

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1996.09.27**

(30) Prioridade(s): **1995.10.11 US 5075 P**
1996.07.11 US 21540 P
1996.09.25 US 719742 P

(43) Data de publicação do pedido: **2004.12.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.11.21**
042/2008

(73) Titular(es):

NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
4560 HORTON STREET EMERYVILLE, CA 94608
US

(72) Inventor(es):

LEWIS T. WILLIAMS **US**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMBINAÇÃO DE PDGF, KGF, IGF E IGFBP PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIMENTOS**

(57) Resumo:

RESUMO

"Combinação de PDGF, KGF, IGF e IGFBP para cicatrização de ferimentos"

O presente invento proporciona uma composição terapêutica para reparação de ferimentos epiteliais que é uma combinação de PDGF e KGF. Mais, o presente invento proporciona uma composição para reparação de ferimentos epiteliais que é uma combinação terapêutica de PDGF, KGF e IGF. Adicionalmente, o presente invento proporciona uma composição terapêutica de PDGF, KGF, IGF e IGFBP para reparação de ferimentos epiteliais.

DESCRIÇÃO

"Combinação de PDGF, KGF, IGF e IGFBP para cicatrização de ferimentos"

Campo do Invento

Este invento refere-se à utilização de um polipéptido possuindo a actividade biológica de um factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e um polipéptido possuindo a actividade biológica do factor de crescimento dos queratinócitos (KGF) um polipéptido possuindo a actividade biológica de uma factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 ou IGF-2) no fabrico de um medicamento. A combinação é útil para tratamento ou prevenção de danos em células epiteliais, sendo uma melhoria sobre outros métodos anteriores para tratamento de danos em células epiteliais. O presente invento refere-se ainda à utilização de um polipéptido possuindo a actividade biológica de uma proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) em combinação com a combinação PDGF/KGF/IGF do invento.

Antecedentes do Invento

O pedido de patente EP 0619370 divulga a utilização de KGF para fins de cicatrização de ferimentos. PDGF pode também ser utilizado para fins de cicatrização de ferimentos tal como evidenciado pela sua capacidade para estimular células derivadas de mesênquima, tal como divulgado na Patente U.S. N.º 5187263.

Os factores de crescimento semelhantes a insulina, IGF e IGF-2, foram descritos e estudados na arte. IGF está descrito em Rinderknecht, *J. Biol. Chem.* 253: 2769 (1978) e verificou-se que actua como mitogénio em vários tipos celulares diferentes tal como descrito em EP 0128733. Tal como a insulina, os IGF estimulam a fosforilação em resíduos de tirosina específicos dentro do domínio citoplasmático dos receptores aos quais os IGF se ligam, tal como descrito em WO 93/98826. IGF-II está descrito em Rinderknecht, *FEBS Letters* 89: 283 (1978).

Os factores de crescimento semelhantes à insulina são também conhecidos sob o nome de classe somatomedinas e foram identificados em várias espécies animais como polipéptidos que actuam estimulando o crescimento de células numa variedade de tipos de tecidos e células, particularmente durante o desenvolvimento. Os efeitos promotores do crescimento das somatomedinas incluem aumento da multiplicação celular e estimulação da proliferação de cartilagem, estimulação do transporte de aminoácidos, estimulação da síntese de ARN, ADN e proteína e estimulação da incorporação de sulfato em proteoglicanos e de prolina em colagénio. Muito do crescimento pós-natal em mamíferos é devido à estimulação do crescimento de cartilagem pelas somatomedinas e o crescimento *in utero* pode também ser dependente de somatomedinas.

As utilizações de IGF como um agente conhecido estimulador e promotor do crescimento incluem a utilização para reparação óssea e terapia de substituição, tal como descrito em EP 303855; como meio para contrariar certos efeitos secundários prejudiciais de fármacos carcinostáticos, tal como descrito em JP 63-196524; e como meio de aumentar a lactação e produção de carne em gado e outros animais de criação, tal como descrito na Patente U.S. N.º 4783524.

Verificou-se também que IGF-I era útil no tratamento de osteoporose em mamíferos exibindo reduzida densidade mineral óssea cortical e nos expostos a fármacos ou condições ambientais que resultam em redução da densidade óssea e potencialmente numa condição de osteoporose, tal como descrito em EP 560723 e EP 436469.

IGF-I foi administrado com pentosano-polissulfato de sódio (PPS) a caninos gravemente osteoartríticos com o efeito de redução da gravidade da doença baixando os níveis de metaloproteinase neutra activa na cartilagem. No modelo de caninos ligeiramente osteoartríticos, a intervenção terapêutica com IGF-I e PPS pareceu manter com sucesso a estrutura e bioquímica da cartilagem, enquanto que IGF sozinho foi ineficaz, tal como descrito em Rogachefsky, *Osteoarthritis and Cartilage* 1: 105-114 (1993).

As proteínas de ligação a IGF foram estudadas extensivamente e presentemente são conhecidas seis IGFBP (IGFBP-1-6). As IGFBP formam complexos com IGF-I e IGF-II no plasma e crê-se que funcionem tipicamente como proteínas de ligação a hormonas proteicas, isto é, regulando a disponibilidade, a actividade e prolongando a semivida do ligando hormona proteico que transportam. Enquanto que IGFBP-3, um complexo de 150 kDa, é a IGFBP mais abundante no plasma e se acredita que funciona como transportador e reservatório de IGF-I no plasma, IGFBP-1 é uma pequena proteína de ligação de 25 kDa produzida principalmente no fígado e fibroblastos e pode distribuir-se entre a circulação e os tecidos, regulando potencialmente assim a biodisponibilidade de IGF em ambos os compartimentos tal como descrito em Tsuboi *et al.*, *J. of Inv. Derm.* 104: 199-203 (1995). O IGF foi descrito como útil para cicatrização de ferimentos em combinação com IGFBP, tal como descrito em Tsuboi *et al.*, *J. of Inv. Derm.* 104: 199-203 (1995), Kratz *et al.*, *Scand J. Plast. Reconstr. Hand Surg.* 28: 107-112 (1994) e Jyung *et al.*, *Surgery* 115: 233-239 (1994).

A expressão de IGF foi associada a cicatrização de ferimentos tal como descrito em Gartner *et al.*, *J. Surg. Res.* 52: 389-394 (1992) e Steenfors e Jansson, *Eur. J. Surg.* 158: 327-331 (1992). Adicionalmente, IGF foi descrito como útil quando administrado em combinação com PDGF para cicatrização de ferimentos tal como descrito na Patente U.S. N.º 4861757.

Por isso, seria vantajoso se pudesse ser encontrada uma composição melhorada que tivesse propriedades melhoradas sobre a administração de PDGF sozinho, sobre a administração de KGF sozinho, sobre PDGF com IGF e sobre IGF sozinho, e sobre IGF com IGFBP.

Em adição, em EP 0 568 334 A1 proporciona-se esponjas contendo colagénio compreendendo uma esponja de gelatina absorvível, colagénio, e o ingrediente activo, assim como métodos para melhorar a cicatrização de ferimentos, de ferimentos externos e internos, utilizando essas esponjas. O ingrediente activo preferido é PDGF.

Igualmente, em WO 92/14480 descreve-se um método que utilize GM-CSF e G-CSF para promover a cicatrização acelerada de ferimentos em mamíferos. Este método compreende a administração tópica ao mamífero de uma quantidade terapêuticamente eficaz de cada um destes dois polipéptidos, ou de uma mistura de um destes dois polipéptidos e pelo menos uma outra proteína.

Sumário do Invento

É, por isso, um objectivo do presente invento proporcionar uma composição melhorada para tratamento ou prevenção de danos em células epiteliais.

De acordo com um aspecto do presente invento, é aqui proporcionada a utilização de um primeiro polipéptido possuindo a actividade biológica de um factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e um segundo polipéptido possuindo a actividade biológica do factor de crescimento de queratinócitos (KGF) e um terceiro polipéptido possuindo a actividade biológica do factor de crescimento semelhante à insulina (IGF) no fabrico de um medicamento para utilização na reparação ou prevenção de danos em células epiteliais.

A utilização pode adicionalmente compreender um quarto polipéptido possuindo a actividade biológica da proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante a insulina (IGFBP).

De acordo com outro aspecto do presente invento, é proporcionada a utilização de uma primeira molécula de ADN, uma segunda molécula de ADN e uma terceira molécula de ADN, em que a primeira molécula de ADN compreende uma primeira sequência nucleotídica codificando PDGF, a segunda molécula de ADN compreende uma segunda sequência nucleotídica codificando KGF e a terceira molécula de ADN compreende uma terceira sequência nucleotídica codificando IGF, no fabrico de um medicamento para utilização na reparação ou prevenção de danos em células epiteliais.

A utilização pode adicionalmente compreender uma quarta molécula de ADN compreendendo uma quarta sequência nucleotídica codificando IGFBP.

Descrição Detalhada das Concretizações Preferidas

A presente descrição baseia-se em trabalhos anteriormente publicados tais como artigos científicos, patentes ou pedidos de patente publicados. O presente invento pode ser mais bem compreendido à luz das seguintes definições.

Definições

A menos que seja de outro modo expressamente aqui proporcionado, o termo "factor de crescimento derivado de plaquetas" ou "PDGF" inclui o polipéptido da cadeia A de PDGF e o polipéptido da cadeia B de PDGF e os dímeros AA, BB e AB e fragmentos biologicamente activos, análogos e derivados destes tal como descrito na Patente U.S. N.º 5187263; 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); e Westermarck *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7197-7200 (1986); Patente U.S. N.º 5219759.

Também, a menos que de outro modo expressamente aqui proporcionado, o termo "factor de crescimento de queratinócitos" ou "KGF" refere-se a qualquer um de um polipéptido maduro e fragmentos biologicamente activos, análogos e derivados destes tal como descrito em WO 90/08771 e WO 95/01434.

O termo "factor de crescimento semelhante a insulina" tal como aqui se utiliza engloba IGF-I e IGF-II nas suas formas substancialmente purificadas, nativas, produzidas de forma recombinante ou sintetizadas quimicamente, e inclui fragmentos biologicamente activos, análogos, muteínas, incluindo muteínas de deleção do terminal C, e derivados destes que mantêm a actividade de IGF e/ou a capacidade de se ligarem a receptores de IGF, tal como descrito em, por exemplo, EP 135094, WO 85/00831, Patente U.S. N.º 4738921, WO 92/04363, Patente U.S. N.º 5158875, EP 123228 e EP 128733. Um análogo de IGF ou um análogo do fragmento inclui IGF nativo que foi modificado

através de uma ou mais inserções, deleções ou substituições de aminoácidos que não afectam substancialmente as suas propriedades. De preferência, o análogo tem maior actividade em comparação com o IGF nativo. De maior preferência, um aumento de pelo menos 2 vezes, sendo preferível um aumento de pelo menos 7-10 vezes. Por exemplo, o análogo pode incluir substituições de aminoácidos conservativas. Um análogo de IGF inclui péptidos possuindo um ou mais péptidos imitadores ("peptóides") tais como os descritos em WO 91/04282. Uma muteína de IGF é uma variante do polipéptido com um ou mais aminoácidos alterados para produzir uma característica desejada, tal como substituir um resíduo de cisteína por um aminoácido que não forme ligações dissulfureto. As muteínas, análogos e derivados podem ser geradas utilizando técnicas convencionais. Por exemplo, pode ser utilizada mutagénese por PCR. Embora a seguinte discussão se refira a ADN, entenda-se que a técnica também encontra aplicação com ARN. Um exemplo de uma técnica de PCR está descrito em WO 92/22653. Outro método para produzir análogos, muteínas e derivados é a mutagénese por cassette baseada na técnica descrita por Wells, *Gene* 34: 315 (1985).

O termo "proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante a insulina (IGFBP)" refere-se a uma proteína de ligação que se identifica como ligando-se a uma proteína de ligação a IGF tal como descrito e identificado em Keifer *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266: 9043-9 (1991), Camacho-Hubner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 11949-56 (1992), McCusker e Clemens, "The Insulin Like Growth Factors: Structure and Biological Functions", Oxford Univ. Press, N.Y. págs. 110-150 (1992).

Um polipéptido "possuindo a actividade biológica de PDGF" refere-se a um polipéptido possuindo a mesma ou maior capacidade de estimular preferencialmente o crescimento de células da camada derme da pele. Um tal polipéptido pode ser um PDGF de comprimento completo, um fragmento de PDGF, um análogo de PDGF possuindo uma substituição, deleção ou adição de aminoácidos, ou um derivado de PDGF tal como o descrito na Patente U.S. N.º 5149792 e EP 458959 B1; e Patentes U.S. N.ºs 4769328; 4801542; 4766073; 4849407; 4845075; 4889919; 5045633 e 5128321.

Um polipéptido "possuindo a actividade biológica de KGF" refere-se a um polipéptido possuindo a mesma ou maior capacidade de estimular preferencialmente o crescimento de células da camada epiderme da pele. Um tal polipéptido pode ser um KGF de comprimento completo, um fragmento de KGF, um análogo de KGF possuindo uma substituição, deleção ou adição de aminoácidos, ou um derivado de KGF tal como o descrito em WO 90/08771 e WO 95/01434.

Um polipéptido "possuindo a actividade biológica de IGF" refere-se a um polipéptido possuindo a mesma ou maior capacidade de actuar como factor de crescimento capaz de efeitos semelhantes aos da insulina tais como, por exemplo, estimulação da fosforilação de resíduos de tirosina específicos dentro do domínio citoplasmático do receptor ao qual se liga tal como descrito em WO 93/98826 ou, nalguns casos, por exemplo, efeitos mitogénicos em certas células tal como descrito em EP 0128733. Um tal polipéptido pode ser o IGF de comprimento completo, um fragmento de IGF, um análogo de IGF possuindo uma substituição, deleção ou adição de aminoácidos, ou qualquer derivado de IGF.

Um polipéptido "possuindo a actividade biológica de IGFBP" refere-se a um polipéptido possuindo aproximadamente a mesma ou maior capacidade de actuar como uma proteína de ligação a IGF ligando-se e transportando IGF para tecidos e células onde IGF pode ter um efeito biológico. Como existem actualmente pelo menos seis IGFBP conhecidas, muitas das quais significativamente diferentes das outras IGFBP, as qualidades específicas em relação à actividade biológica de uma dada IGFBP não incluem necessariamente todo o grupo de proteínas de ligação a IGF. Assim, a actividade biológica de uma IGFBP pode ter algumas semelhanças com outras IGFBP, mas pode também ter distinções que a identifiquem como uma única IGFBP.

"PDGF de comprimento completo" ou "PDGF maduro" e "KGF de comprimento completo" ou "KGF maduro" e "IGF de comprimento completo" ou "IGF maduro" e "IGFBP de comprimento completo" ou "IGFBP madura" referem-se ao respectivo polipéptido nativo tal como se encontra em tecidos humanos ou de outros mamíferos.

Os termos "análogo" aqui em referência às proteínas PDGF, KGF, IGF e IGFBP referem-se a truncagens, variantes, alelos e derivados destes. A menos que especificamente mencionado em contrário, estes termos englobam as bioactividades de KGF "maduro" ou PDGF "maduro" ou IGF "maduro" ou IGFBP "madura". Assim, polipéptidos que sejam idênticos ou contenham pelo menos 60%, de preferência 70%, sendo preferível 80% e ainda mais preferível 90% de identidade de sequência com a proteína madura donde foram derivados, de fontes humanas ou não humanas, estão incluídos dentro desta definição. Os análogos aqui incluem ainda péptidos possuindo um ou mais imitadores peptídicos, também conhecidos como peptóides, que possuem a bioactividade da proteína. Incluídos na definição estão também polipéptidos contendo um ou mais aminoácidos análogos (incluindo, por exemplo, aminoácidos não naturais, etc.), polipéptidos com ligações substituídas, bem como outras modificações conhecidas na arte, tanto de ocorrência natural como de ocorrência não natural. O termo polipéptido também não exclui modificações pós-expressão do polipéptido, por exemplo, glicosilações, acetilações, fosforilações e semelhantes.

As "variantes" e "derivados" aqui contêm substituições, deleções ou inserções de aminoácidos. As substituições de aminoácidos podem ser substituições de aminoácidos conservativas ou substituições para eliminar resíduos de aminoácidos não essenciais tais como para alterar um local de glicosilação, um local de fosforilação, um local de acetilação ou para minimizar má dobragem através de substituição ou deleção de um ou mais resíduos de cisteína que não sejam necessários à função. As substituições de aminoácidos conservativas são as que conservam a carga total, hidrofobia/hidrofilia e/ou o volume espacial do aminoácido substituído, por exemplo, substituições entre os membros dos seguintes grupos são substituições conservativas: Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Asp/Glu, Lys/Arg, Asn/Gln, Ser/Cys/Thr e Phe/Trp/Tyr.

O termo "polinucleótido" tal como aqui se utiliza refere-se a uma molécula de ADN, uma molécula de ARN ou a uma cadeia complementar destas. Uma molécula polinucleotídica pode ser de cadeia simples ou dupla.

Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" tal como aqui se utiliza refere-se à quantidade de uma composição que é eficaz a alcançar um resultado desejado que, no presente caso, é a reparação de tecidos epiteliais. Essa quantidade pode ser numa única dose ou como parte de uma série de doses. A quantidade exacta variará de sujeito para sujeito, dependendo da idade, tamanho, peso e saúde do sujeito, da natureza e gravidade da condição a tratar. Não é possível especificar previamente uma quantidade exacta que seja terapeuticamente eficaz. No entanto, a quantidade eficaz para uma dada situação pode ser determinada através de experimentação de rotina ou com base na experiência da pessoa que administra a composição com base na informação aqui proporcionada. Espera-se que a dose possa estar dentro de um intervalo relativamente amplo.

"Um transportador farmacologicamente aceitável" aqui refere-se a qualquer transportador que não induza por si próprio a produção de anticorpos prejudiciais ao indivíduo que recebe a composição. Os transportadores adequados são tipicamente macromoléculas grandes de metabolismo lento tais como proteínas, polissacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos e uma partícula viral inactiva. Tais transportadores são bem conhecidos dos vulgares peritos na arte. Uma discussão exaustiva de excipientes farmacologicamente aceitáveis pode ser encontrada em "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Merck Pub. Co., N.J. 1991). Transportadores farmacologicamente aceitáveis exemplares podem incluir sais, por exemplo, sais de ácidos minerais tais como cloridratos, bromidratos, fosfatos, sulfatos e semelhantes; e os sais de ácidos orgânicos tais como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos e semelhantes.

As "composições farmacêuticas" aqui podem ainda conter um ou mais componentes tais como água, solução salina, glicerol ou etanol. Adicionalmente, podem estar presentes em tais composições substâncias auxiliares, tais como agentes humidificantes ou emulsionantes, substâncias tampão do pH, estabilizadores, antioxidantes e semelhantes. As composições farmacêuticas aqui podem ser preparadas como creme a aplicar topicamente ou como soluções ou suspensões líquidas, ou formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em veículos

líquidos para injeção. A composição farmacêutica aqui pode ser preparada em formato lipossômico tal como as encapsuladas em lipossomas ou em DepoFoam®; tal como descrito na Patente U.S. N.º 5442120; WO 95/13796 e WO 91/14445.

"Co-administração" tal como aqui se utiliza significa administração de KGF e PDGF de acordo com o método do presente invento em combinação um com o outro, co-administração de KGF/PDGF e um IGF, e co-administração de KGF/PDGF/IGF/IGFBP. Co-administração significa também administração de uma combinação PDGF/KGF também em combinação com IGF ou combinação PDGF/KGF/IGF também em combinação com IGFBP. A co-administração pode ser simultânea, por exemplo, através da administração de uma mistura de KGF e PDGF, ou uma mistura de PDGF, KGF e IGF, ou IGF e IGFBP, ou pode ser alcançada através da administração dos agentes separadamente, tal como dentro de um curto período de tempo. A co-administração inclui também administração sucessiva de KGF e PDGF ou administração sucessiva de KGF, PDGF e IGF, ou administração sucessiva de KGF, PDGF, e co-administração de IGF e IGFBP. Também, no caso de todas estas administrações, por exemplo no caso de administração de KGF e PDGF, um dos dois pode ser administrado preventivamente enquanto que o outro é administrado depois para tratamento, dentro de um período razoável de tempo após a administração preventiva. Por exemplo, no caso de administração de KGF, PDGF e IGF, ou IGF e IGFBP, um ou dois ou três podem ser administrados preventivamente, e um ou dois ou três podem ser administrados depois para tratamento, dentro de um período razoável de tempo após a administração preventiva. O tratamento por dosagem para administração ou co-administração pode ser um programa de dose única ou um programa de múltiplas doses.

O termo "estojo" refere-se a um pacote contendo o material especificado e inclui instruções impressas para utilização do material. Por exemplo, um estojo para o método do presente invento pode incluir os polipéptidos PDGF e KGF separadamente ou em mistura ou ADN codificando PDGF e KGF separadamente ou em mistura, ou como uma combinação de ADN e polipéptidos, por exemplo, o ADN de PDGF e o polipéptido de KGF. Também como exemplo, um estojo para o método do presente invento pode incluir os polipéptidos PDGF, KGF e IGF

separadamente ou em mistura ou ADN codificando PDGF, KGF e IGF separadamente ou em mistura, ou numa combinação de ADN e polipéptidos, por exemplo, o ADN de PDGF e KGF, mas o polipéptido de IGF. Também como exemplo, um estojo para o método do presente invento pode incluir os polipéptidos PDGF, KGF, IGF e IGFBP separadamente ou em mistura ou ADN codificando PDGF, KGF, IGF e IGFBP separadamente ou em mistura, ou numa combinação de ADN e polipéptidos, por exemplo, o ADN de PDGF e KGF, mas o polipéptido de IGF e o polipéptido de IGFBP. As "instruções impressas" podem ser escritas em papel ou outros meios ou gravadas em meios electrónicos tais como fita magnética, discos ou fitas legíveis por computador, CD-ROM e semelhantes. Os estojos podem também incluir placas, tubos, caixas, diluentes, solventes, líquido de lavagem ou outros reagentes convencionais.

O presente inventor verificou que a adição de IGF à combinação PDGF/KGF melhora o tratamento ou prevenção de danos em células epiteliais muito para além do que poderia ser esperado através de qualquer um dos três medicamentos sozinhos; e adicionalmente, o presente inventor verificou que a adição de IGF e IGFBP à combinação PDGF/KGF melhora ainda mais o tratamento ou prevenção de danos em células epiteliais muito para além do que poderia ser esperado através de qualquer um dos quatro medicamentos sozinhos, e ainda para além das melhorias dos danos em células epiteliais derivados da administração da combinação PDGF/KGF ou da combinação IGF/IGFBP.

Cada um de PDGF e KGF pode ser produzido através de qualquer técnica convencional ou pode ser purificado a partir das suas fontes naturais. Numa concretização preferida do presente invento, cada um de PDGF e KGF é produzido através de expressão de uma sequência polinucleotídica codificando a respectiva proteína em hospedeiros separados ou através de co-expressão destes num único hospedeiro. A célula hospedeira pode ser procariótica ou eucariótica. Por exemplo, PDGF pode ser produzido tal como descrito na Patente U.S. N.º 5219759. KGF pode ser produzido tal como descrito em WO 95/01434. Outros sistemas de expressão podem ser utilizados tal como descrito em maior detalhe abaixo.

Uma composição farmacêutica pode conter uma quantidade terapeuticamente eficaz de PDGF, KGF e IGF. Cada um de PDGF, KGF e IGF pode ser produzido através de quaisquer técnicas convencionais ou pode ser purificado a partir das suas fontes naturais. Numa concretização preferida do presente invento, cada um de PDGF, KGF e IGF é produzido através de expressão de uma sequência polinucleotídica codificando a respectiva proteína em hospedeiros separados ou através de co-expressão destas num único hospedeiro. A célula hospedeira pode ser procariótica ou eucariótica. IGF pode ser produzido tal como descrito na Patente U.S. N.º 4738921. IGF pode também ser sintetizado através do método de fase sólida tal como descrito em Li, *PNAS* 80: 2216-2220 (1983). Neste método, a sequência polipeptídica para IGF-I pode ser montada através de conjugação dos resíduos de aminoácidos.

As composições de PDGF, KGF e IGF, se mantidas separadamente, podem ser administradas separadamente ou contemporaneamente. A entrega directa das composições será geralmente alcançada através de injeção, subcutaneamente, intradermicamente, intraperitonealmente, intraluminalmente, intragastricamente, intraintestinalmente, intravenosamente ou intramuscularmente. Outros modos de administração incluem administração oral e pulmonar, supositórios e aplicações transdérmicas. O tratamento por dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de múltiplas doses.

Noutra concretização, uma composição farmacêutica pode conter uma quantidade terapeuticamente eficaz de PDGF, KGF e IGF com IGFBP. Cada um de PDGF, KGF, IGF e IGFBP pode ser produzido através de quaisquer técnicas convencionais ou pode ser purificado a partir das suas fontes naturais. Numa concretização preferida do presente invento, cada um de PDGF, KGF, IGF e IGFBP é produzido através de expressão de uma sequência polinucleotídica codificando a respectiva proteína em hospedeiros separados ou através de co-expressão destas num único hospedeiro. A célula hospedeira pode ser procariótica ou eucariótica.

As composições de PDGF, KGF, IGF e IGFBP, se mantidas separadamente, podem ser administradas separadamente ou contemporaneamente. A entrega directa das composições será

geralmente alcançada através de injeção, subcutaneamente, intradermicamente, intraperitonealmente, intraluminalmente, intragastricamente, intraintestinalmente, intravenosamente ou intramuscularmente. Outros modos de administração incluem administração oral e pulmonar, supositórios e aplicações transdérmicas. O tratamento por dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de múltiplas doses.

IGF pode ser produzido através de técnicas de ADN recombinante, tal como descrito em *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 169: 832-839 (1990) (IGF-II) e *Cell Regulation* 1: 197-213 (1990) (IGF-II) e *Biotechnology News* 3: 1-3 (1983) (IGF-I e II). Por exemplo, IGF pode ser produzido em *E. coli* como uma proteína de fusão com o gene *trpE* sob o controlo de um operão de triptofano modificado, tal como descrito na Patente U.S. N.º 4738921. Alternativamente, IGF pode ser sintetizado em *E. coli* sob o controlo das sequências promotoras e protectoras do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), tal como descrito em EP 478333. Os sistemas de expressão de *E. coli* aqui utilizados para expressão podem ser modificados tal como descrito na Patente U.S. N.º 5158875, para incluírem uma sequência de comando modificada carregada positivamente para permitir a dobragem correcta da proteína IGF. Para além disso, IGF pode ser produzido em transformantes de levedura metiltróficos com a sequência de codificação de IGF ligada a uma sequência sinal que dirige a secreção e o processamento proteolítico do produto proteico. A sequência sinal adequada aqui inclui a sequência do factor de conjugação alfa pre-pro de *S. cerevisiae* em estirpes de *P. pastoris* deficientes em proteases, tal como descrito em WO 92/04363. As construções de ADN para produção de IGF-II podem ser feitas e expressas em *E. coli* tal como descrito em WO 89/03423. A síntese de IGF-II recombinante pode também ser alcançada seguindo o protocolo descrito em EP 434605, que se refere à produção de IGF-II recombinante com uma porção estranha covalentemente ligada e sem a metionina N-terminal ligada. IGF pode também ser produzido em levedura tal como descrito em EP 123228 e pedido de patente U.S. N.S. 06/922199. Outro método de produzir IGF utilizando técnicas de ADN recombinante que é adequado aqui está descrito em *Biotechnology News* 10: 1-3 (1983). As sequências de codificação de IGF-I e IGF-II podem ser inseridas em vectores de ADN viral ou plasmídico circular para

formar vectores híbridos e os vectores híbridos resultantes podem ser utilizados para transformar microrganismos hospedeiros tais como células bacterianas ou de levedura. Os microrganismos transformados podem ser criados sob condições nutrientes apropriadas para expressar IGF, tal como descrito em EP 135094. IGF pode também ser produzido tal como descrito em EP 434625.

Uma IGFBP pode ser qualquer IGFBP conhecida, por exemplo, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 e IGFBP-6. A IGFBP pode ser produzida tal como descrito em Brinkman *et al.*, *EMBO J.* 7: 2417-2423 (1988), Mohan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8338-42 (1989), Patente U.S. N.º 5407913, WO 92/12243, 92/03471, 92/03470, WO 92/03469 e Brewer *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 1289-97 (1988).

A composição farmacêutica, numa concretização do presente invento, pode ser uma composição contendo PDGF sozinho, KGF sozinho, IGF sozinho e IGF com IGFBP, ou quaisquer dois dos quatro misturados um com o outro e o terceiro e quarto sozinhos, ou quaisquer três dos quatro misturados uns com os outros e o quarto sozinho, ou todos os quatro misturados numa única composição, numa dose única ou em múltiplas doses. Noutra composição do presente invento, para fins de terapia génica, a composição farmacêutica pode ser uma composição contendo um polinucleótido codificando PDGF sozinho, uma composição contendo polinucleótido codificando KGF sozinho, uma composição contendo polipéptido codificando IGF sozinho, uma composição contendo apenas IGF e IGFBP, ou todos os quatro polinucleótidos misturados uns com os outros numa única composição.

As composições de PDGF, KGF, IGF e IGF com IGFBP, se mantidas separadamente, podem ser administradas separadamente ou contemporaneamente. Adicionalmente, as concentrações de cada uma podem ser diferentes, dependendo da potência do factor e das necessidades do doente. A entrega directa das composições será geralmente alcançada através de injeção, subcutaneamente, intradermicamente, intraperitonealmente, intraluminalmente, intragastricamente, intraintestinalmente, intravenosamente ou intramuscularmente. Outros modos de administração incluem administração oral e pulmonar,

supositórios e aplicações transdérmicas. O tratamento por dosagem pode ser um programa de dose única ou um programa de múltiplas doses.

Quando PDGF, KGF, IGF ou IGFBP são administrados como polipéptidos, juntos numa única composição ou em múltiplas composições, os polipéptidos podem ser expressos através de qualquer sistema de expressão apropriado para o polipéptido.

Sistemas de expressão exemplares são listados abaixo para criação de polipéptidos de PDGF, KGF, IGF e IGFBP ou para clonagem dos polinucleótidos que os codificam para aplicação num protocolo de terapia génica.

Expressão em Células Bacterianas

Sistemas de expressão bacterianos podem ser utilizados com as presentes construções. Elementos de controlo para utilizar em bactérias incluem promotores, opcionalmente contendo sequências operadoras, e locais de ligação ao ribossoma. Promotores úteis incluem sequências derivadas de enzimas que metabolizam açúcares, tais como galactose, lactose (*lac*) e maltose. Exemplos adicionais incluem sequências promotoras derivadas de enzimas biossintéticas tais como triptofano (*trp*), o sistema promotor da β -lactamase (*bla*), PL do bacteriófago λ e T7. Adicionalmente, podem ser utilizados promotores sintéticos, tais como o promotor *tac*. Os sistemas promotores da β -lactamase e da lactose estão descritos em Chang *et al.*, *Nature* 275: 615 (1978) e Goeddel *et al.*, *Nature* 281: 544 (1979); o sistema promotor da fosfatase alcalina, triptofano (*trp*) está descrito em Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 8: 4057 (1980) e EP 36776 e promotores híbridos tais como o promotor *tac* estão descritos na Patente U.S. N.º 4551433 e deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25 (1983). No entanto, outros promotores bacterianos conhecidos úteis para expressão de proteínas eucarióticas são também adequados. Um perito na arte será capaz de ligar operacionalmente tais promotores às presentes sequências de codificação de PDGF e KGF, por exemplo, tal como descrito em Siebenlist *et al.*, *Cell* 20: 269 (1980), utilizando segmentos de ligação ou adaptadores para fornecer quaisquer locais de restrição necessários. Os promotores para utilizar em sistemas

bacterianos conterão também geralmente uma sequência de Shine-Dalgarno (SD) operacionalmente ligada ao ADN codificando o polipéptido alvo. Para células hospedeiras procarióticas que não reconhecem e processam a sequência sinal nativa do polipéptido alvo, a sequência sinal pode ser substituída por uma sequência sinal procariótica seleccionada, por exemplo, a partir do grupo de comandos da fosfatase alcalina, penicilinase, Ipp ou enterotoxina II estável ao calor. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas.

Os sistemas antecedentes são particularmente compatíveis com *Escherichia coli*. No entanto, vários outros sistemas são utilizados em hospedeiros bacterianos incluindo organismos Gram-negativos ou Gram-positivos tais como *Bacillus* sps., *Streptococcus* sps., *Streptomyces* sps., espécies de *Pseudomonas* tais como *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* ou *Serratia marcescans*, entre outros. Métodos para introdução de ADN exógeno nestes hospedeiros incluem tipicamente a utilização de CaCl_2 ou outros agentes, tais como catiões bivalentes e DMSO. O ADN pode também ser introduzido em células bacterianas por electroporação, injeção nuclear ou fusão de protoplastos tal como descrito geralmente em Sambrook et al., (1989), citado acima. Estes exemplos são ilustrativos em vez de limitantes. De preferência, a célula hospedeira deve segregar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Alternativamente, são adequados métodos *in vitro* de clonagem, p. ex., PCR ou outras reacções de polimerase de ácidos nucleicos.

Também úteis para expressão de PDGF para o presente invento são vectores descritos em EP 0622456-A1, aqui incorporada por referência, que divulga ADN para selecção e replicação autónoma em células bacterianas.

As células procarióticas utilizadas para produzir o polipéptido alvo deste invento são cultivadas em meios adequados, tal como descrito geralmente em Sambrook et al., citado acima.

Expressão em Células de Levedura

Foram desenvolvidos vectores de expressão e transformação, replicões extracromossómicos ou vectores integrantes, para transformação em muitas leveduras. Por exemplo, foram desenvolvidos vectores de expressão para, entre outras, as seguintes leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* tal como descrito em Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929 (1978); Ito et al., *J. Bacteriol.* 153: 163 (1983); *Candida albicans* tal como descrito em Kurtz et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 142 (1986); *Candida maltosa*, tal como descrito em Kunze et al., *J. Basic Microbiol.* 25: 141 (1985); *Hansenula polymorpha*, tal como descrito em Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459 (1986) e Roggenkamp et al., *Mol. Gen. Genet.* 202: 302 (1986); *Kluyveromyces fragilis*, tal como descrito em Das et al., *J. Bacteriol.* 158: 1165 (1984); *Kluyveromyces lactis*, tal como descrito em De Louvencourt et al., *J. Bacteriol.* 154: 737 (1983) e Van den Berg et al., *Bio/Technology* 8: 135 (1990); *Pichia guillierimondii*, tal como descrito em Kunze et al., *J. Basic Microbiol.* 25: 141 (1985); *Pichia pastoris*, tal como descrito em Cregg et al., *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376 (1985) e Patentes U.S. N^{os} 4837148 e 4929555; *Schizosaccharomyces pombe*, tal como descrito em Beach e Nurse, *Nature* 300: 706 (1981); e *Yarrowia lipolytica*, tal como descrito em Davidow et al., *Curr. Genet.* 10: 380 (1985) e Gaillardin et al., *Curr. Genet.* 10: 49 (1985), hospedeiros *Aspergillus* tais como *A. nidulans*, tal como descrito em Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 284-289 (1983); Tilburn et al., *Gene* 26: 205-221 (1983) e Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1470-1474 (1984) e *A. niger*, tal como descrito em Kelly e Hynes, *EMBO J.* 4: 475-479 (1985); *Trichoderma reesia*, tal como descrito em EP 0244234 e fungos filamentosos tais como, p. ex., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, tal como descrito em WO 91/00357.

As sequências de controlo para vectores de levedura são conhecidas e incluem regiões promotoras de genes tais como da álcool-desidrogenase (ADH), tal como descrito em EP 284044, enolase, glucocinase, glucose-6-fosfato-isomerase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAP ou GAPDH), hexocinase, fosfofrutocinase, 3-fosfoglicerato-mutase e piruvato-cinase (PyK), tal como descrito em EP 329203. O gene

PHO5 de levedura, codificando a fosfatase ácida, proporciona também sequências promotoras úteis, tal como descrito em Myanohara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1 (1983). Outras sequências promotoras adequadas para utilizar com hospedeiros de levedura incluem os promotores para a 3-fosfoglicerato-quinase, tal como descrito em Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255: 2073 (1980) ou outras enzimas glicolíticas, tais como a piruvato-descarboxilase, triosefosfato-isomerase e fosfoglicose-isomerase, tal como descrito em Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149 (1968) e Holland et al., *Biochemistry* 17: 4900 (1978). Promotores indutíveis de levedura possuindo a vantagem adicional de transcrição controlada por condições de crescimento, incluem da lista de cima e outros as regiões promotoras para a álcool-desidrogenase 2, isocitocromo C, fosfatase ácida, enzimas de degradação associadas ao metabolismo do azoto, metalotioneína, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase e enzimas responsáveis pela utilização da maltose e da galactose. Vectores e promotores adequados para utilizar em expressão de levedura são ainda descritos em Hitzeman, EP 073657. Estimuladores de levedura são também vantajosamente utilizados com promotores de levedura. Adicionalmente, promotores sintéticos que não ocorrem na natureza funcionam também como promotores de levedura. Por exemplo, as sequências ativadoras a montante (UAS) de um promotor de levedura podem ser unidas com a região de activação da transcrição de outro promotor de levedura, criando um promotor híbrido sintético. Exemplos de tais promotores híbridos incluem a sequência reguladora da ADH ligada à região de activação da transcrição de GAP, tal como descrito nas Patentes U.S. N^{os} 4876197 e 4880734. Outros exemplos de promotores híbridos incluem promotores que consistem em sequências reguladoras dos genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10* ou *PHO5*, combinadas com a região de activação da transcrição de um gene de uma enzima glicolítica tal como GAP ou *PyK*, tal como descrito em EP 164556. Para além disso, um promotor de levedura pode incluir promotores de ocorrência natural sem ser de origem em levedura que tenham a capacidade de se ligar a ARN-polimerase de levedura e iniciar a transcrição.

Outros elementos de controlo que podem ser incluídos nos vectores de expressão de levedura são terminadores, por

exemplo, de *GAPDH* e do gene da enolase, tal como descrito em Holland *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256: 1385 (1981), e sequências de comando que codifiquem sequências sinal para secreção. O ADN codificando sequências sinal adequadas pode ser derivado de genes para proteínas de levedura segregadas, tais como o gene da invertase de levedura tal como descrito em EP 012873 e JP 62096086 o gene do factor α , tal como descrito nas Patentes U.S. N^{os} 4588684, 4546083 e 4870008; EP 324274; e WO 89/02463. Alternativamente, comandos sem ser de origem em levedura, tais como um comando de interferão, proporcionam também secreção em levedura, tal como descrito em EP 060057.

Os métodos de introdução de ADN exógeno em hospedeiros de levedura são bem conhecidos na arte e incluem tipicamente a transformação de esferoplastos ou de células de levedura intactas tratadas com catiões álcali. As transformações para levedura podem ser realizadas de acordo com o método descrito em Van Solingen *et al.*, *J. Bact.* 130: 946 (1977) e Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3829 (1979). No entanto, outros métodos para introdução de ADN em células tais como por injeção nuclear, electroporação ou fusão de protoplastos podem também ser utilizados tal como descrito geralmente em Sambrook *et al.*, citado acima.

Para secreção de levedura a sequência sinal nativa do polipéptido alvo pode ser substituída pelos comandos da invertase de levedura, factor α ou fosfatase ácida. A origem de replicação da origem do plasmídeo 2 μ é adequada para levedura. Um gene de selecção adequado para utilizar em levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura descrito em Kingsman *et al.*, *Gene* 7: 141 (1979) ou Tschemper *et al.*, *Gene* 10: 157 (1980). O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura sem a capacidade de crescer em triptofano. De forma semelhante, estirpes de levedura deficientes em *Leu2* (ATCC 20622 ou 38626) são complementadas por plasmídeos conhecidos possuindo o Gene *Leu2*.

Para produção intracelular dos presentes polipéptidos em levedura, uma sequência codificando uma proteína de levedura pode ser ligada a uma sequência de codificação do polipéptido PDGF ou KGF para produzir uma proteína de fusão que pode ser

clivada intracelularmente pelas células de levedura após expressão. Um exemplo, de uma tal sequência sinal de levedura é o gene da ubiquitina de levedura.

Expressão em Células de Insecto

Os vectores de expressão de baculovírus (BEV) são vírus de insecto recombinantes nos quais a sequência de codificação para um gene estranho a expressar é inserida por trás de um promotor de baculovírus no lugar de um gene viral, p. ex., poli-hedrina, tal como descrito em Smith e Summers, Patente U.S. N.º 4745051.

Uma construção de expressão aqui inclui um vector de ADN útil como intermediário para a infecção ou transformação de um sistema de células de insecto, contendo geralmente o vector ADN codificando para um promotor da transcrição de baculovírus, opcionalmente mas de preferência, seguido a jusante por uma sequência de ADN sinal de insecto capaz de dirigir a secreção de uma proteína desejada, e um local para inserção do gene estranho codificando a proteína estranha, sendo a sequência de ADN sinal e o gene estranho colocados sob o controlo de transcrição de um promotor de baculovírus, sendo o gene estranho aqui a sequência de codificação do polipéptido PDGF ou KGF.

O promotor para utilizar aqui pode ser uma região promotora da transcrição de baculovírus derivada de qualquer um dos mais de 500 baculovírus que geralmente infectam insectos, tais como, por exemplo, as Ordens *Lepidoptera*, *Diptera*, *Orthoptera*, *Coleoptera* e *Hymenoptera* incluindo, por exemplo, mas não se limitando aos ADN virais de MNPV de *Autographa californica*, MNPV de *Bombyx mori*, MNPV de *Richoplusia ni*, MNPV de *Rachlplusia* ou ou MNPV de *Galleria mellonella*. Assim, o promotor da transcrição de baculovírus pode ser, por exemplo, um promotor do gene imediato-inicial de baculovírus IEI ou IEN; um gene imediato-inicial em combinação com uma região promotora de um gene retardado-inicial de baculovírus seleccionada a partir do grupo que consiste num fragmento *HindIII* de 39K contendo um gene retardado-inicial; ou um promotor de um gene tardio de baculovírus. Os promotores

imediatamente-inicial ou retardado-inicial podem ser estimulados com elementos estimuladores da transcrição.

Particularmente adequado para utilizar aqui é o promotor forte da poli-hedrina do baculovírus, que dirige um elevado nível de expressão de uma inserção de ADN, tal como descrito em Friesen *et al.*, (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression" em: "The Molecular Biology of Baculovirus" (W. Doerfler, ed.); EP 127839 e EP 155476; e o promotor do gene codificando a proteína p10, tal como descrito em Vlak *et al.*, *J. Gen. Virol.* 69: 765-776 (1988).

O plasmídeo para utilizar aqui contém normalmente o sinal de poliadenilação da poli-hedrina, tal como descrito em Miller *et al.*, *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 177 (1988) e um gene procariótico de resistência à ampicilina (amp) e uma origem de replicação para selecção e propagação em *E. coli*. ADN codificando sequências sinal adequadas pode também ser incluído e é geralmente derivado de genes para proteínas de insecto ou baculovírus segregadas, tais como o gene da poli-hedrina de baculovírus, tal como descrito em Carbonell *et al.*, *Gene* 73: 409 (1988), bem como sequências sinal de mamífero tais como as derivadas de genes codificando o interferão α humano tal como descrito em Maeda *et al.*, *Nature* 315: 592-594 (1985); péptido de libertação da gastrina humana, tal como descrito Lebacqz-Verheyden *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8: 3129 (1988); IL-2 humana, tal como descrito Smith *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8404 (1985); IL-3 de ratinho, tal como descrito em Miyajima *et al.*, *Gene* 58: 273 (1987); e glucocerebrosidase humana, tal como descrito em Martin *et al.*, *DNA* 7: 99 (1988).

Foram identificadas numerosas estirpes de baculovírus e variantes, e correspondentes células hospedeiras de insecto permissivas de hospedeiros tais como células hospedeiras de *Spodoptera frugiperda* (lagarta), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e *Bombyx mori*, e podem ser utilizadas aqui. Ver, por exemplo, a descrição em Luckow *et al.*, *Bio/Technology* 6: 47-55 (1988), Miller *et al.*, em "Genetic Engineering" (Setlow, J.K. *et al.*, eds.), Vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), págs. 277-279, e Maeda *et al.*, *Nature* 315: 592-594 (1985). Uma variedade

de tais estirpes virais está publicamente disponível, p. ex., a variante L-1 de NPV de *Autographa californica* e a estirpe Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*. Tais vírus podem ser utilizados como vírus para transfecção de células hospedeiras tais como células de *Spodoptera frugiperda*.

Outros genes de baculovírus para além do promotor da poli-hedrina podem ser empregues com vantagem num sistema de expressão de baculovírus. Estes incluem imediatos-iniciais (alfa), retardados-iniciais (beta), tardios (gama) ou muito tardios (delta), de acordo com a fase da infecção viral durante a qual são expressos. A expressão destes genes ocorre sequencialmente, provavelmente em resultado de um mecanismo em "cascata" de regulação da transcrição. Assim, os genes imediatos-iniciais são expressos imediatamente após a infecção, na ausência de outras funções virais e um ou mais dos produtos génicos resultantes induz a transcrição dos genes retardados-iniciais. Por sua vez, alguns produtos dos genes retardados-iniciais induzem a transcrição de genes tardios e finalmente os genes muito tardios são expressos sob o controlo de produtos génicos previamente expressos a partir de uma ou mais das classes anteriores. Um componente relativamente bem definido desta cascata reguladora é IEI, um gene imediato-inicial preferido do vírus da poli-hedrose nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV). IEI é pressionado na ausência de outras funções virais e codifica um produto que estimula a transcrição de vários genes da classe retardado-inicial, incluindo o gene 39K preferido, tal como descrito em Guarino e Summers, *J. Virol.* 57: 563-571 (1986) e *J. Virol.* 61: 2091-2099 (1987) bem como genes tardios, tal como descrito em Guarino e Summers, *Virol.* 162: 444-451 (1988).

Genes imediatos-iniciais tal como descrito acima podem ser utilizados em combinação com uma região promotora de um gene de baculovírus da categoria retardados-iniciais. Ao contrário dos genes imediatos-iniciais, tais genes retardados-iniciais requerem a presença de outros genes virais ou de produtos génicos tais como os dos genes imediatos-iniciais. A combinação de genes imediatos-iniciais pode ser feita com qualquer uma de várias regiões promotoras de genes retardados-iniciais tais como 39K ou um dos promotores de genes retardados-iniciais verificados no fragmento *HindIII* do genoma

de baculovírus. No presente caso, a região promotora de 39K pode ser ligada ao gene estranho a expressar para que a expressão possa ser controlada ainda pela presença de IEI, tal como descrito em L.A. Guarino e Summers (1986a), citado acima; Guarino e Summers (1986b) *J. Virol.* 60: 215-223 (1986) e Guarino *et al.*, *J. Virol.* 60: 224-229 (1986c).

Adicionalmente, quando é utilizada uma combinação de genes imediatos-iniciais com uma região promotora de um gene retardado-inicial, o aumento da expressão de genes heterólogos pode ser alcançado através da presença de uma sequência estimuladora em ligação directa *cis* com a região promotora do gene retardado-inicial. Tais sequências estimuladoras caracterizam-se pela sua estimulação da expressão de genes retardados-iniciais em situações onde o gene imediato-inicial ou o seu produto é limitado. Por exemplo, a sequência estimuladora hr5 pode ser directamente ligada, em *cis*, à região promotora do gene retardado-inicial, 39K, estimulando deste modo a expressão do ADN heterólogo clonado tal como descrito em Guarino e Summers (1986a), (1986b) e Guarino *et al.* (1986).

O gene da poli-hedrina é classificado como um gene muito tardio. Por isso, a transcrição a partir do promotor da poli-hedrina requer a expressão prévia de um número desconhecido, mas provavelmente elevado, de outros produtos de genes virais e celulares. Devido a esta expressão retardada do promotor da poli-hedrina, BEV do estado da arte, tais como o sistema exemplar de BEV descrito por Smith e Summers, por exemplo na Patente U.S. N.º 4745051, expressarão genes estranhos apenas como resultado da expressão génica do resto do genoma viral e apenas após a infecção viral estar em curso. Isto representa uma limitação da utilização dos BEV existentes. A capacidade da célula hospedeira para processar proteínas recentemente sintetizadas diminui à medida que a infecção por baculovírus progride. Assim, a expressão génica a partir do promotor da poli-hedrina ocorre numa altura em que a capacidade da célula hospedeira para processar proteínas recentemente sintetizadas está potencialmente diminuída para certas proteínas tais como o activador do plasminogénio tecidual humano. Como consequência, a expressão de glicoproteínas secretoras em sistemas BEV é complicada devido a secreção incompleta do

produto génico clonado, aprisionando deste modo o produto génico clonado dentro da célula numa forma processada de forma incompleta.

Embora se tenha reconhecido que uma sequência sinal de insecto pode ser utilizada para expressar uma proteína estranha que pode ser clivada para produzir uma proteína madura, o presente invento é de preferência praticado com uma sequência sinal de mamífero, por exemplo a sequência sinal de PDGF ou de KGF ou de IGF ou de IGFBP.

Uma sequência sinal de insecto exemplar adequada aqui é a sequência que codifica para um péptido hormona adipocinética de Lepidóptero (AKH). A família de AKH consiste em pequenos neuropéptidos bloqueados que regulam a mobilização e metabolismo de substrato energético em insectos. Numa concretização preferida, pode ser utilizada uma sequência de ADN codificando para um péptido sinal de AKH do Lepidóptero *Manduca sexta*. Outros péptidos sinal de AKH podem ser empregues com vantagem, tal como o do locus do Ortóptero *Schistocerca gregaria*. Outra sequência sinal de insecto exemplar é a sequência que codifica para proteínas da cutícula de Drosófila tais como CP1, CP2, CP3 ou CP4.

Actualmente, o vector de transferência mais vulgarmente utilizado que pode ser utilizado aqui para introduzir genes estranhos em AcNPV é pAc373. Muitos outros vectores, conhecidos dos peritos na arte, podem também ser aqui utilizados. Materiais e métodos para sistemas de expressão baculovírus/células de insecto estão comercialmente disponíveis na forma de um estojo em companhias tais como Invitrogen (San Diego, CA) (estojo "MaxBac"). As técnicas aqui utilizadas são geralmente conhecidas dos peritos na arte e estão completamente descritas em Summers e Smith, "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N.º 1555, Texas A&M University (1987); Smith *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156 (1983), e Luckow e Summers (1989). Estes incluem, por exemplo, a utilização de pVL985 que altera o codão de iniciação da poli-hedrina de ATG para ATT e que introduz um local de clonagem *Bam*HI 32 pares de bases a

jusante do ATT, tal como descrito em Luckow e Summers, *Virology* 17: 31 (1989).

Assim, por exemplo, para expressão em células de insecto dos presentes polipéptidos, a sequência de ADN desejada pode ser inserida no vector de transferência, utilizando técnicas conhecidas. Uma célula hospedeira de insecto pode ser co-transformada com o vector de transferência contendo o ADN desejado inserido juntamente com o ADN genómico do baculovírus de tipo selvagem, normalmente por co-transfecção. Deixa-se que o vector e o genoma viral recombinem resultando num vírus recombinante que pode ser facilmente identificado e purificado. O vírus recombinante empacotado pode ser utilizado para infectar células hospedeiras de insecto para expressar os polipéptidos PDGF e KGF.

Outros métodos que são aplicáveis aqui são os métodos padrão de cultura de células de insecto, co-transfecção e preparação de plasmídeos que são expostos em Summers e Smith (1987), citado acima. Esta referência refere-se aos métodos padrão de clonagem de genes em vectores de transferência AcMNPV, isolamento de ADN plasmídico, transferência de genes para o genoma de AcMNPV, purificação de ADN viral, marcação radioactiva de proteínas recombinantes e preparação de meios de cultura para células de insecto. O procedimento para o cultivo de vírus e células está descrito em Volkman e Summers, *J. Virol.* 19: 820-832 (1975) e Volkman *et al.*, *J. Virol.* 19: 820-832 (1976).

Expressão em Células de Mamífero

Promotores típicos para expressão em células de mamífero incluem o promotor inicial de SV40, o promotor de CMV, o promotor LTR do vírus do tumor mamário de ratinho, o promotor principal tardio de adenovírus (AdMLP) e o promotor do vírus herpes *simplex*, entre outros. Outros promotores não virais, tais como um promotor derivado do gene da metalotioneína de murídeo, encontrarão também utilização em construções de mamífero. A expressão de mamífero pode ser constitutiva ou regulada (indutível), dependendo do promotor. Tipicamente, sequências de terminação da transcrição e de poliadenilação estarão também presentes, situadas a 3' do codão de terminação

da tradução. De preferência, está também presente uma sequência para otimização da iniciação da tradução, situada a 5' da sequência de codificação do polipéptido PDGF ou KGF. Exemplos de sinais terminador da transcrição/poliadenilação incluem os derivados de SV40, tal como descrito em Sambrook *et al.* (1989), citado anteriormente. Intrões, contendo locais dadores e aceitadores de processamento, podem também ser concebidos nas construções do presente invento.

Elementos estimuladores podem também ser utilizados aqui para aumentar os níveis de expressão das construções de mamífero. Exemplos incluem o estimulador do gene inicial de SV40, tal como descrito em Dijkema *et al.*, *EMBO J.* 4: 761 (1985) e o estimulador/promotor derivado da repetição terminal longa (LTR) do Vírus do Sarcoma de Rous, tal como descrito em Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6777 (1982b) e citomegalovírus humano, tal como descrito em Boshart *et al.*, *Cell* 41: 521 (1985). Pode também estar presente uma sequência de comando que inclui uma sequência codificando um péptido sinal, para proporcionar a secreção da proteína estranha em células de mamífero. De preferência, existem locais de processamento codificados entre o fragmento de comando e o gene de interesse para que a sequência de comando possa ser clivada *in vivo* ou *in vitro*. O comando tripartido de adenovírus é um exemplo de uma sequência de comando que proporciona secreção de uma proteína estranha em células de mamífero.

Existem vectores de expressão que proporcionam a expressão transiente em células de mamífero de ADN codificando o polipéptido alvo. Em geral, a expressão transiente envolve a utilização de um vector de expressão que é capaz de se replicar eficientemente numa célula hospedeira, para que a célula hospedeira acumule muitas cópias do vector de expressão e, por sua vez, sintetize elevados níveis de um polipéptido desejado codificado pelo vector de expressão. Os sistemas de expressão transiente, compreendendo um vector de expressão adequado e uma célula hospedeira, permitem a identificação positiva conveniente dos polipéptidos codificados pelos ADN clonados, bem como a pesquisa rápida de tais polipéptidos quanto a propriedades biológicas ou fisiológicas desejadas. Assim, os sistemas de expressão transiente são particularmente

úteis para fins de identificação de análogos e variantes do polipéptido alvo que têm actividade semelhante à do polipéptido.

O vector de expressão tal como divulgado em EP 0622456 A1 para expressão da cadeia β de PDGF é também útil para o presente invento para expressão de PDGF através de um promotor viral funcional em células de mamífero.

Uma vez completos, os vectores de expressão em mamífero podem ser utilizados para transformar qualquer uma de várias células de mamífero. Os métodos para introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamífero são conhecidos na arte e incluem transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulamento do(s) polinucleótido(s) em lipossomas e micro-injecção directa do ADN nos núcleos. Aspectos gerais de transformações de sistemas hospedeiros de células de mamífero foram descritos por Axel na Patente U.S. N.º 4399216.

Linhas celulares de mamífero disponíveis como hospedeiros para expressão são também conhecidas e incluem muitas linhas celulares imortalizadas disponíveis em American Type Culture Collection (ATCC), incluindo mas não se limitando a, células de ovário de *hamster* chinês (CHO), células HeLa, células de rim de *hamster* bebé (BHK), células de rim de macaco (COS), células de carcinoma hetapocelular humano (p. ex., Hep G2), células de rim embrionário humano, células de rim de *hamster* bebé, células de Sertoli de ratinho, células de rim canino, células de fígado de rato-búfalo, células de pulmão humano, células de fígado humano, células de tumor mamário de ratinho, bem como outras.

As células hospedeiras de mamífero utilizadas para produzir o polipéptido alvo deste invento podem ser cultivadas numa variedade de meios. Meios comercialmente disponíveis tais como F10 de Ham (Sigma), Meio Essencial Mínimo ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma) e Meio de Eagle modificado por Dulbecco ([DMEM], Sigma) são adequados para cultura das células hospedeiras. Adicionalmente, qualquer um dos meios descritos em Ham e Wallace, *Meth. Enz.* 58: 44 (1979); Barnes e Sato,

Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes U.S. N^{os} 4767704, 4657866, 4927762 ou 4560655, WO 90/103430, WO 87/00195, e U.S. RE 30985, pode ser utilizado como meio de cultura para as células hospedeiras. Qualquer um destes meios pode ser suplementado conforme necessário com hormonas e/ou outros factores de crescimento tais como insulina, transferrina ou factor de crescimento epidérmico, sais (tais como cloreto de sódio, cálcio, magnésio e fosfato), tampões (tais como HEPES), nucleósidos (tais como adenosina e timidina), antibióticos (tais como o fármaco GentamicinaTM M), elementos vestigiais (definidos como compostos inorgânicos normalmente presentes a concentrações finais no alcance micromolar) e glucose ou uma fonte de energia equivalente. Quaisquer outros suplementos necessários podem também ser incluídos a concentrações apropriadas que devem ser conhecidas dos peritos na arte. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e semelhantes, são as anteriormente utilizadas com a célula hospedeira seleccionada para expressão e serão aparentes para os vulgares peritos na arte.

Administração para Terapia Génica de PDGF, KGF e IGF ou PDGF, KGF, IGF e IGFBP

Para fins de terapia génica, os polinucleótidos codificando PDGF, KGF e IGF ou PDGF, KGF, IGF e IGFBP podem ser administrados ao animal para expressão. Mais, os polinucleótidos podem ser administrados como um polinucleótido nu ou podem ser ligados a outros polinucleótidos para fins de entrega, tais como vectores virais. Tais polinucleótidos podem também ser encapsulados em lipossomas ou outros meios de entrega tal como convencional na arte. Exemplos das utilizações de protocolos de terapia génica para administração de KGF, PDGF, IGF e IGFBP são detalhados abaixo.

Quando são aplicadas técnicas de terapia génica ao presente invento, KGF, PDGF e IGF podem ser expressos por diferentes vectores ou pelo mesmo vector; também KGF, PDGF, IGF e IGFBP podem ser expressos por diferentes vectores ou pelo mesmo vector. O controlo regulador de cada produto génico é distinto e um perito na arte de terapia e expressão génicas pode seleccionar as sequências reguladoras apropriadas para

KGF, PDGF e IGF ou, onde IGFBP é também administrado, sequências reguladoras também apropriadas para IGFBP.

Alternativamente, vectores compreendendo sequências polinucleotídicas codificando os polipéptidos KGF e PDGF, e também o polipéptido IGF, e também IGFBP quando IGFBP for também administrada, podem ser utilizados directamente para terapia génica e administrados utilizando protocolos padrão de entrega génica. Neste aspecto, as sequências nucleotídicas codificando polipéptidos KGF, PDGF e IGF e também IGFBP quando IGFBP for também administrada, podem ser estavelmente integradas no genoma da célula hospedeira ou mantidas num elemento epissómico estável na célula hospedeira. Os métodos para entrega de genes são conhecidos na arte, tal como descrito na Patente U.S. N.º 5399346.

As estratégias de terapia génica para entrega de construções do presente invento podem utilizar abordagens de vectores virais ou não virais na modalidade *in vivo* ou *ex vivo*. A expressão de tal sequência de codificação pode ser induzida utilizando promotores de mamífero endógenos ou heterólogos. A expressão da sequência de codificação *in vivo* pode ser constitutiva ou regulada.

Para entrega utilizando vectores virais, pode ser utilizado qualquer um de vários vectores virais, tal como descrito em Jolly, *Cancer Gene Therapy* 1: 51-64 (1994). Por exemplo, a sequência de codificação pode ser inserida em plasmídeos concebidos para expressão em vectores retrovirais, tal como descrito em Kimura *et al.*, *Human Gene Therapy* 5: 845-852 (1994), vectores adenovírus, tal como descrito em Connelly *et al.*, *Human Gene Therapy* 6: 185-193 (1995), vectores virais adeno-associados, tal como descrito em Kaplitt *et al.*, *Nature Genetics* 6: 148-153 (1994) e vectores de sindbis. Promotores que são adequados para utilizar com estes vectores incluem o promotor de CMV, LTR retroviral de Moloney, e o promotor da albumina de ratinho. Vírus livres incompetentes para replicação podem ser produzidos e injectados directamente no animal ou em humanos ou através de transdução de uma célula autóloga *ex vivo*, seguido de injeção *in vivo* tal como descrito em Zatloukal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5148-5152 (1994).

A sequência de codificação alterada pode também ser inserida em plasmídeos para expressão do polipéptido *in vivo* ou *ex vivo*. Para terapia *in vivo*, a sequência de codificação pode ser distribuída através de injeção directa no tecido ou através de infusão intravenosa. Promotores adequados para utilizar deste modo incluem promotores endógenos e heterólogos tais como CMV. Ainda, um promotor sintético T7T7/T70B pode ser construído de acordo com Chen *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22: 2114-2120 (1994), onde a polimerase T7 está sob o controlo regulador do seu próprio promotor e dirige a transcrição da sequência de codificação, que é também colocada sob o controlo de um promotor T7. A sequência de codificação pode ser injectada numa formulação compreendendo um tampão que pode estabilizar a sequência de codificação e facilitar a transdução desta para células e/ou proporcionar direccionamento, tal como descrito Zhu *et al.*, *Science* 261: 209-211 (1993).

A expressão da sequência de codificação *in vivo* após entrega para fins de terapia génica por vectores virais ou não virais pode ser regulada para eficácia e segurança máximas através da utilização de promotores da expressão génica regulados tal como descrito em Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992). Por exemplo, a sequência de codificação pode ser regulada através de promotores que respondem a tetraciclina. Estes promotores podem ser regulados de um modo positivo ou negativo através de tratamento com a molécula reguladora.

Para entrega não viral da sequência de codificação, a sequência pode ser inserida em vectores convencionais que contenham sequências de controlo convencionais para expressão de elevado nível e ser depois incubada com moléculas sintéticas de transferência de genes tais como catiões poliméricos de ligação ao ADN tal como polilisina, protamina e albumina, ligada a ligandos que se dirigem a células alvo tais como asialoorosomucóide, tal como descrito em Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987); insulina, tal como descrito em Hucked *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 40: 253-263 (1990); galactose, tal como descrito em Plank *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 3: 533-539 (1992); lactose, tal como descrito em Midoux *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21: 871-878 (1993); ou

transferrina, tal como descrito em Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414 (1990). Outros sistemas de entrega incluem a utilização de lipossomas para encapsular ADN compreendendo o gene sob o controlo de uma variedade de promotores específicos de tecido ou activos de forma ubíqua, tal como descrito em Nabel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11307-11311 (1993) e Philip *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 14: 2411-2418 (1994). Outra entrega não viral adequada para utilizar inclui sistemas de entrega mecânica tais como a abordagem biolística, tal como descrito em Woffendin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(24): 11581-11585 (1994). Para além disso, a sequência de codificação e o produto de expressão de tal podem ser distribuídos através de deposição de materiais de hidrogel fotopolimerizados. Outros métodos convencionais para entrega de genes que podem ser utilizados para entrega da sequência de codificação incluem, por exemplo, utilização de pistola de partículas de transferência génica manual, tal como descrito em U.S. 5149655; utilização de radiação ionizante para activação de genes transferidos, tal como descrito em U.S. 5206152 e pedido PCT WO 92/11033.

A aplicação de tecnologia de terapia génica em relação aos péptidos e polipéptidos utilizados no presente invento e seus análogos ou variantes pode ser feita quando for benéfico tratar um ferimento através de terapia génica, por exemplo, com ferimentos crónicos tais como úlceras ou com qualquer ferimento no qual as células no local do ferimento respondam a um protocolo de terapia génica.

Em geral, a terapia génica pode ser aplicada de acordo com o presente invento em todas as situações onde seja benéfico tratar um ferimento através de administração, de acordo com um protocolo de terapia génica, de uma quantidade suficiente de um péptido do presente invento ou seu análogo, variante ou dominante negativo, por exemplo, para modulação da actividade normal de interacções de pares de ligação. Pode ser necessária administração subsequente dependendo da condição do ferimento e do ambiente com o qual se apresenta.

Vectores codificando os polipéptidos KGF, PDGF, IGF e IGFBP podem também ser empacotados em lipossomas antes da entrega ao sujeito ou a células derivadas deste. O

encapsulamento lipídico é geralmente alcançado utilizando lipossomas que são capazes de se ligar ou aprisionar estavelmente e manter o ácido nucleico. A proporção de ADN condensado para a preparação lipídica pode variar mas será geralmente de cerca de 1:1 (mg de ADN:micromoles de lípido) ou mais do lípido. Para uma revisão da utilização de lipossomas como transportadores para entrega de ácidos nucleicos, ver, Hug e Sleight, *Biochem. Biophys. Acta* 1097: 1-17 (1991); Straubinger et al., *Methods of Enzymology* 101: 512-527 (1983).

As preparações de lipossomas para utilizar no presente invento incluem preparações catiónicas (carregadas positivamente), aniónicas (carregadas negativamente) e neutras, sendo particularmente preferidos lipossomas catiónicos. Mostrou-se que lipossomas catiónicos medeiam a entrega intracelular de ADN plasmídico (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7416 (1987)); ARNm (Malone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6077-6081 (1989)); e factores de transcrição purificados (Debs et al., *J. Biol. Chem.* 265: 10189-10192 (1990)), na forma funcional.

Os lipossomas catiónicos estão facilmente disponíveis. Por exemplo, lipossomas N[1-2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trietilamónio (DOTMA) estão disponíveis sob a marca registada Lipofectin, em Gibco BRL, Grand Island, N.Y. (Ver, também, Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7416 (1987)). Outros lipossomas comercialmente disponíveis incluem transfectase (DDAB/DOPE) e DOTAP/DOPE (Boehringer). Outros lipossomas catiónicos podem ser preparados a partir de materiais facilmente disponíveis utilizando técnicas bem conhecidas na arte. Ver, p. ex., Szoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198 (1978); Publicação PCT N.º WO 90/11092 para uma descrição da síntese de lipossomas DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamónio)propano).

De forma semelhante, estão facilmente disponíveis lipossomas aniónicos e neutros, tais como Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) ou podem ser facilmente preparados utilizando materiais facilmente disponíveis. Tais materiais incluem fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre outros.

Estes materiais podem também ser misturados com os materiais de partida DOTMA e DOTAP em proporções apropriadas. Os métodos para fazer lipossomas utilizando estes materiais são bem conhecidos na arte.

Os lipossomas podem compreender vesículas multilamelares (MLV), pequenas vesículas unilamelares (SUV) ou grandes vesículas unilamelares (LUV). Os vários complexos lipossoma-ácido nucleico são preparados utilizando métodos conhecidos na arte. Ver, p. ex., Straubinger et al., em *Methods of Enzymology*, Vol. 101, págs. 512-527 (1983); Szoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4194-4198 (1978); Papahadjopoulos et al., *Biochem. Biophys. Acta* 394: 483 (1975); Wilson et al., *Cell* 17: 77 (1979); Deamer e Bangham *Biochem. Biophys. Acta* 443: 629 (1976); Ostro et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76: 836 (1977); Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3348 (1979); Enoch e Strittmatter *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 145 (1979); Fraley et al., *J. Biol. Chem.* 225: 10431 (1980); Szoka e Papahadjopoulos *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 145 (1978); e Schaefer-Ridder et al., *Science* 215: 166 (1982).

Os lipossomas estão incluídos dentro da definição de um transportador farmacêuticamente aceitável. O termo "lipossomas" refere-se a, por exemplo, as composições de lipossomas descritas na Patente U.S. N.º 5422120, WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445 e EP 524968 B1. Os lipossomas podem ser transportadores farmacêuticos para os polinucleótidos ou polipéptidos do presente invento, ou para combinação dos dois. O agente terapêutico pode ser conjugado com um lipossoma ou pode ser conjugado com um polímero de hidrogel, e o polímero de hidrogel (ou um componente de um polímero de hidrogel) conjugado ou encapsulado por um lipossoma.

Os vectores recombinantes (encapsulados ou não em lipossomas) podem ser administrados em composições farmacêuticas tal como descrito acima. As composições farmacêuticas compreenderão material genético suficiente para produzir uma quantidade terapeuticamente eficaz do análogo ou análogos, tal como descrito acima. Para fins do presente invento, uma dose eficaz será de cerca de 0,05 mg/kg a cerca

de 50 mg/kg de construções de ADN no indivíduo ao qual são administradas.

Uma vez formuladas, as composições do presente invento podem ser administradas directamente ao sujeito ou, alternativamente, no caso dos vectores descritos acima, distribuídas *ex vivo*, a células derivadas do sujeito. Os métodos para a entrega *ex vivo* e reimplantação de células transformadas num sujeito são conhecidos na arte e descritos em, por exemplo, WO 93/14778. Geralmente, tais métodos incluirão transfecção mediada por dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, electroporação, encapsulamento do(s) polinucleótido(s) em lipossomas e micro-injecção directa do ADN nos núcleos, tal como bem conhecido na arte.

A administração das combinações terapêuticas do presente invento pode ser alcançada através de, por exemplo, creme tópico, espuma, injeção, vapor de aerossol, numa matriz de gel, uma esponja, gotas e uma lavagem. A administração pode ser através de, por exemplo, administração local, oral, intradérmica, subcutânea, intraluminal, intragástrica e intraperitoneal com uma formulação apropriada da composição seleccionada feita de uma combinação de agentes terapêuticos apropriados para um tratamento em particular.

Os agentes terapêuticos do presente invento podem ser administrados numa dosagem e quantidade terapeuticamente eficazes, no processo de um protocolo terapeuticamente eficaz para tratamento do doente. A dosagem inicial e quaisquer subsequentes administradas dependerão da idade, peso e condição do doente e da doença, ferimento, distúrbio ou condição biológica a tratar. Dependendo do agente terapêutico, a dosagem e o protocolo para administração variarão e a dosagem dependerá também do método de administração seleccionado, por exemplo, administração local ou sistémica.

O ferimento no qual são aplicadas as combinações terapêuticas pode ser interno ou externo e podem ser dirigidas para qualquer tecido que exhiba um ferimento, por exemplo, tecido epitelial. Para administração tópica de IGF, pode ser aplicada uma formulação de óxido de zinco, que induza a

produção local de IGF, tal como descrito em Tarnow *et al.*, *Scand J. Plast. Reconstr. Hand Surg.* 28: 255-259 (1994). A administração de combinações terapêuticas do presente invento pode ser alcançada com qualquer combinação dos agentes terapêuticos, por exemplo, através da administração de PDGF e KGF seguida de IGF com IGFBP, ou através da administração de PDGF, KGF, IGF e IGFBP ao mesmo tempo ou muito muitos próximos no tempo. A dosagem de cada agente terapêutico para um dado ferimento e um determinado doente é concebida para alcançar uma dose eficaz máxima para o agente terapêutico. As dosagens apropriadas para um dado tratamento podem depender da combinação em particular dos agentes terapêuticos seleccionados para tratamento. Por exemplo, mostrou-se que IGF sozinho é menos potente que IGF administrado em conjunto com IGFBP.

As doses para um determinado ferimento serão determinadas numa base doente-a-doente e dependem do tamanho do ferimento, do tipo de ferimento e da composição que é aplicada. As doses para cada agente terapêutico foram determinadas dentro de intervalos. Por exemplo, determinou-se que uma dose eficaz de PDGF é de 5 ng/mm² ou superior quando aplicada topicamente tal como descrito na Patente U.S. N.º 4861757 e pelo menos de 1 ng/ml de concentração local de uma isoforma de PDGF (por exemplo, PDGF-AA, PDGF-BB ou PDGF-AB) até cerca de 30 ng/ml de concentração local aplicada numa população de fibroblastos tal como descrito em Lepisto *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209: 393-399 (1995). PDGF pode ser administrado numa formulação em gel de carboximetilcelulose a concentrações de cerca de 10 µg/g a cerca de 500 µg/g de gel, cerca de 20 µg/g a cerca de 200 µg/g, e cerca de 30 µg/g a cerca de 100 µg/g de gel, optimamente cerca de 100 µg/g de gel. A eficácia de PDGF foi alcançada dentro de um intervalo de cerca de 3 µg/ml de solução a cerca de 300 µg/ml de solução administrada.

Cerca de 50 µl de KGF de uma concentração de cerca de 5 µg/ml são eficazes para cicatrização de ferimentos através de aplicação tópica em tecido epitelial tal como descrito em Sotozono *et al.*, *Invest. Opthal. Vis. Science* 36: 1524-29 (1995). Tal como descrito na Patente U.S. N.º 4861757, uma quantidade eficaz de IGF quando co-administrada com PDGF está

no intervalo de pelo menos $2,5 \text{ ng/mm}^2$ a cerca de 5 ng/mm^2 , com uma proporção de PDGF para IGF no intervalo de cerca de 1:10 a cerca de 25:1 peso para peso, sendo as proporções mais eficazes de PDGF para IGF de cerca de 1:1 a cerca de 1:2 peso para peso. Mostrou-se que IGFBP administrada em combinação com IGF aumenta a cicatrização de ferimentos a níveis de dose de cerca de $5 \text{ }\mu\text{g}$ de IGF com cerca de $1,5 \text{ }\mu\text{g}$ de IGFBP fosforilada numa razão molar de cerca de 11:1 IGF:IGFBP, tal como descrito em Jyung *et al.*, *Surgery* 115: 233-239 (1994).

Para administração de agentes terapêuticos polipeptídicos, por exemplo, um polipéptido PDGF, KGF, IGF e IGFBP, a dosagem pode estar no intervalo de cerca de $5 \text{ }\mu\text{g}$ a cerca de $50 \text{ }\mu\text{g/kg}$ de tecido ao qual se dirige a aplicação, também de cerca de $50 \text{ }\mu\text{g}$ a cerca de 5 mg/kg , também de cerca de $100 \text{ }\mu\text{g}$ a cerca de $500 \text{ }\mu\text{g/kg}$ de tecido e de cerca de 200 a cerca de $250 \text{ }\mu\text{g/Kg}$. Para agentes terapêuticos polinucleotídicos, por exemplo num protocolo de administração para terapia génica, dependendo da força de expressão do polinucleótido no doente, para administração direccionada a tecidos, vectores contendo construções expressáveis incluindo sequências de codificação de PDGF, KGF, IGF e IGFBP podem ser administrados num intervalo de cerca de 100 ng a cerca de 200 mg de ADN para administração local num protocolo de terapia génica, também de cerca de 500 ng a cerca de 50 mg , também de cerca de $1 \text{ }\mu\text{g}$ a cerca de 2 mg de ADN, de cerca de $5 \text{ }\mu\text{g}$ de ADN a cerca de $500 \text{ }\mu\text{g}$ de ADN e de cerca de $20 \text{ }\mu\text{g}$ a cerca de $100 \text{ }\mu\text{g}$ durante uma administração local num protocolo de terapia génica, e cerca de $250 \text{ }\mu\text{g}$, por injeção ou administração. Factores tais como o método de acção e eficácia de transformação e expressão são por isso considerações que afectarão a dosagem necessária para a eficácia final para administração de agentes terapêuticos de ADN. Onde for desejada maior expressão, ao longo de uma maior área de tecido, podem ser necessárias maiores quantidades de ADN ou as mesmas quantidades readministradas num protocolo sucessivo de administrações, ou várias administrações em porções de tecido diferentes adjacentes ou próximas, por exemplo, um local do ferimento, para produzir um resultado terapêutico positivo. Em

todos os casos, a experimentação de rotina em ensaios clínicos determinará intervalos específicos para um efeito terapêutico óptimo, para cada agente terapêutico, cada protocolo administrativo e a administração a doentes específicos será também ajustada dentro de intervalos eficazes e seguros dependendo da condição do doente e da capacidade de resposta a administrações iniciais.

Outros objectivos, características e vantagens do presente invento tornar-se-ão aparentes a partir da descrição detalhada. Deve entender-se, no entanto, que a descrição detalhada, embora indicando concretizações preferidas do presente invento, é dada apenas como ilustração, uma vez que várias alterações e modificações dentro do espírito e âmbito do presente invento se tornarão aparentes para os peritos na arte a partir desta descrição detalhada. Os seguintes exemplos são apenas exemplares e não se pretende que limitem o presente invento.

O presente invento será agora ilustrado através de referência aos seguintes exemplos que expõem concretizações particularmente vantajosas. No entanto, deve notar-se que estas concretizações são ilustrativas e não devem ser de modo algum entendidas como restritivas do presente invento.

Exemplo 1

Queimaduras de segundo grau são tratadas com uma formulação pulverizada incluindo 10 µg/ml de KGF, 30 ng/ml de uma isoforma de PDGF, 10 ng/ml de IGF-1 e 30 ng/ml de IGFBP-1. Deixa-se o pulverizado secar ao ar. É sugerida reaplicação de duas em duas horas.

Exemplo 2

Um ferimento de sutura é fechado e é aplicado na sutura um unguento tópico feito de KGF a 10% e PDGF a 5% antes de ligar. A reaplicação do unguento é dirigida 3 vezes ao dia.

Exemplo 3

É aplicada a pequenas escoriações, queimaduras solares e irritações uma formulação de óxido de zinco a 20 contendo também KGF a 5%, PDGF a 2,5% e IGFBP a 10% para cicatrização mais rápida destes ferimentos.

Exemplo 4

É utilizada uma formulação de lipossomas para encapsular ADN de KGF, PDGF, IGF e IGFBP cada um num vector para expressão. A proporção de ADN em peso é de 10:5:2,5:7,5, respectivamente. A composição de lipossomas é administrada numa cápsula de gel através da boca para tratamento de úlceras gastrointestinais com readministração diária durante um período de cerca de um mês ou até uma melhoria significativa ditar uma menor frequência de administração.

Lisboa, 2008-02-18

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um primeiro polipéptido possuindo a actividade biológica de um factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e um segundo polipéptido possuindo a actividade biológica de factor de crescimento de queratinócitos (KGF) e um terceiro polipéptido possuindo a actividade biológica de factor de crescimento semelhante a insulina (IGF), no fabrico de um medicamento para utilização na reparação ou prevenção de danos em células epiteliais.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido compreende um polipéptido PDGF de comprimento completo.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de um polipéptido PDGF de comprimento completo.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido compreende a cadeia A de PDGF ou a cadeia B de PDGF.

5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro polipéptido é produzido através da expressão de uma molécula de ADN que codifica PDGF numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

6. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o segundo polipéptido compreende um KGF de comprimento completo.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o segundo polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de um polipéptido KGF de comprimento completo.

8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o segundo polipéptido é produzido através da expressão de uma molécula de ADN que codifica KGF

numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o terceiro polipéptido compreende um IGF de comprimento completo.

10. Utilização de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o terceiro polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de IGF.

11. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o terceiro polipéptido é IGF-1 ou IGF-2.

12. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o terceiro polipéptido é produzido através da expressão de uma molécula de ADN que codifica IGF numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

13. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo também um quarto polipéptido possuindo a actividade biológica da proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina (IGFBP).

14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o quarto polipéptido compreende uma IGFBP de comprimento completo.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o quarto polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de uma IGFBP.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que a IGFBP compreende IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 ou IGFBP-6.

17. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o quarto polipéptido é produzido através de expressão de uma molécula de ADN que codifica uma IGFBP numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

18. Utilização de uma primeira molécula de ADN, uma segunda molécula de ADN e uma terceira molécula de ADN, em que a primeira molécula de ADN compreende uma primeira sequência nucleotídica codificando PDGF, a segunda molécula de ADN compreende uma segunda sequência nucleotídica codificando KGF e a terceira molécula de ADN compreende uma terceira sequência nucleotídica codificando IGF, no fabrico de um medicamento para utilização na reparação ou prevenção de danos em células epiteliais.

19. Utilização de acordo com a reivindicação 18, em que a primeira molécula de ADN codifica a cadeia A de PDGF ou a cadeia B de PDGF.

20. Utilização de acordo com as reivindicações 18 ou 19, em que a segunda molécula de ADN codifica um polipéptido KGF de comprimento completo.

21. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, compreendendo ainda uma quarta molécula de ADN compreendendo uma quarta sequência nucleotídica codificando IGFBP.

22. Utilização de acordo com a reivindicação 21, em que a quarta molécula de ADN codifica IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 ou IGFBP-6.

23. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, em que as moléculas de ADN estão presentes no mesmo plasmídeo ou em plasmídeos separados.

24. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, em que as moléculas de ADN estão encapsuladas em lipossomas.

25. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que as células epiteliais são células da pele, do forro gástrico ou do forro intestinal.

26. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o medicamento está na forma de um creme, uma espuma, uma solução injectável, uma vaporização, uma matriz de gel, uma esponja, gotas ou uma lavagem.

Lisboa, 2008-02-18

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um primeiro polipéptido possuindo a actividade biológica de um factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e um segundo polipéptido possuindo a actividade biológica de factor de crescimento de queratinócitos (KGF) e um terceiro polipéptido possuindo a actividade biológica de factor de crescimento semelhante a insulina (IGF), no fabrico de um medicamento para utilização na reparação ou prevenção de danos em células epiteliais.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido compreende um polipéptido PDGF de comprimento completo.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de um polipéptido PDGF de comprimento completo.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro polipéptido compreende a cadeia A de PDGF ou a cadeia B de PDGF.

5. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o primeiro polipéptido é produzido através da expressão de uma molécula de ADN que codifica PDGF numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

6. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o segundo polipéptido compreende um KGF de comprimento completo.

7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o segundo polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de um polipéptido KGF de comprimento completo.

8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o segundo polipéptido é produzido através da expressão de uma molécula de ADN que codifica KGF

numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

9. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o terceiro polipéptido compreende um IGF de comprimento completo.

10. Utilização de acordo com a qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o terceiro polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de IGF.

11. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que o terceiro polipéptido é IGF-1 ou IGF-2.

12. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o terceiro polipéptido é produzido através da expressão de uma molécula de ADN que codifica IGF numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

13. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo também um quarto polipéptido possuindo a actividade biológica da proteína de ligação ao factor de crescimento semelhante à insulina (IGFBP).

14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o quarto polipéptido compreende uma IGFBP de comprimento completo.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o quarto polipéptido compreende um fragmento biologicamente activo de uma IGFBP.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que a IGFBP compreende IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 ou IGFBP-6.

17. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o quarto polipéptido é produzido através de expressão de uma molécula de ADN que codifica uma IGFBP numa célula hospedeira, em que a célula hospedeira é uma célula bacteriana, uma célula de levedura, uma célula de mamífero ou uma célula de insecto.

18. Utilização de uma primeira molécula de ADN, uma segunda molécula de ADN e uma terceira molécula de ADN, em que a primeira molécula de ADN compreende uma primeira sequência nucleotídica codificando PDGF, a segunda molécula de ADN compreende uma segunda sequência nucleotídica codificando KGF e a terceira molécula de ADN compreende uma terceira sequência nucleotídica codificando IGF, no fabrico de um medicamento para utilização na reparação ou prevenção de danos em células epiteliais.

19. Utilização de acordo com a reivindicação 18, em que a primeira molécula de ADN codifica a cadeia A de PDGF ou a cadeia B de PDGF.

20. Utilização de acordo com as reivindicações 18 ou 19, em que a segunda molécula de ADN codifica um polipéptido KGF de comprimento completo.

21. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, compreendendo ainda uma quarta molécula de ADN compreendendo uma quarta sequência nucleotídica codificando IGFBP.

22. Utilização de acordo com a reivindicação 21, em que a quarta molécula de ADN codifica IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-5 ou IGFBP-6.

23. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, em que as moléculas de ADN estão presentes no mesmo plasmídeo ou em plasmídeos separados.

24. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, em que as moléculas de ADN estão encapsuladas em lipossomas.

25. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores em que as células epiteliais são células da pele, do forro gástrico ou do forro intestinal.

26. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o medicamento está na forma de um creme, uma espuma, uma solução injectável, uma vaporização, uma matriz de gel, uma esponja, gotas ou uma lavagem.

Lisboa, 2008-02-18