que tienen el gen *Leu2*.

Para la producción intracelular de los polipéptidos presentes en levaduras, una secuencia que codifica una proteína de levaduras puede unirse a una secuencia que codifica los polipéptidos PDGF o KGF para producir una proteína de fusión que puede romperse intracelularmente por las células de levaduras después de la expresión. Un ejemplo de una secuencia líder de levadura de este tipo es el gen de la ubiquitina de levadura.

5 *Expresión en Células de Insecto*

Los vectores de expresión de baculovirus (BEV) son virus recombinantes de insectos en los que la secuencia que codifica un gen extraño que se quiere expresar se inserta detrás de un promotor de baculovirus en el lugar de un gen vírico, por ejemplo, polihedrina, como se describe en Smith y Summers, Patente de EEUU No. 4.745.051.

Una construcción de expresión en la presente memoria incluye un vector de ADN útil como un intermediario para la infección o transformación de un sistema de células de insecto, el vector contiene generalmente ADN que codifica un promotor transcripcional de baculovirus, de manera opcional pero preferiblemente, seguido por una secuencia señal de ADN de insecto capaz de dirigir la secreción de una proteína deseada, y un sitio para la inserción del gen extraño que codifica la proteína extraña, estando la secuencia señal de ADN y el gen extraño localizados bajo el control transcripcional de un promotor de baculovirus, siendo el gen extraño en la presente memoria la secuencia que codifica el polipéptido PDGF o KGF.

El promotor para utilizarse en la presente memoria puede ser una región promotora de la transcripción de baculovirus derivada de cualquiera de los más de 500 baculovirus que infectan generalmente insectos, como, por ejemplo, los Órdenes Lepidoptera, Diptera, Ortoptera, Coleoptera e Hymenoptera, incluyendo, por ejemplo, pero no estando limitado a, los ADN virales de *Autographa californica* MNPV, *Bombyx mori* NPV, *rrichoplusia ni* MNPV, *Rachlplusia ou* MNPV o *Galleria mellonella* MNPV. Así, el promotor de la transcripción de baculovirus puede ser, por ejemplo, un promotor de un gen inmediato-temprano de baculovirus IEI o IEN; una región promotora de un gen inmediato-temprano en combinación con la de un gen retardado-temprano de baculovirus seleccionado del grupo que consiste en un fragmento 39K y *HindIII* que contiene un gen retardado-temprano; o un promotor de un gen tardío de baculovirus. Los promotores inmediatos-tempranos o retardados-tempranos pueden amplificarse con elementos amplificadores de la transcripción.

Particularmente adecuado para su utilización en la presente memoria es el promotor de polihedrina del baculovirus, que dirige una nivel de expresión alto de un inserto de ADN, como se describe en Friesen *et al.*, (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression" en: THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (W. Doerfler, ed.); EP 127.839 y EP 155.476; y el promotor del gen que codifica la proteína p10, como se describe en Vlak *et al.*, *J. Gen. Virol.* (1988) 69: 765-776.

El plásmido que se utiliza en la presente memoria también contiene habitualmente la señal de poliadenilación de la polihedrina, como se describe en Miller *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.* (1988) 42: 177 y un gen de resistencia a ampicilina procariota (*amp*) y un origen de replicación para selección y propagación en *E. coli*. El ADN que codifica secuencias señal adecuadas también puede incluirse y se deriva generalmente de genes de proteínas de insecto o de baculovirus que se secretan, como el gen de polihedrina de baculovirus, como se describe en Carbonell *et al.*, *Gene* (1988) 73: 409, así como secuencias señal de mamíferos como las derivadas de genes que codifican el interferón humano, como se describe en Maeda *et al.*, *Nature* (1985) 315: 592-594; el péptido de liberación de gastrina humano, como se describe en Lebacqz-Verheyden *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1988) 8: 3129; IL-2 humana, como se describe en Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 8404; IL-3 de ratón, como se describe en Miyajima *et al.*, *Gene* (1987) 58: 273; y glucocerebrosidasa humana, como se describe en Martin *et al.*, *DNA* (1988) 7: 99.

Se han identificado y pueden utilizarse en la presente memoria numerosas cepas de baculovirus y variantes y las células de insecto anfitrionas permisivas correspondientes de anfitriones como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Véase, por ejemplo, la descripción en Luckow *et al.*, *Bio/Technology* (1988) 6: 47-55, Miller *et al.*, en GENETIC ENGINEERING (Setlow, J.K. *et al.*, eds.), Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pág. 277-279, y Maeda *et al.*, *Nature* (1985) 315: 592-594. Algunas de estas cepas víricas se encuentran disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Brn-5 de *Bombyx mori* NPV. Estos virus pueden utilizarse como los virus para la transfección de células anfitrionas como células de *Spodoptera frugiperda*.

Pueden utilizarse otros genes de baculovirus además del promotor de polihedrina para que el sistema de expresión de baculovirus sea más ventajoso. Estos incluyen inmediatos-tempranos (alfa), retardados-tempranos (beta), tardíos (gamma), o muy tardíos (delta), de acuerdo con la fase de la infección vírica durante la cual se expresen. La expresión de estos genes se produce de manera secuencial, probablemente como resultado de un mecanismo "en cascada" de la regulación transcripcional. Así, los genes inmediatos-tempranos se expresan inmediatamente después de la infección, en ausencia de otras funciones víricas, y uno o más de los productos génicos resultantes inducen la transcripción de los genes retardados-tempranos. Algunos productos de los genes retardados-tempranos inducen, a su vez, la transcripción de genes tardíos, y finalmente, se expresan los genes muy tardíos bajo el control de productos génicos expresados previamente de una o más de las clases tempranas. Un componente relativamente bien definido de esta cascada de regulación es IEI, un gen inmediato-temprano preferido del virus de codificación nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV). IEI se expresa en ausencia de otras funciones víricas y codifica un producto que estimula la transcripción de numerosos genes de la clase retardada-temprana, incluyendo el gen 39K preferido, como se describe en Guarino y

ES 2 293 137 T3

Summers, *J. Virol.* (1986) 57: 563-571 y *J. Virol.* (1987) 61: 2091-2099 así como la de genes tardíos como se describe en Guanno y Summers, *Virol.* (1988) 162: 444-451.

Los genes inmediatos-tempranos como se ha descrito arriba pueden utilizarse en combinación con una región promotora de un gen de baculovirus de la categoría retardado-temprano. A diferencia de los genes inmediatos-tempranos, los mencionados genes retardados-tempranos requieren la presencia de otros genes o productos génicos víricos como los de los genes inmediatos-tempranos. La combinación de genes inmediatos-tempranos puede realizarse con cualquiera de las numerosas regiones promotoras de genes retardados-tempranos como 39K o con uno de los promotores de genes retardados-tempranos encontrados en el fragmento *HindIII* del genoma del baculovirus. En el caso presente, la región promotora 39K puede unirse al gen extraño que se quiere expresar de manera que la expresión pueda ser controlada por la presencia de IEL, como se describe en L.A. Guarino y Summers (1986a), citado más arriba; Guarino y Summers (1986b) *J. Virol.* (1986) 60: 215-223, y Guarino *et al.*, (1986c) *J. Virol.* (1986) 60: 224-229.

Adicionalmente, cuando se utiliza una combinación de genes inmediatos-tempranos con una región promotora de genes retardados-tempranos, la expresión de genes heterólogos puede amplificarse mediante la presencia de una secuencia amplificadora en unión cis directa con la región promotora de los genes retardados-tempranos. Estas secuencias amplificadoras se caracterizan por amplificar la expresión de genes retardados-tempranos en situaciones en las que el gen inmediato-temprano o su producto está limitado. Por ejemplo, la secuencia amplificadora hr5 puede unirse directamente, en cis, a la región promotora del gen retardado-temprano, 39K, amplificando de esta manera la expresión del ADN heterólogo clonado como se describe en Guarino y Summers (1986a), (1986b), y Guarino *et al.*, (1986).

El gen de polihedrina se clasifica como un gen muy tardío. Por lo tanto, la transcripción a partir del promotor de polihedrina requiere la expresión previa de un número desconocido, pero probablemente grande, de otros productos génicos víricos y celulares. Debido a esta expresión retardada del promotor de polihedrina, los BEV más recientes, como el sistema BEV ejemplar descrito por Smith y Summers por ejemplo en la Patente de EEUU No. 4.745.051, expresarán genes extraños únicamente como resultado de la expresión génica del resto del genoma vírico, y solamente cuando la infección vírica esté muy avanzada. Esto representa una limitación para la utilización de los BEV existentes. La capacidad de la célula anfitriona para procesar proteínas sintetizadas de nuevas desciende al progresar la infección por baculovirus. De esta manera, la expresión génica a partir del promotor de polihedrina se produce cuando la capacidad de la célula anfitriona para procesar proteínas sintetizadas de nuevas se encuentra potencialmente reducida para determinadas proteínas como el activador de plasminógeno de tejido humano. Como consecuencia, la expresión de glicoproteínas que se secretan en sistemas BEV es complicada debido a la secreción incompleta del producto génico clonado, quedando por lo tanto el producto génico clonado atrapado en la célula en una forma procesada incompleta.

Aunque se ha reconocido que una secuencia señal de insectos puede utilizarse para expresar una proteína extraña que puede romperse para producir una proteína madura, la presente invención se lleva a la práctica, preferiblemente, con una secuencia señal de mamíferos, por ejemplo, la secuencia señal de PDGF o la de KGF o la de IGF o la de IGFBP.

Una secuencia señal de insectos ejemplar adecuada para la presente memoria es la secuencia que codifica un péptido de la hormona adipoquinética de Lepidopteros (AKH). La familia AKH consiste en neuropéptidos cortos que regulan la movilización y metabolismo de la energía de sustrato en insectos. En una realización preferida, puede utilizarse una secuencia de ADN que codifica un péptido señal AKH del Lepidóptero *Manduca sexta*. También pueden emplearse otros péptidos señal AKH de insectos, como los del locus del Ortóptero *Schistocerca gregaria*. Otra secuencia señal de insectos ejemplar es la secuencia que codifica proteínas de la cutícula de *Drosophila* como CP1, CP2, CP3 o CP4.

Actualmente, el vector de transferencia más utilizado que puede utilizarse en la presente memoria para introducir genes extraños en AcNPV es pAc373. Muchos otros vectores, conocidos por las personas especializadas en el tema, también pueden utilizarse en la presente memoria. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión baculovirus/células de insecto están disponibles comercialmente en un kit de compañías como Invitrogen (San Diego CA) ("MaxBac" kit). Las técnicas utilizadas en la presente memoria son conocidas para las personas especializadas en el tema y se describen en Summers y Smith, A MANUAL OF METHODS FOR BACULOVIRUS VECTORS AND INSECT CELL CULTURE PROCEDURES, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, Texas A&M University (1987); Smith *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3: 2156, y Luckow y Summers (1989). Éstas incluyen, por ejemplo, la utilización de pVL985 que altera el codon de inicio de polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación *BamHI* 32 pares de bases por debajo de ATT, como se describe en Luckow y Summers, *Virology* (1989) 17: 31.

Así, por ejemplo, para la expresión en células de insecto de los polipéptidos presentes, la secuencia de ADN deseada puede insertarse en el vector de transferencia, utilizando técnicas conocidas. Una célula de insecto anfitriona puede cotransformarse con el vector de transferencia que contiene el ADN deseado insertado junto con el ADN genómico del baculovirus salvaje, normalmente mediante cotransfección. El vector y el genoma vírico se recombinan lo que resulta en un virus recombinante que puede identificarse y purificarse fácilmente. El virus recombinante empaquetado puede utilizarse para infectar células anfitrionas de insecto para expresar los polipéptidos PDGF y KGF.

Otros métodos que se pueden aplicar en la presente memoria son los métodos estándar para el cultivo de células de insecto, la cotransfección y la preparación de plásmidos se explican en Summers y Smith (1987), citado más arriba. Esta referencia también está relacionada con los métodos estándar para clonar genes en vectores de transferencia AcMNPV, el aislamiento de ADN de plásmidos, la transferencia de genes al genoma de AcMNPV, la purificación de ADN vírico, el marcaje radiactivo de proteínas recombinantes y la preparación de medio de cultivo de células de insecto. Los procedimientos para el cultivo de virus y células se describen en Volkman y Summers, *J. Virol.* (1975) 19: 820-832 y Volkman *et al.*, *J. Virol.* (1976) 19: 820-832.

Expresión en Células de Mamífero

Los promotores típicos para la expresión en células de mamífero incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor de CMV, el promotor del virus tumoral de ratón LTR, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP) y el promotor del virus del herpes simple, entre otros. También pueden utilizarse en construcciones de mamíferos otros promotores no víricos, como un promotor derivado del gen de la metalotioneína murina. La expresión en mamíferos puede ser constitutiva o regulada (inducible), dependiendo del promotor. Típicamente, también están presentes secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación, localizadas 3' respecto al codón de parada de la traducción. Preferiblemente, también está presente una secuencia para optimizar el inicio de la traducción, localizada 5' respecto a la secuencia que codifica el polipéptido PDGF o el polipéptido KGF. Ejemplos de señales de terminación de la transcripción/poliadenilación incluyen aquellas derivadas de SV40, como se describe en Sambrook *et al.*, (1989), citado previamente. También pueden diseñarse en las construcciones de la presente invención intrones que contienen sitios de rotura del donante y del receptor.

También pueden utilizarse en la presente memoria elementos amplificadores para incrementar los niveles de expresión de las construcciones de mamíferos. Ejemplos incluyen el amplificador del gen temprano de SV40, como se describe en Dijkema *et al.*, *EMBO J.* (1985) 4: 761 y el amplificador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del Virus de Sarcoma Rous, como se describe en Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982b) 79: 6777 y del citomegalovirus humano, como se describe en Boshart *et al.*, *Cell* (1985) 41: 521. También puede estar presente una secuencia líder que incluye una secuencia que codifica un péptido señal, para proporcionar la secreción de la proteína extraña en células de mamífero. Preferiblemente, hay sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen de interés de manera que la secuencia líder pueda romperse bien *in vivo* o *in vitro*. El líder tripartito de adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que proporciona la secreción de una proteína extraña en células de mamífero.

Existen vectores de expresión que proporcionan los medios para la expresión transitoria en células de mamífero de ADN que codifica el polipéptido diana. En general, la expresión transitoria implica la utilización de un vector de expresión que es capaz de replicarse de manera eficaz en una célula anfitriona, de manera que la célula anfitriona acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza niveles altos de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula anfitriona, permiten la identificación positiva conveniente de polipéptidos codificados por ADN clonados, así como el rastreo rápido de estos polipéptidos para encontrar las propiedades biológicas o fisiológicas deseadas. De esta manera, los sistemas de expresión transitorios son particularmente útiles para fines de identificación de análogos y variantes del polipéptido diana que tienen una actividad semejante a la del polipéptido diana.

El vector de expresión descrito en EP 0622 456 A1 para la expresión de la cadena B de PDGF es también útil para la invención para la expresión de PDGF mediante un promotor vírico funcional en células de mamífero.

Una vez completos, los vectores de expresión de mamíferos pueden utilizarse para transformar una cualquiera de numerosas células de mamífero. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos en el campo e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa de ADN en el núcleo. Los aspectos generales de las transformaciones en sistemas de células anfitrionas de mamíferos los ha descrito Axel en EEUU 4.399.216.

También se conocen las líneas celulares de mamífero disponibles como anfitrionas e incluyen líneas celulares inmortalizadas que se pueden obtener de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo pero sin estar limitadas a, células de ovario de hamster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hamster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón embrionarias humanas, células sertoli de ratón, células de riñón caninas, células de pulmón humanas, células hepáticas humanas, células de tumor mamario de ratón, así como otras.

Las células anfitrionas de mamífero utilizadas para producir el polipéptido diana de esta invención pueden cultivarse en varios medios. Los medios disponibles comercialmente como Ham's F10 (Sigma), Medio Mínimo Esencial ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y Medio Eagle Modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma) son adecuados para el cultivo de células anfitrionas. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, *Meth. Enz.* (1979) 58: 44, Barnes y Sato, *Anal. Biochem.* (1980) 102: 255, Patentes de EEUU Nos. 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, ó 4.560.655, WO 90/103430, WO 87/00195, y EEUU RE 30.985, pueden utilizarse como medio de cultivo para las células anfitrionas. Cualquiera de estos medios puede suplementarse, cuando se considere necesario, con hormonas y/o otros factores de crecimiento como insulina, transferrina, o factor de crecimiento epidérmico, sales (como cloruro

sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (como HEPES), nucleósidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como Gentamicina M), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier suplemento necesario a las concentraciones apropiadas que resultará conocido por aquellas personas especializadas en el tema. Las condiciones de cultivo, como temperatura, pH, y semejantes, son las utilizadas previamente con la célula anfitriona seleccionada para la expresión, y resultarán aparentes para una persona especializada en el tema.

Administración Mediante Terapia Génica de PDGF, KGF e IGF o PDGF, KGF, IGF e IGFBP

Para fines de terapia génica, los polinucleótidos que codifican PDGF, KGF e IGF, o PDGF, KGF, IGF e IGFBP, pueden administrarse al animal para su expresión. Los polinucleótidos pueden administrarse bien como tales, o pueden unirse con otros polinucleótidos para la administración, como con vectores víricos. Estos polinucleótidos pueden también encapsularse en liposomas u otros medios de administración convencionales en el campo. Más abajo se detallan ejemplos de la utilización de protocolos de terapia génica para la administración de KGF, PDGF, IGF, e IGFBP.

Cuando se aplican técnicas de terapia génica a la invención, KGF, PDGF e IGF pueden expresarse mediante diferentes vectores o mediante el mismo vector; también KGF, PDGF, IGF e IGFBP pueden expresarse mediante diferentes vectores o mediante el mismo vector. El control de la regulación de cada producto génico es distinto y una persona especializada en el campo de la terapia génica y de la expresión puede seleccionar las secuencias reguladoras apropiadas para KGF, PDGF e IGF, o cuando se administre también IGFBP, también las secuencias reguladoras apropiadas para IGFBP.

De manera alternativa, los vectores que comprenden secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos KGF y PDGF, y también el polipéptido IGF, y también el polipéptido IGFBP cuando también se administra IGFBP, pueden utilizarse directamente para la terapia génica y pueden administrarse utilizando protocolos estándar de administración génica. A este respecto, las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos KGF, PDGF e IGF y también IGFBP cuando se administre también IGFBP, pueden integrarse de manera estable en el genoma de la célula anfitriona o mantenerse en un elemento episomal estable en la célula anfitriona. Los métodos para la administración génica se conocen en el campo, como se describe en la Patente de EEUU No. 5.399.346.

Las estrategias de terapia génica para la administración de construcciones de la invención pueden utilizar aproximaciones de vectores víricos o no víricos en una modalidad *in vivo* o *ex vivo*. La expresión de esta secuencia codificadora puede inducirse utilizando promotores de mamífero endógenos o heterólogos. La expresión *in vivo* de la secuencia codificadora puede ser constitutiva o regulada.

Para la administración utilizando vectores víricos, se puede utilizar cualquiera de un número de vectores víricos, como se describe en Jolly, *Cancer Gene Therapy 1*: 51-64 (1994). Por ejemplo, la secuencia codificadora puede insertarse en plásmidos diseñados para la expresión en vectores retrovíricos, como se describe en Kimura *et al.*, *Human Gene Therapy* (1994) 5: 845-852, vectores adenovíricos, como se describe en Connelly *et al.*, *Human Gene Therapy* (1995) 6: 185-193, vectores víricos adeno-asociados, como se describe en Kaplitt *et al.*, *Nature Genetics* (1994) 6: 148-153 y vectores sindbis. Los promotores adecuados para utilizarse con estos vectores incluyen el LTR retrovírico Moloney, el promotor de CMV y el promotor de albúmina de ratón. Los virus libres incompetentes en cuanto a la replicación pueden producirse e inyectarse directamente en el animal o en humanos o mediante transducción de una célula autóloga *ex vivo*, seguido de inyección *in vivo* como se describe en Zatloukal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 5148-5152.

La secuencia codificadora alterada también puede insertarse en un plásmido para la expresión del polipéptido *in vivo* o *ex vivo*. Para la terapia *in vivo*, la secuencia codificadora puede administrarse mediante inyección directa en el tejido o por infusión intravenosa. Los promotores adecuados para ser utilizados de esta manera incluyen promotores endógenos y heterólogos como CMV. Es más, se puede construir un promotor sintético T7T7/T7OB de acuerdo con Chen *et al.* (1994), *Nucleic Acids Res.* 22: 2114-2120, donde la polimerasa T7 está bajo el control regulador de su propio promotor y dirige la transcripción de la secuencia codificadora, que también está localizada bajo el control de un promotor T7. La secuencia codificadora puede inyectarse en una formulación que comprende un tampón que puede estabilizar la secuencia codificadora y facilitar la transducción de la misma en células y/o proporcionar selección, como se describe en Zhu *et al.*, *Science* (1993) 261: 209-211.

La expresión de la secuencia codificadora *in vivo* después de la administración para fines de terapia génica mediante vectores víricos o no víricos puede regularse para obtener una eficacia y seguridad máximas mediante la utilización de promotores de expresión génica regulados, como se describe en Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 5547-5551. Por ejemplo, la secuencia codificadora puede regularse por promotores que responden a tetraciclina. Estos promotores pueden regularse de una manera positiva o negativa mediante tratamiento con la molécula reguladora.

Para la administración no vírica de la secuencia codificadora, la secuencia puede insertarse en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para un nivel de expresión alto, y después pueden incubarse con moléculas de transferencia génica sintéticas como cationes poliméricos que unen ADN como polilisina, protamina, y albúmina, unidas a ligandos diana de la célula como asialoorosomucoide, como se describe en Wu y Wu, *J.*

Biol. Chem. (1987) 262: 4429-4432; insulina, como se describe en Hucked *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 40: 253-263 (1990); galactosa, como se describe en Plank *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 3: 533-539 (1992); lactosa, como se describe en Midoux *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21: 871-878 (1993); o transferrina, como se describe en Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414 (1990). Otros sistemas de administración incluyen la utilización de liposomas para encapsular ADN que comprende el gen bajo el control de diferentes promotores activos específicos de un tejido o ubicuos, como se describe en Nabel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11307-11311 (1993), y Philip *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 14: 2411-2418 (1994). Otros tipos de administraciones no víricas adecuadas para ser utilizadas incluyen sistemas de administración mecánicos como la aproximación biofísica, como se describe en Woffendin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91 (24): 11581-11585. Más aún, la secuencia codificadora y el producto de su expresión pueden administrarse a través de la deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados. Otros métodos convencionales para la administración génica que pueden utilizarse para la administración de la secuencia codificadora incluyen, por ejemplo, la utilización de una pistola de partículas para la transferencia génica de mano, como se describe en EEUU 5.149.655; utilización de radiación ionizante para activar la transferencia génica, como se describe en EEUU 5.206.152 y la solicitud PCT WO 92/11033.

La aplicación de la tecnología de terapia génica respecto a los péptidos y polipéptidos utilizados en la invención y sus análogos o variantes puede hacerse cuando sea beneficioso para tratar una herida mediante terapia génica, por ejemplo, con heridas crónicas como úlceras, o con cualquier herida en la que las células en el sitio de la herida respondan a un protocolo de terapia génica.

En general, la terapia génica puede aplicarse de acuerdo con la invención en todas las situaciones en las que sea beneficiosa para cicatrizar una herida mediante la administración de acuerdo con un protocolo de terapia génica de una cantidad suficiente de un péptido de la invención o de su análogo, variante, o negativo dominante, por ejemplo, para modular la actividad normal de las interacciones de unión. Puede requerirse una administración posterior dependiendo de la condición de la herida y del entorno con el que se presenta.

Los vectores que codifican los polipéptidos KGF, PDGF, IGF, e IGFBP también pueden empaquetarse en liposomas antes de su administración al sujeto o a células derivadas de él. La encapsulación lipídica se logra, generalmente, utilizando liposomas que son capaces de unir o atrapar de manera estable y de retener ácido nucleico. La proporción de ADN condensado respecto a la preparación de lípidos puede variar pero generalmente es alrededor de 1:1 (mg ADN:micromoles de lípido), o más de lípido. Para una revisión de la utilización de liposomas como vehículos para la administración de ácidos nucleicos, véase, Hug y Sleight, *Biochim. Biophys. Acta.* 1097: 1-17 (1991); Straubinger *et al.*, *Methods of Enzymology*, 101: 512-527 (1983).

Las preparaciones de liposomas para utilizarse en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras, siendo particularmente preferidos los liposomas catiónicos. Se ha visto que los liposomas catiónicos median la administración intracelular de ADN de plásmido (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 7413-7416); de ARNm (Malone *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86: 6077-6081); y de factores de la transcripción purificados (Debs *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1990) 265: 10189-10192), en una forma funcional.

Los liposomas catiónicos se pueden obtener fácilmente. Por ejemplo, liposomas N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles bajo la marca registrada Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, NY (Véase, también, Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 7413-7416). Otros liposomas disponibles comercialmente incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Otros liposomas catiónicos pueden prepararse a partir de materiales que se obtienen fácilmente utilizando técnicas conocidas en el campo. Véase, por ejemplo, Szoka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75: 4194-4198; Publicación PCT No. WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de DOTAP liposomas (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).

De manera similar, los liposomas aniónicos y neutros se obtienen fácilmente, por ejemplo de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o pueden prepararse fácilmente utilizando materiales que se obtienen fácilmente. Estos materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales pueden también mezclarse con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en las proporciones adecuadas. Los métodos para preparar liposomas utilizando estos materiales son bien conocidos en el campo.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o vesículas unilamelares grandes (LUV). Los diferentes complejos liposoma-ácido nucleico se preparan utilizando métodos conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, Straubinger *et al.*, en *Methods of Immunology* (1983), Vol. 101, pág. 512-527; Szoka *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75: 4194-4198; Papahadjopoulos *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* (1975) 394: 483; Wilson *et al.*, *Cell* (1979) 17: 77; Deamer y Bangham *Biochim. Biophys. Acta* (1976) 443: 629; Ostro *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1977) 76: 836; Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76: 3348; Enoch y Strittmatter *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1979) 76: 145; Fraley *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 10431; Szoka y Papahadjopoulos *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75: 145; y Schaefer-Ridder *et al.*, *Science* (1982) 215: 166.

Los liposomas se incluyen en la definición de un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico. El término "liposomas" se refiere a, por ejemplo, las composiciones de liposomas descritas en la Patente de EEUU

ES 2 293 137 T3

No. 5.422.120, WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445 y EP 524.968 B1. Los liposomas pueden ser vehículos farmacéuticos para los polinucleótidos o los polipéptidos de la invención, para una combinación de los dos. El agente terapéutico puede conjugarse con un liposoma, o puede conjugarse con un polímero de hidrogel, y el polímero de hidrogel (o un componente de un polímero de hidrogel) puede conjugarse o encapsularse mediante un liposoma.

Los vectores recombinantes (tanto si están encapsulados o no en liposomas), pueden administrarse en composiciones farmacéuticas como se describe más arriba. Las composiciones farmacéuticas comprenderán material genético suficiente para producir una cantidad terapéutica eficaz del análogo o de los análogos, como se describe más arriba. Para los fines de la presente invención, una dosis eficaz será de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de las construcciones de ADN en el individuo al que se administran.

Una vez formuladas, las composiciones de la invención pueden administrarse directamente al sujeto o, alternativamente, en el caso de los vectores descritos más arriba, se pueden administrar *ex vivo* a células derivadas del sujeto. Los métodos para la administración *ex vivo* y la reimplantación de células transformadas en un sujeto son conocidos en el campo y están descritos en, por ejemplo, WO 93/14778. Generalmente, estos métodos incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en el núcleo, todos ellos conocidos en el campo.

La administración de las combinaciones terapéuticas de la invención puede conseguirse, por ejemplo, mediante cremas tópicas, espuma, inyección, pulverización de aerosol, en una matriz de gel, una esponja, gotas, y un lavado. La administración puede ser, por ejemplo, una administración local, oral, intradérmica, subcutánea, intraluminal, intragástrica, e intraperitoneal con una formulación apropiada de la composición seleccionada compuesta por una combinación de los agentes terapéuticos apropiados para un tratamiento particular.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden administrarse en una dosificación y cantidad eficaces desde un punto de vista terapéutico, en el procedimiento de un protocolo eficaz desde un punto de vista terapéutico para el tratamiento del paciente. Las dosificaciones iniciales y cualquier dosificación posterior dependerán de la edad, del peso, de la condición del paciente y de la enfermedad, de la herida, del trastorno o de la condición biológica que se está tratando. Dependiendo del agente terapéutico, la dosificación y el protocolo de la administración variarán, y la dosificación también dependerá del método de administración seleccionado, por ejemplo, administración local o sistémica.

La herida a la que se aplican las combinaciones terapéuticas puede ser interna o externa, y pueden dirigirse hacia cualquier tejido que presente una herida, por ejemplo tejido epitelial. Para la administración tópica de IGF, se puede aplicar una formulación de óxido de zinc, que induce la producción local de IGF, como se describe en Tarnow *et al.*, *Scand. J. Plast. Reconstr. Hand Surg.* 28: 255-259 (1994). La administración de las combinaciones terapéuticas de la invención puede conseguirse con cualquier combinación de los agentes terapéuticos, por ejemplo, mediante la administración de PDGF y KGF seguida de IGF con IGFBP, o mediante la administración de PDGF, KGF, IGF, e IGFBP al mismo tiempo o casi al mismo tiempo. Las dosificaciones de cada agente terapéutico para una determinada herida y para un paciente particular, se diseñan para conseguir una dosis con una eficacia máxima para el agente terapéutico. Las dosificaciones apropiadas para un tratamiento dado dependen de la combinación particular de los agentes terapéuticos seleccionados para el tratamiento. Por ejemplo, se ha visto que IGF solo es menos potente que IGF administrado conjuntamente con IGFBP.

Las dosis para una herida particular se determinarán para un paciente de manera individual, y dependen del tamaño de la herida, del tipo del daño, y de la composición que se aplica. Las dosis para los agentes terapéuticos individuales se han determinado dentro de unos intervalos. Por ejemplo, se ha determinado que una dosis eficaz de PDGF es 5 ng/mm² o mayor cuando es aplicado por vía tópica como se describe en la Patente de EEUU No. 4.861.757 y al menos 1 ng/ml de concentración local de una isoforma de PDGF (por ejemplo, PDGF-AA, PDGF-BB, o PDGF-AB), hasta aproximadamente 30 ng/ml de concentración local aplicada a una población de fibroblastos como se describe en Lepisto *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209: 393-399 (1995). PDGF puede administrarse en una formulación en gel de carboximetilcelulosa a concentraciones de aproximadamente 10 µg/gm a aproximadamente 500 µg/gm de gel, de aproximadamente 20 µg/gm a aproximadamente 200 µg/gm, y de aproximadamente 30 µg/gm a aproximadamente 100 µg/gm de gel, de manera óptima aproximadamente 100 µg/gm de gel. La eficacia del PDGF se ha conseguido en el intervalo de aproximadamente 3 µg/ml de disolución a aproximadamente 300 µg/ml de disolución administrada.

Aproximadamente 50 µl de KGF de una concentración de aproximadamente 5 µg/ml es eficaz para la cicatrización de heridas mediante aplicación tópica al tejido epitelial como se describe en Sotozono *et al.*, *Invest. Ophthalm. Vis. Science* 36: 1524-29 (1995). Como se describe en la Patente de EEUU No. 4.861.757, una cantidad eficaz de IGF cuando se coadministra con PDGF está en el intervalo de al menos 2,5 ng/mm² a aproximadamente 5 ng/mm², con una proporción de PDGF a IGF en el intervalo de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 25:1 peso/peso, siendo las proporciones más eficaces PDGF a IGF de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 2:1 peso/peso. Se ha visto que IGFBP administrada en combinación con IGF incrementa la cicatrización de heridas a dosis de aproximadamente 5 µg de IGF con aproximadamente 1,5 µg de IGFBP fosforilada en una proporción molar de aproximadamente 11:1 IGF:IGFBP, como se describe en Jyung *et al.*, *Surgery* 115: 233-239 (1994).

Para la administración de los polipéptidos terapéuticos, por ejemplo, los polipéptidos PDGF, KGF, IGF e IGFBP, la dosificación puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 μg a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tejido al que la aplicación se dirige, también de aproximadamente 50 μg a aproximadamente 5 mg/kg , también de aproximadamente 100 μg a aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de tejido, y de aproximadamente 200 a aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para los polinucleótidos terapéuticos, por ejemplo en un protocolo de administración de terapia génica, dependiendo de la fuerza de la expresión del polinucleótido en el paciente, para una administración dirigida a un tejido, los vectores que contienen construcciones que se expresan incluyendo secuencias codificadoras de PDGF, KGF, IGF, e IGFBP pueden administrarse en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia génica, también de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, también de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 2 mg de ADN, de aproximadamente 5 μg de ADN a aproximadamente 500 μg de ADN, y de aproximadamente 20 μg a aproximadamente 100 μg durante una administración local en un protocolo de terapia génica, y aproximadamente 250 μg por inyección o administración. Los factores como el método de acción y la eficacia de la transformación y de la expresión son, por lo tanto, consideraciones que afectarán la dosificación requerida para determinar la eficacia de la administración de agentes de ADN terapéuticos. Cuando se desee una expresión mayor, en un área de tejido mayor, un sitio de herida puede requerir, para lograr un resultado terapéutico positivo, cantidades de ADN mayores o volver a administrar las mismas cantidades en un protocolo sucesivo de administraciones, o numerosas administraciones en diferentes partes de tejido adyacentes o próximas. En todos los casos, la experimentación rutinaria en ensayos clínicos determinará los intervalos específicos para un efecto terapéutico óptimo, para cada agente terapéutico, para cada protocolo de administración, y la administración a pacientes específicos también se ajustará dentro de intervalos eficaces y seguros dependiendo de la condición del paciente y de la respuesta a las administraciones iniciales.

Los objetivos, características y ventajas adicionales de la presente invención resultarán aparentes a partir de la descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica realizaciones preferidas de la invención, se proporciona con fines ilustrativos solamente, ya que a partir de esta descripción detallada resultarán aparentes para las personas especializadas en el tema varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y el ámbito de la invención. Los ejemplos siguientes son solamente ejemplares, y no pretenden limitar la invención.

La presente invención se ilustrará ahora por referencia a los ejemplos siguientes que muestran realizaciones particularmente ventajosas. Sin embargo, debe apreciarse que estas realizaciones son ilustrativas y no debe interpretarse que restringen la invención en ningún caso.

Ejemplo 1

Se tratan quemaduras de segundo grado con una formulación en aerosol que incluye 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de KGF, 30 ng/ml de una isoforma de PDGF, 10 ng/ml de IGF-I, y 30 ng/ml de IGFBP-1. Se deja secar el pulverizado al aire. Se sugiere cada dos horas otra aplicación.

Ejemplo 2

Una herida suturada se cierra y se aplica en la sutura antes del vendaje un bálsamo tópico compuesto de 10% KGF y 5% PDGF. Se vuelve a aplicar el bálsamo 3 veces diariamente.

Ejemplo 3

Una formulación de 20% de óxido de zinc que contiene también 5% KGF, 2,5% PDGF, y 10% IGFBP se aplica a abrasiones menores, quemaduras solares e irritaciones para una cicatrización más rápida de estas heridas.

Ejemplo 4

Se utiliza una formulación de liposomas para encapsular ADN de KGF, PDGF, IGF e IGFBP, cada uno en un vector para la expresión. La proporción de ADN por peso es 10:5:2,5:7,5, respectivamente. La composición de liposomas se administra en una cápsula en gel por la boca para el tratamiento de úlceras gastrointestinales con readministración diaria durante un período de aproximadamente un mes, o hasta que una mejora significativa indique una reducción en la frecuencia de administración.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un primer polipéptido que tiene la actividad biológica de un factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y un segundo polipéptido que tiene la actividad biológica del factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) y un tercer polipéptido que tiene la actividad biológica del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF) en la fabricación de un medicamento para utilizarse en la reparación o prevención del daño en células epiteliales.
- 10 2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, donde el primer polipéptido comprende un polipéptido PDGF de longitud completa.
3. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, donde el primer polipéptido comprende un fragmento activo biológicamente de un polipéptido PDGF de longitud completa.
- 15 4. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, donde el primer polipéptido comprende la cadena PDGF A o la cadena PDGF B.
- 20 5. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el primer polipéptido se produce por expresión de una molécula de ADN que codifica PDGF en una célula anfitriona, donde la célula anfitriona es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto.
6. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el segundo polipéptido comprende un KGF de longitud completa.
- 25 7. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el segundo polipéptido comprende un fragmento activo biológicamente de un polipéptido KGF de longitud completa.
- 30 8. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el segundo polipéptido se produce por expresión de una molécula de ADN que codifica KGF en una célula anfitriona, donde la célula anfitriona es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto.
9. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el tercer polipéptido comprende un IGF de longitud completa.
- 35 10. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el tercer polipéptido comprende un fragmento activo biológicamente de IGF.
- 40 11. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el tercer polipéptido es IGF-1 o IGF-2.
12. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tercer polipéptido se produce por expresión de una molécula de ADN que codifica IGF en una célula anfitriona, donde la célula anfitriona es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto.
- 45 13. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un cuarto polipéptido que tiene la actividad biológica de una proteína transportadora del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBP).
- 50 14. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13, donde el cuarto polipéptido comprende una IGFBP de longitud completa.
15. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13, donde el cuarto polipéptido comprende un fragmento activo biológicamente de una IGFBP.
- 55 16. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13, donde la IGFBP comprende IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 o IGFBP-6.
- 60 17. Utilización de acuerdo con la reivindicación 13, donde el cuarto polipéptido se produce por expresión de una molécula de ADN que codifica una IGFBP en una célula anfitriona, donde la célula anfitriona es una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de mamífero o una célula de insecto.
- 65 18. Utilización de una primera molécula de ADN, una segunda molécula de ADN y una tercera molécula de ADN, donde la primera molécula de ADN comprende una primera secuencia de nucleótidos que codifica PDGF, la segunda molécula de ADN comprende una segunda secuencia de nucleótidos que codifica KGF y la tercera molécula de ADN comprende una tercera secuencia de nucleótidos que codifica IGF en la fabricación de un medicamento para utilizarse en la reparación o prevención del daño en células epiteliales.

ES 2 293 137 T3

19. Utilización de acuerdo con la reivindicación 18, donde la primera molécula de ADN codifica la cadena PDGF A o la cadena PDGF B.

5 20. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, donde la segunda molécula de ADN codifica un polipéptido KGF de longitud completa.

21. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, que comprende además una cuarta molécula de ADN que comprende una cuarta secuencia de nucleótidos que codifica IGFBP.

10 22. Utilización de acuerdo con la reivindicación 21, donde la cuarta molécula de ADN codifica IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 o IGFBP-6.

15 23. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, donde las moléculas de ADN están presentes en el mismo plásmido o en plásmidos diferentes.

24. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, donde las moléculas de ADN están encapsuladas en liposomas.

20 25. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las células epiteliales son células de la piel, revestimiento gástrico o revestimiento intestinal.

26. Utilización de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el medicamento está en la forma de una crema, espuma, disolución inyectable, pulverizador, matriz de gel, esponja, gotas o lavado.

25

30

35

40

45

50

55

60

65