

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 728**

51 Int. Cl.:  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61P 13/10** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09155870 .0**  
96 Fecha de presentación: **18.08.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2161032**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2010**

54 Título: **CICATRIZACIÓN DE HERIDAS MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE IL-18 HUMANA.**

30 Prioridad:  
**20.08.2004 US 603012 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.01.2012**

73 Titular/es:  
**GLAXOSMITHKLINE LLC  
ONE FRANKLIN PLAZA 200 NORTH 16TH  
STREET  
PHILADELPHIA, PA 19102, US**

72 Inventor/es:  
**Dede, Kimberly A. y  
Lee, Judithann**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 372 728 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Cicatrización de heridas mediante la administración de IL-18 humana

La presente invención se refiere, en general, al uso de la IL-18 humana, también conocida como factor inductor de interferón- $\gamma$  (IGIF), en el tratamiento de heridas.

### 5 Antecedentes de la invención

El motivo de este interés es la facilidad relativa para dirigir terapéuticas de proteínas secretadas a su lugar de acción (fluidos corporales o la membrana celular). Las proteínas secretadas, y las regiones extracelulares de las proteínas transmembrana, pueden administrarse directamente en los fluidos corporales o pueden ser dirigidas a fluidos corporales o a membranas a través de una ruta natural. La ruta natural para la secreción de proteínas en el espacio extracelular es el retículo endoplásmico en eucariotas y la membrana interna en procariotas (Palade, Science, 189, 347 (1975); Milstein, y col., Nature New Biol., 239, 117 (1972); Blobel, y col., J. Cell. Biol., 67, 835 (1975)). Por otro lado, no se conoce una ruta natural para exportar una proteína desde el exterior de las células al citosol (con la excepción de la pinocitosis, un mecanismo de intrusión en las células de la toxina del veneno de serpiente) Por tanto, dirigir las terapéuticas con proteínas a las células plantea extremas dificultades en la técnica.

15 La IL-18 es una nueva citosina de reciente descubrimiento. La IL-18 humana activa contiene 157 residuos de aminoácidos. Tiene potentes actividades biológicas, incluida la inducción de producción de interferón- $\gamma$  por los linfocitos T y los esplenocitos, potenciación de la actividad de matar de las células NK y estimulación de la diferenciación de linfocitos T CD4+ no expuestos previamente en linfocitos Th1. Además, la IL-18 humana aumenta la producción de GM-CSF y disminuye la producción de IL-10. Se ha demostrado que la IL-18 tiene mayores capacidades de inducir interferón- $\gamma$  que la IL-12 y parece tener diferentes receptores y usar una vía de transducción de la señal distinta.

Los linfocitos T CD4+ son los elementos reguladores principales de todas las respuestas inmunitarias. Se dividen en dos subpoblaciones, Th1 y Th2. Cada subpoblación está definida por su capacidad para secretar diferentes citocinas. Es interesante el hecho de que los inductores más potentes de la diferenciación son las propias citocinas. El desarrollo de las células Th2 a partir de precursores indiferenciados está inducido por IL-4. Antes del descubrimiento de la IL-18, se pensaba que la IL-12 era la principal citosina inductora de Th1. La IL-18 también es una citocina inductora de Th1 y es más potente que la IL-12 en lo que respecta a la estimulación de la producción de interferón- $\gamma$ .

Las células Th1 secretan IL-12, interferón- $\gamma$  y TNF- $\beta$ . El interferón- $\gamma$ , la firma de la citosina de Th1, actúa directamente sobre los macrófagos y potencia sus actividades microbicidas y fagocíticas. Como resultado, los macrófagos pueden destruir de forma eficaz patógenos intracelulares y células tumorales. Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que actúan ayudando a los linfocitos B a desarrollarse en células productoras de anticuerpos. En conjunto, las células Th1 son las responsables principalmente de la inmunidad celular, mientras que las células Th2 son responsables de la inmunidad humoral.

35 La reparación de heridas es una interacción bien orquestada que implica a varios tipos de células, componentes de la matriz extracelular y múltiples mediadores solubles, incluidos factores de crecimiento y citocinas. Los traumatismos, microbios o sustancias químicas que ha producido lesiones tisulares pueden desencadenar la reparación de heridas. Aunque la restauración de la integridad del tejido es una respuesta inmunitaria innata del huésped, existen situaciones durante las cuales el proceso de reparación de heridas está alterado. Se han usado varios factores de crecimiento para intentar prevenir la mucositis en los pacientes de cáncer sometidos a radiación o a quimioterapia, con poco éxito. Peterson, Adv. Stud. Med., 4(4B): S299-S310, (2005). El factor estimulante de colonias de granulocitos (Neupogen) ha tenido un modesto efecto sobre la incidencia y la gravedad de la mucositis en de dos a cuatro estudios realizados con pacientes de cáncer sometidos a tratamiento. El factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (Sargramostim) indujo una pequeña disminución de la gravedad de la mucositis inducida por quimioterapia y radiación, aunque los resultados fueron inconsistentes. Tanto el factor estimulante de colonias de granulocitos como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos sólo han exhibido un efecto en la prevención de la mucositis oral. Se ha demostrado que el factor de crecimiento de queratinocitos (Palifermin) era el más prometedor en la prevención de la mucositis, ya que previene la incidencia y la duración de la mucositis oral. Con la aparición de agentes dirigidos a la fisiopatología de la mucositis, los médicos ya no van a necesitar alterar los regímenes de radiación o de quimioterapia, sino que tendrán que adaptar el protocolo de modo que incluya un agente que pueda prevenir la incidencia de la mucositis. Evidentemente, en la técnica existe la necesidad de desarrollar nuevas proteínas terapéuticas para potenciar la reparación de heridas, en particular para tratar: heridas en la piel, heridas quirúrgicas, úlceras en las extremidades inferiores, úlceras por diabetes, mucositis, particularmente la mucositis gastrointestinal y la mucositis oral, y lesiones pulmonares.

### 55 Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de cicatrización de una herida en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del

polipéptido IL-18 humano (SEC ID N° 1). En otro aspecto, la herida que se va a tratar se escoge del grupo de: heridas en la piel, heridas quirúrgicas, úlceras en las extremidades inferiores, úlceras por diabetes, mucositis en la vejiga urinaria y lesiones pulmonares.

- 5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de cicatrización de dichas heridas en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del polipéptido IL-18 humano (SEC ID N° 1) y un vehículo.

### **Breve descripción de las figuras**

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-18 humana nativa (SEC ID N° 1).

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-18 murina (SEC ID N° 2).

- 10 La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos del factor de crecimiento  $\beta$  derivado de las plaquetas (PDGF- $\beta$ ) (SEC ID N° 3). El PDGF- $\beta$  maduro de ratón se forma mediante la eliminación de un péptido señal (-20- -1) y los propéptidos del extremo N (1-61) y del extremo C (171-221) (subrayados).

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos del KGF humano (SEC ID N° 4).

- 15 La Figura 5 muestra el efecto de la administración tópica de la IL-18 murina (SEC ID N° 2) codificada en adenovirus sobre la reparación de heridas en ratones ob/ob. Cada punto de dato representa la media para cada grupo de tratamiento.

La Figura 6 muestra el efecto de la proteína IL-18 murina purificada (SEC ID N° 2) administrada a diario por vía sistémica mediante inyección intraperitoneal sobre la reparación de heridas en ratones ob/ob. Cada punto de dato representa la media para cada grupo de tratamiento.

- 20 La Figura 7 muestra el efecto de la administración tópica diaria de IL-18 humana (SEC ID N° 1) sobre la reparación de heridas en ratones ob/ob. Cada punto de dato representa la media para cada grupo de tratamiento.

### **Descripción de la invención**

- 25 Los polipéptidos de IL-18 humanos se divulgan en los documentos EP 0692536A2, EP 0712931A2, EP0767178A1, y WO 97/2441. La secuencia de aminoácidos de la IL-18 humana se indica en la SEC ID N° 1. Los polipéptidos de IL-18 humanos son polipéptidos inductores de interferón- $\gamma$ . Desempeñan un papel principal en la inducción de la inmunidad celular, incluida la inducción de la producción de interferón- $\gamma$  por los linfocitos T y los esplenocitos, potenciación de la actividad de matar de las células NK y estimulación de la diferenciación de linfocitos T CD4+ indiferenciados en linfocitos Th1.

- 30 La IL-18 se puede usar para reparar heridas en un paciente, incluidas, entre otras: heridas en la piel, heridas quirúrgicas, úlceras en las extremidades inferiores, úlceras por diabetes, úlceras por presión, mucositis en la vejiga urinaria y lesiones pulmonares. La reparación de heridas atañe a la regeneración de células dañadas por células del mismo tipo. El proceso de reparación de heridas implica la coordinación sistemática de los siguientes acontecimientos celulares: proliferación, migración, diferenciación y remodelado. Las citocinas, las quimiocinas, los factores de crecimiento y las moléculas de adhesión celular funcionan como mediadores celulares, que orquestan las células concretas implicadas en estas actividades. Kampfner, y col., Molec. Med. 6(12): 10160-1027 (2000). La interleucina 18 (IL-18), una citosina proinflamatoria, puede inducir el factor alfa de necrosis tumoral, la interleucina 1-beta y las quimiocinas CC y CXC, que desempeñan un papel durante la fase de inflamación del proceso de reparación de heridas. Puren, y col., J. Clin. Invest. 101: 711-721 (1998). Se han identificado varios tipos celulares diferentes que sintetizan la IL-18, incluidos queratinocitos y macrófagos activados, que desempeñan un papel en la reparación de heridas. Los cultivos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) estimuladas por Con A tratados con IL-18 humana han inducido la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Ushio, y col., J. Immunol. 156: 4274-4279 (1996). Adicionalmente, se ha demostrado que la IL-18 induce la producción de interferón gamma (IFN-gamma) por linfocitos T y células NK. Se ha mostrado que el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos estimula la cicatrización de heridas (Arnold, y col., J. Wound Care 54: 400-402 (1995)), y se ha usado en la clínica para tratar pacientes con úlceras venosas crónicas en las piernas. DaCosta, y col., Wound Rep. Reg. 7: 17-25 (1999). En un modelo de escisión murino de reparación de heridas, los inventores han demostrado que la IL-18 estimula la reparación de heridas. El mecanismo por el cual la IL-18 estimula la reparación de heridas puede deberse a la naturaleza proinflamatoria de la citosina o como agente inductor de factores de crecimiento con el factor inductor de colonias de granulocitos y monocitos.

- 55 Los polipéptidos de la presente invención se pueden recuperar y purificar de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos muy conocidos, que incluyen precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina y cromatografía de líquidos de alto rendimiento. Se pueden emplear técnicas muy conocidas para replegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante la síntesis intracelular, el aislamiento y/o la purificación. Los procedimientos para purificar y producir IL-18 humana activa se exponen en el documento WO 01/098455.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de IL-18 humanos (SEC ID N° 1) para usar en el tratamiento terapéutico de cicatrización de una herida. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto y pueden además comprender un vehículo diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo etc. Se puede usar agua como vehículo cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como vehículos líquidos se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, por ejemplo para soluciones inyectables. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, a menudo en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

La composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando es adecuado, la composición puede también incluir un agente de solubilización y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el punto de la inyección. En general, los ingredientes son suministrados por separado o mezclados en forma de dosificación unitaria como, por ejemplo, polvo liofilizado seco o concentrado sin agua, en un contenedor sellado herméticamente, tal como una ampolla o un sobre, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con un bote de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

De acuerdo con lo anterior, el polipéptido se puede usar en la fabricación de un medicamento. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular como soluciones o como polvos liofilizados para administración parenteral. Los polvos se pueden reconstituir mediante la adición de un diluyente adecuado u otro vehículo farmacéuticamente aceptable antes de usar. La formulación líquida puede ser una solución acuosa isotónica tamponada. Ejemplos de diluyentes adecuados son solución salina isotónica normal, dextrosa al 5 % estándar en agua o solución tamponada de acetato sódico o amónico. Dicha formulación es especialmente adecuada para administración parenteral, pero también se puede usar para administración oral o estar contenida en un inhalador o nebulizador de dosis medida para insuflar. Puede ser deseable añadir a dichas composiciones farmacéuticas excipientes, tales como polivinilpirrolidona, gelatina, hidroxicelulosa, goma arábiga, polietilenglicol, manitol, cloruro sódico o citrato sódico.

Como alternativa, el polipéptido puede estar encapsulado, en comprimidos o preparado en una emulsión o jarabe para administración oral. Se pueden añadir vehículos sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para potenciar o estabilizar la composición o para facilitar la preparación de la composición. Entre los vehículos sólidos se incluyen almidón, lactosa, sulfato cálcico dihidrato, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, goma arábiga, agar o gelatina. Entre los vehículos líquidos se incluyen jarabe, aceite de cacahuete, solución salina y agua. El vehículo puede incluir también un material de liberación prolongada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera. La cantidad del vehículo sólido varía, pero estará entre aproximadamente 20 mg a aproximadamente 1 g por unidad de dosificación. Las preparaciones farmacéuticas se preparan siguiendo las técnicas convencionales de la técnica farmacéutica, que implican molturación, mezclado, granulación y compresión, cuando sea necesario, para las formas en comprimido; o molturación, mezclado y carga para las formas de cápsula de gelatina dura. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Dicha formulación líquida se puede administrar directamente por boca (v.o.) o cargarse en una cápsula de gelatina blanda.

Los polipéptidos de IL-18 humana se pueden preparar como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del polipéptido como ingrediente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En las composiciones de la invención, se puede usar una suspensión o solución acuosa que contiene el polipéptido, tamponada a pH fisiológico, en una forma lista para inyección. Las composiciones para administración parenteral comprenderán, normalmente, una solución del polipéptido de la invención o un cóctel de la misma disuelta en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se pueden emplear varios vehículos acuosos, por ejemplo solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de material particulada. Estas soluciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales

bien conocidas (p. ej., filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de tamponamiento y de ajuste de pH, etc. La concentración del polipéptido de la invención en tal formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es decir desde menos de aproximadamente 0,5%, normalmente a o al menos a aproximadamente 1% hasta tanto como 15 o 20% en peso, y principalmente se seleccionará sobre la base de los volúmenes de líquido, viscosidades etc., de acuerdo con el modo concreto de administración seleccionado.

Por tanto, podría prepararse una composición farmacéutica de la invención para inyección intramuscular de modo que contenga 1 ml de agua tamponada estéril y entre aproximadamente 1 ng a aproximadamente 100 mg, por ejemplo de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg, de un polipéptido de la invención. De igual forma, podría prepararse una composición farmacéutica de la invención para infusión intravenosa de modo que contenga aproximadamente 250 ml de solución de Ringer estéril y de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 mg o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg de un polipéptido de la invención. Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral son bien conocidos, o serán evidentes, por los expertos en la técnica y se describen con más detalle en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE, 15 ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania.

Los polipéptidos de la invención, cuando se preparan en una preparación farmacéutica, pueden estar presentes en formas monodosis. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente la dosis terapéuticamente eficaz adecuada. Si es adecuado, tal dosis puede repetirse a intervalos de tiempo apropiados seleccionados según sea adecuado por un médico durante el periodo de respuesta.

Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno y se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo con modelos animales o *in vitro*.

Para los polipéptidos, la dosificación administrada a cada paciente suele ser de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis administrada a un paciente puede estar entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg de peso corporal del paciente o, como alternativa, de 1 mg/kg a 10 mg/kg del peso corporal del paciente. En general, los polipéptidos humanos tienen una semivida mayor en el cuerpo humano que los polipéptidos de otras especies, debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por tanto, a menudo es posible usar dosis menores de polipéptidos humanos y administrar con menor frecuencia. Además, la dosis y la frecuencia de administración de polipéptidos de la invención se pueden reducir potenciando la captación y la penetración en el tejido (p. ej., en el cerebro) de los polipéptidos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

En el presente documento se describe un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más contenedores cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociados opcionalmente con dicho(s) contenedor(es) puede adjuntarse una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, en la que se refleja la aprobación de la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para administración en seres humanos. Se puede proporcionar un kit con el número adecuado de contenedores necesarios para cumplir los requisitos de dosificación para el tratamiento de una indicación concreta.

El compuesto o composición activo se puede liberar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer Science 249: 1527-1533 (1990); Treat, y col., en LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase, en general, *ibid.*)

El compuesto o composición se puede liberar en un sistema de liberación controlada. Se puede usar una bomba (véase, Langer, *ant.*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed Eng. 14:201 (1987); Buchwald, y col., Surgery 88:507 (1980); Saudek, y col., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra realización se pueden usar materiales poliméricos (véase MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen y Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger, y col., J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); véase también Levy, y col., Science 228:190 (1985); During, y col., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard, y col., J. Neurosurg. 71:105 (1989)). Un sistema de liberación controlada se puede colocar cerca de la diana terapéutica, es decir el cerebro, de modo que sólo se requiera una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, *ant.*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se tratan en la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

Los polipéptidos de IL-18 humana (SE CID N° 1) se pueden administrar por cualquier vía interna adecuada y pueden repetirse según sea necesario, por ejemplo con tanta frecuencia como de una a tres veces al día durante de 1 día a aproximadamente tres semanas a una vez a la semana o una vez cada dos semanas. Como alternativa, el péptido se puede alterar para reducir la densidad de carga y, por tanto, permitir la biodisponibilidad oral. La dosis y la

duración del tratamiento se refieren a la duración relativa de las moléculas de la presente invención en la circulación humana y un experto en la técnica puede ajustarlos en función de la afección que se esté tratando y de la salud general del paciente. La invención proporciona el tratamiento terapéutico de cicatrización de una herida mediante la administración a un paciente humano de una cantidad eficaz de un compuesto o composición farmacéutica de la invención, que comprende polipéptido de IL-18 humana (SEC ID N° 1). En una realización de la invención, el compuesto está sustancialmente purificado (p. ej. sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). Se pueden emplear formulaciones y procedimientos de administración cuando el compuesto comprende un polipéptido como se ha descrito anteriormente, las formulaciones y vías de administración adecuadas adicionales se pueden seleccionar de entre las descritas en el presente documento más adelante.

Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar un compuesto de la invención, por ejemplo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu, y col., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector etc. Los procedimientos de introducción incluyen, entre otros, las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos o composiciones se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica u oral. Además, puede ser deseable introducir los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo fijado a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se pueden emplear mediante, por ejemplo, el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente formador de aerosoles.

Puede ser deseable administrar los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita el tratamiento. Esta administración se pueden conseguir mediante, por ejemplo y sin limitaciones, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo junto con un vendaje para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialísticas o fibras. Cuando se administra una proteína es aconsejable usar materiales que no absorban la proteína.

El modo de administración de un polipéptido de la invención puede ser cualquier vía adecuada que libere el agente en el huésped. Los polipéptidos de la invención son particularmente útiles para administración parenteral, es decir administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o intranasal, o para administración tópica, si se usan para reparar una herida en la piel. Para tratar la mucositis de la vejiga urinaria, los polipéptidos se pueden liberar en el paciente mediante administración parenteral.

## Glosario

Las definiciones siguientes se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos de uso frecuente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “vehículo” refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la terapéutica.

“Aislado” significa alterado “por la mano del hombre” a partir de su estado natural, es decir, si se produce en la naturaleza, se ha cambiado o eliminado de su ambiente natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido de origen natural en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de al menos uno de sus materiales celulares coexistentes o su estado natural está “aislado”, como se emplea el término en el presente documento. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo mediante transformación, manipulación genética o mediante cualquier otro procedimiento recombinante se “aisla” incluso si todavía está presente en dicho organismo, dicho organismo puede ser vivo o no vivo.

El término, “mucositis”, como se usa en el presente documento, significa la destrucción del revestimiento epitelial de un órgano, por ejemplo en el intestino, la vejiga urinaria, la boca, que es resultado de irradiación o quimioterapia.

Como se usa en el presente documento, el término “farmacéutico” incluye aplicaciones veterinarias. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de agente terapéutico que es útil para aliviar una afección determinada.

Como se usa en el presente documento, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. “Polipéptido” se refiere a cualquier polipéptido que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir isoésteres peptídicos. “Polipéptido” se refiere tanto a cadenas cortas, normalmente denominadas péptidos, oligopéptidos u oligómeros, como a cadenas más largas, en general denominadas proteínas.

Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos a los 20 aminoácidos codificados en los genes. Los “polipéptidos” incluyen secuencias de aminoácidos modificadas bien por procedimientos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Dichas modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una literatura de investigación voluminosa. Las modificaciones se pueden producir en cualquier punto en un polipéptido, incluida la estructura peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o varios grados en varios sitios en un polipéptido dado. Asimismo, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de ubiquitinación y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser el resultado de procesos naturales postraducionales o pueden fabricarse mediante procedimientos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP ribosilación, amidación, biotinilación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfotidilinositol, reticulación, ciclación, formación de puentes disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación (véase, por ejemplo, *PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, en *POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983; Seifter y col., *Meth Enzymol*, 182,626-646,1990; Rattan, y col., *Ann. NY Acad. Sci.*, 663: 48-62 (1992)).

La unión covalente de compuestos biológicamente activos a polímeros hidrosolubles es un procedimiento para la alteración y el control de la biodistribución, la farmacocinética y, a menudo, la toxicidad de estos compuestos (Duncan, R. y Kopecek, J. (1984) *Adv. Polym. Sci.* 57:53-101). Se han usado muchos polímeros hidrosolubles para conseguir estos efectos, tales como ácido polisialico, dextrano, poli(N-2-hidroxiopropil)metacrilamida (PHPMA), poli(N-vinilpirrolidona) (PVP), alcohol polivinílico (PVA), poli(etilenglicol-co-propilenglicol), poli(N-acrilil morfolina (PACM) y poli(etilenglicol) (PEG) (Powell, G. M. (1980) *Polietilenglicol*. en R.L. Davidson (Ed.) *HANDBOOK OF WATER SOLUBLE GUMS AND RESINS*. McGraw-Hill, New York, capítulo 18). PEG posee un grupo ideal de propiedades: toxicidad muy baja (Pang, S N. J. (1993) *J. Am. Coll. Toxicol.* 12: 429-456) solubilidad excelente en solución acuosa (Powell, ant.), bajas inmunogenicidad y antigenicidad (Dreborg, S. y Akerblom, E. B. (1990) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6: 315-365). Terapéuticas proteicas conjugadas con PEG o “PEGiladas”, que contienen una o varias cadenas de polietilenglicol sobre la proteína, se han descrito en la literatura científica (Clark, R., y col. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 21969-21977; Hershfield, M. S. (1997) *Biochemistry and immunology of poly(ethylene glycol)-modified adenosine deaminase (PEG-ADA)*. En J. M. Harris y S. Zalipsky (Eds) *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, p145-154; Olson, K., y col. (1997) *Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)ylated human growth hormone antagonist*. En J. M. Harris y S. Zalipsky (Eds) *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, p170-181).

Como se usa en el presente documento, la expresión “reparación de heridas”, quiere decir los procesos de reparación tisular implicados en la cicatrización de una herida, incluyendo, entre otros, el cierre de heridas.

### **Ejemplo 1: Modelo de reparación de heridas escisionales**

Ratones diabéticos, tales como la cepa ob/ob, muestran un retraso de la cicatrización de heridas. Stallmeyer, y col., *Diabetologia* 44:471-479 (2001). Los ratones ob/ob son una cepa natural de ratones que tienen una delección del gen ob/ob, que codifica la leptina. La leptina se une a un receptor de clase I de citocinas, obRb, y activa la cascada de señalización intracelular que reduce el apetito. Dado que los ratones ob/ob no pueden producir leptina, son obesos y tienen el doble del peso de un ratón C57/B16 normal. Los ratones obesos también tienen otros defectos metabólicos, incluidos termogénesis reducida, hiperfagia, disminución de la fertilidad e inhibición de la hormona de crecimiento. Ring, y col., *Endocrinol.* 141(1): 446-449 (2000). El pronunciado retraso de la cicatrización de heridas en ratones ob/ob se ha atribuido a su fenotipo similar al diabético.

Los modelos de alteración de la cicatrización de heridas dan la oportunidad de explorar el efecto de citocinas específicas, tal como la IL-18, y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), sobre la reparación de heridas. Se ha demostrado que la aplicación tópica de PDGF-β potencia la cicatrización de heridas en la cepa de ratón diabético db/db. Greenlaugh, y col., *Am. J. Pathol.* 136: 1235-1246 (1990). La cepa db/db es fenotípicamente similar a la cepa ob/ob, pero los ratones db/db carecen del receptor de leptina. Las heridas de los ratones db/db exhiben un marcado retraso de la infiltración celular, formación de tejido de granulación y retraso de la cicatrización de heridas. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-β) es tanto un mitógeno como un quimioatrayente de células de músculo liso y fibroblastos, y produjo una rápida reepitelización de las heridas en ratones db/db. Aunque la interleucina 18 (IL-18) no se había usado anteriormente como agente terapéutico en un modelo de cicatrización de heridas, en los estudios se ha demostrado el incremento de los niveles de la expresión, pero no producción de proteínas, de IL-18 en heridas de ratones ob/ob. Kampfer, y col., *J. Invest. Derm.* 113(3):369-74 (1999). Dado que la IL-18 es una citosina proinflamatoria (Kampfer, y col., *Eur.*

Cytokine Netw. 11: 626-33 (2000)), puede desempeñar un papel en la cicatrización de heridas a través de la estimulación del infiltrado celular en las heridas.

Para determinar el efecto de la liberación tópica de IL-18 o PDGF- $\beta$  sobre la reparación de heridas, se anestesió a ratones ob/ob hembra de diez a catorce semanas de edad usando un cóctel de ketamina (90 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg). Se demostró que la sobreexpresión de PDGF mediada por adenovirus corregía la cicatrización de heridas isquémicas en un modelo de oreja de conejo. Liechty, y col., J. Invest. Dermatol. 113:375-383 (1999). Liechty, y col. demostraron que los adenovirus con replicación deficiente liberaban el transgen de PDGF- $\beta$  directamente en las células del área herida. Se afeitó el lomo de cada ratón y se estableció un campo estéril usando alternativamente paños de alcohol y de betadine. Usando un punzón para biopsias estéril se crearon heridas de tipo escisional circulares, de espesor completo y de 6 mm de diámetro, lo que tuvo como resultado dos heridas por ratón. Para la liberación tópica, se aplicó directamente sobre el área herida adenovirus ( $1 \times 10^{10}$  partículas virales/herida) que codificaban una IL-18 murina (SEC ID N° 2), PDGF- $\beta$  murino (aminoácidos 1-61 y 171-221 de la SEC ID N° 3) o un control (adenovirus vacío-CMV, nulo). Asimismo se aplicó directamente sobre las heridas un control salino. Posteriormente se recubrieron las heridas con poloxámero (Pluronic F127 en 10 % de solución salina tamponada con fosfato (PBS)) y, después, se cubrieron con un vendaje transparente estéril. Para determinar el índice de cierre de las heridas se trazó una circunferencia de las heridas sobre la película transparente a intervalos de dos días. Al final del estudio, cuando todas las heridas habían cicatrizado, se escaneó ópticamente las películas transparentes y se determinó el área de superficie usando el software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE.UU.). Los resultados de este experimento aparecen más adelante en la Figura 5.

El adenovirus control, Ad.mPDGF- $\beta$  (aminoácidos 1-61 y 171-221 de SEC ID N° 3), se generó usando un abordaje de clonación directa (Sukmanm A. J., Kallarakal, A., Fornwald, J., Kozarsky, K. F., Appelbaum, E., Shatzman, A. R., y Lu, Q. 2002. Generation of recombinant adenovirus vectors by a direct cloning approach. En Gene Cloning and Expression Technologies, M. P. Weiner y Q. Lu (Eds.). p341-355. Eaton Publishing, Westborough, MA). En resumen, el ORF del PDGF- $\beta$  murino se amplificó con PCR y se clonó en los sitios XbaI/SwaI de pAC2XS, introduciendo el gen bajo el control del promotor IE de CMV. El ADN del clon molecular purificado del vector adenovirus se linealizó digiriéndolo con la enzima de restricción PaeI para exponer las ITR y se transfeccionó en células HEK293 para rescatar el adenovirus. El adenovirus se amplificó y purificó con bandas de CsCl tal como se ha descrito (Engelhardt, J. 1999. Methods for adenovirus-mediated gene transfer to airway epithelium. En Methods in Molecular Medicine, Gene Therapy Protocols, P. Robbins (Ed.). p.169-184. Humana Press, Totowa). El adenovirus concentrado se desaló usando una columna de Bio-gel (Bio-Rad) y se almacenó en 1 x PBS con 10 % de glicerol a -80 °C. La construcción Ad.m-IL-18 se generó usando los procedimientos descritos en Osaki, y col., Gene Therapy 6: 808-815 (1999).

Para la liberación tópica de las construcciones proteicas en un vector adenovirus, tanto Ad.m-PDGF- $\beta$  (aminoácidos 1-61 y 171-221 de la SEC ID N° 3) como Ad.m-IL-18 (SEC ID N° 2) potenciaron considerablemente el cierre de heridas en el modelo de reparación de heridas escisionales. Ad.m-PDGF- $\beta$  (aminoácidos 1-61 y 171-221 de la SEC ID N° 3), la proteína de control positivo y Ad.m-IL-18 (SEC ID N° 2) alcanzaron el 50 % de cierre con respecto al día cero el día 7,5 y 9,5, respectivamente, frente al vector control Ad.CMV.Null, que alcanzó 50 % de cierre con respecto al día cero el día 20 desde la formación de la herida. Adicionalmente, tanto Ad.m-IL-18 (SEC ID N° 2) como Ad.m-PDGF- $\beta$  (aminoácidos 1-61 y 171-221 de la SEC ID N1 3) aceleraron el cierre completo de las heridas para el día 20. En el momento de la finalización del estudio el día 22 después de la herida, ninguno de los grupos control con solución salina o con vector habían cicatrizado del todo. Habiendo demostrado el efecto positivo de Ad.IL-18 aplicado por vía tópica en el modelo de reparación de herida escisional, se sometió a ensayo la liberación sistémica de la proteína IL-18 murina (SEC ID N° 2).

Para determinar el efecto de la liberación sistémica de IL-18 murina (SEC ID N° 2), se anestesió a ratones ob/ob hembra de diez a catorce semanas de edad usando un cóctel de ketamina (90 mg/kg)/xilazina (10 mg/kg). Dos horas antes del procedimiento de la herida se administró a los ratones inyecciones intraperitoneales de la proteína IL-18 murina (SEC ID N° 2) a múltiples concentraciones (0,1  $\mu$ g/0,5 ml a 100  $\mu$ g/0,5 ml) o el vehículo (PBS sin calcio ni magnesio). Se afeitó el lomo de cada ratón y se estableció un campo estéril usando alternativamente paños de alcohol y de betadine. Usando un punzón para biopsias estéril se crearon heridas de tipo escisional circulares, de espesor completo y de 6 mm de diámetro, lo que tuvo como resultado dos heridas por ratón. Se aplicó directamente sobre las heridas solución salina y después se cubrieron con un vendaje transparente estéril. Para determinar el índice de cierre de las heridas se trazó una circunferencia de las heridas sobre la película transparente a intervalos de dos días. Al final del estudio, cuando todas las heridas habían cicatrizado, se escaneó ópticamente las películas transparentes y se determinó el área de superficie usando el software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EE.UU.). A lo largo de los estudios sistémicos se monitorizó a los ratones para detectar pérdida o ganancia de peso. Los resultados de este experimento aparecen más adelante en la Figura 6.

Para la liberación sistémica de la proteína purificada, la IL-18 murina (SEC ID N° 2) potenció el índice de cierre de heridas de un modo dependiente de la dosis, en un intervalo de dosis de 0,1  $\mu$ g a 100  $\mu$ g/ratón/día. Las dosis más eficaces fueron 50 y 100  $\mu$ g/ratón/día, que alcanzó un 50 % del cierre con respecto al día cero los días 8 y 9, respectivamente, frente al control vehículo, que alcanzó el 50 % del cierre con respecto al día cero el día 16. El índice de cierre completo aumentó para los tratamientos con mL-18 (SEC ID N° 2) con respecto al PBS control.

Administrada por vía tanto tópica como sistémica, la IL-18 murina (SEC ID N° 2) potenció el cierre de la herida en el modelo escisional ob/ob de reparación de heridas. Se usó PDGF como control positivo en los estudios de reparación de heridas murinas de los inventores. La U.S. Food and Drug Administration aprobó el factor de crecimiento derivado de plaquetas humano recombinante para el tratamiento de las úlceras del pie diabético. Wieman, y col. Am. J. Surg. 176:745-795 (1998). Muchos malestares físicos están causados por lesiones tisulares, que alteran la organización natural del tejido, lo que tiene como resultado una herida. Las indicaciones reivindicadas en esta patente son, todas ellas, ejemplos de agresiones tisulares que podrían repararse mediante tratamiento con IL-18 humana (SE CID N° 1).

### **Ejemplo 2: Aplicación tópica diaria de IL-18 humana a una herida escisional**

Dado que la IL-18 murina (SEC ID N° 2) fue eficaz en el modelo de reparación de heridas escisionales murinas cuando se administró por vía tópica como construcción de adenovirus, se realizó un estudio usando proteína IL-18 humana purificada (SEC ID N° 1) aplicada directamente sobre la herida del Ejemplo 1, que figura con anterioridad. La proteína IL-18 humana (SEC ID N° 1) se aplicó como 10 µg/30 µl/herida. Como diluyente control se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los resultados aparecen en la Figura 7 que figura más adelante, que muestran que la IL-18 humana (SEC ID N° 1) aceleraba la reparación de heridas con respecto al PBS control. En la clínica, se ha usado PDGF humano por vía tópica para tratar las úlceras de pie diabético. Wieman y col. Am. J. Surg. 176:745-795 (1998).

### **Ejemplo 3: Modelo de mucositis intestinal** (este ejemplo es sólo para referencia y no forma parte de la invención reivindicada)

Las terapias del cáncer, tal como quimioterapia o radiación, a menudo tienen como resultado daños citotóxicos en el tracto gastrointestinal mediante destrucción de las criptas. Esta pérdida de criptas hace que se desarrollen úlceras a lo largo de las áreas desnudas del epitelio, lo que produce mucositis gastrointestinal. Una afección estrechamente relacionada, la mucositis oral, se produce cuando el revestimiento epitelial de la boca es dañado por agentes citotóxicos, lo que hace que se desarrollen úlceras. Si en el modelo de mucositis intestinal está activa una proteína, tal como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) humanos (SEC ID N° 4), puede actuar como factor mitogénico, mediante estimulación de la proliferación y diferenciación del epitelio. Potten, y col., Cell Growth Differ. 12: 265-75 (2001). Como alternativa, el KGF humano (SEC ID N° 4) podría actuar como inhibidor del ciclo celular que induce la parada de las células madre antes de la agresión citotóxica, de modo que protege las células madre, que, a su vez, prolongan la supervivencia de las criptas. Farrell, y col., Cancer Res. 58: 933-39 (1998). De forma similar, en la mucositis oral, las terapias que reducen la sensibilidad de las células madre a la agresión citotóxica y/o mejoran la respuesta regeneradora tras la exposición tendrán un impacto clínico al reducir los efectos secundarios de los actuales protocolos de tratamiento del cáncer. Sonis, y col., J. Am. Dent. Assoc. 97: 468-472 (1978).

Para abordar el papel de la IL-18 en la mucositis se empleó un protocolo de ensayo: en ensayo de supervivencia de criptas.

#### **A. Ensayos de supervivencia de criptas- Modelo de mucositis intestinal**

El protocolo que se describe más adelante se adaptó de EpiStem, Ltd., Incubator Building, Grafton Street, Manchester, M13 9XX, Reino Unido.

Se usaron 30 ratones BDF1 macho adultos (10-12 semanas de edad). Todos se introdujeron en jaulas durante 2 semanas para estabilizar el ritmo circadiano (Potten, y col., 1977, Cell Tissue Kinet., 10, 557). Los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas individualmente (JVI) en una unidad de barrera SPF en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad. Se ofreció a los animales alimento y agua a voluntad durante todo el ensayo. Todos los procedimientos se certificaron de acuerdo con la Ley del Reino Unido (Procedimientos con animales) de 1986. Se aleatorizó a los animales 6 por grupo, entre los siguientes 6 grupos: (1) solución salina inyectada ip, antes y después de la irradiación; (2) fármaco inyectado ip antes y solución salina inyectada después de la irradiación; (3) solución salina inyectada ip antes y fármaco inyectado después de la radiación; (4) fármaco inyectado antes y después de la irradiación; (5) controles sin tratar y (6) KGF humano (SEC ID N° 4) inyectado ip antes y solución salina inyectada después de la irradiación (control positivo).

Se indujeron daños intestinales usando una única dosis de irradiación de rayos X de 13 Gy, exposición de todo el cuerpo. 13 Gy era la mejor dosis en medio del intervalo con la que comenzar, ya que podría haber captado algún potencial efecto protector de un compuesto de prueba (Withers, y col., 1969, Rad Res., 38, 598). Todos los animales se pesaron una vez al día desde el inicio del tratamiento al momento del sacrificio. Se sacrificó a los animales 4 días después de la irradiación. Se extrajo el intestino delgado y se fijó en agente de fijación de Carnoy. Todo el tejido se procesó para determinar la histología (incluida en parafina). Usando el material de fijación de Carnoy, se determinó el número de criptas internas supervivientes en cada grupo de tratamiento y se corrigió por tamaño usando un control sin tratar, según "ClonoQuant™". Para cada ratón, se puntuaron 10 secciones transversales del intestino y se midió el número medio de criptas por sección transversal (Farrell, y col., 1998, Cancer Res., 58, 933). También se midieron las anchuras de las criptas para corregir los errores de puntuación debido al tamaño. Después de la corrección por tamaño se puntuó el número medio de criptas por sección transversal por grupo. El protocolo de

inyección que se usó aparece a continuación en la Tabla 1. La proteína se adquirió en PeproTech, número de catálogo 100-19.

**Tabla 1**

Gp	-3	-2	-1	0	0	+1	+2	+3	+4
1	S	S	S	S	I	S	S	S	C
2	F	F	F	F	I	S	S	S	C
3	S	S	S	S	I	F	F	F	C
4	F	F	F	F	I	F	F	F	C
5									C
6	KGF	KGF	KGF	KGF	I	S	S	S	S

S= inyección salina intraperitoneal  
 F= inyección de fármaco intraperitoneal  
 KGF= inyección intraperitoneal del control positivo  
 I= irradiación con 13Gy  
 C= Sacrificio  
 Gp= Grupo

5 Para este protocolo, todas las inyecciones se administraron a las 9:00. La irradiación se llevó a cabo a las 15:00.

El efecto de la IL-81 murina (SEC IDN N° 2) sobre a supervivencia de las criptas intestinales tras la irradiación se determinó en el estudio 04/135C, que se realizó bajo contrato mediante el sistema CLONOQUANT® de EpiStem Ltd. EpiStem y se identificó y cuantificó las criptas en regeneración en las secciones transversales del intestino delgado. Tras la agresión citotóxica, las criptas en regeneración proliferaron rápidamente y se distinguieron fácilmente de las criptas moribundas. El KGF humano (SEC ID N° 4) se administró a dosis de 6,25 mg/kg/día y se usó como control positivo en el estudio. La IL-18 murina (SEC ID N° 2) se administró a una dosis de 5 mg/kg/día. Los datos del número de criptas supervivientes por circunferencia de la cripta se indican más adelante en la Figura 6.

La Tabla 2 más adelante resume los datos del modelo de mucositis inducida por radiación. El control positivo para el estudio de mucositis inducida por radiación, KGF humano (SEC ID N° 4), demostró una actividad buena cuando se administró la dosis tres días antes de la irradiación. El grupo de KGF humano (SEC ID N° 4) mostró una multiplicación por cuatro del número de criptas supervivientes respecto al grupo control de solución salina. La il-18 murina (SEC ID N° 2) tenía una actividad comparable a la del KGF humano (SEC ID N° 4) cuando las dosis se administraron tres días antes de la irradiación y se demostró una multiplicación por tres de la supervivencia de criptas. Cuando la IL-18 (SEC ID N° 2) murina se administró antes y después de la irradiación, el número de criptas supervivientes respecto al grupo control de solución salina se multiplicó por dos. La menos eficaz fue la dosis de IL-18 murina (SEC ID N° 2) solamente tras la irradiación, lo que tuvo como resultado un incremento de 1,6 solo de las criptas supervivientes. Por tanto, la administración de las dosis de IL-18 murina (SEC ID N° 2) tres días antes de la irradiación fue el régimen más eficaz.

Aunque la quimioterapia y la radioterapia pueden ser tratamientos con éxito para matar células cancerosas, a menudo también se destruye tejido sano. Cuando el revestimiento epitelial del tracto gastrointestinal está comprometido se pueden producir ulceración y destrucción de criptas, lo que deja al paciente con dolor, incapaz de comer y susceptible a infecciones. Adicionalmente, el desarrollo de mucositis puede conducir a falta de cumplimiento del paciente para terminar el régimen completo de radioterapia o quimioterapia. En modelos murinos, el KGF redujo las lesiones inducidas por radiación y quimioterapia en el epitelio oral y del tracto gastrointestinal. Se ha demostrado que el KGF recombinante [humano] reduce la mucositis oral en pacientes con cáncer colorrectal metastático en tratamiento con fluorouracilo más leucovorina. Meropol y col. J. Clin Oncol. 21:1452-1458 (2003). En el modelo de mucositis inducida por radiación, se ha demostrado eficacia de la IL-18 murina (SEC ID N° 2) tiene en la protección de las criptas intestinales y podría usarse como tratamiento paliativo en seres humanos. Dado que se ha demostrado un efecto positivo de la IL-18 en el tratamiento de la mucositis inducida por radiación, también puede cicatrizar el epitelio dañado evidente en la mucositis oral.

Tabla 2

DATOS BRUTOS: NÚMERO DE CRIPTAS SUPERVIVIENTES POR CIRCUNFERENCIA DE LA CRIPTA							
Tratamiento	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	Ratón 5	Ratón 6	Media
Solución salina pre-rad y pos-rad	1,4	4,9	8	3,9	3,1	5	4,4
KGF pre-rad	17,2	12,4	10,3	20,3	24,2	23,1	17,9
IL-18 pre-rad	21	11	10	6,1	9,6	21	13
IL-18 pos-rad	8	5,6	9,8	3,5	47	10,6	7
IL-18 pre y pos-rad	10,5	11,4	10,5	8	8,6	5,2	9
Controles sin tratar, no radiados	105,1	100,3	107,6	102,4	105,5	105,5	104,4
rad.= radiados							

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DEDE, Kimberly  
LEE, Judithann

<120> PROCEDIMIENTOS DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS ADMINISTRANDO IL-18 HUMANA

5 <130> PU60998

<140> Adjunto  
<141> 2005-08-05

10 <150> 60/603,012  
<151> 2004-08-20

<160> 4

15 <170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

<210> 1  
<211> 157  
<212> PRT  
20 <213> Homo sapien

<400> 1

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1           5           10           15
Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
      20           25           30
Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
      35           40           45
Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
      50           55           60
Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
      65           70           75           80
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
      85           90           95
Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
      100          105          110
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
      115          120          125
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
      130          135          140
Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
      145          150          155
    
```

<210> 2  
<211> 157  
25 <212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 2

ES 2 372 728 T3

```

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1          5          10          15
Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
          20          25          30
Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
          35          40          45

Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50          55          60
Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65          70          75          80
Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
          85          90          95
Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
          100          105          110
Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
          115          120          125
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
          130          135          140
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser
145          150          155

```

<210> 3  
 <211> 241  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapien

<220>  
 <221> SIGNAL  
 10 <222> (-241)...(20)

<400> 3

ES 2 372 728 T3

```

Met Asn Arg Cys Trp Ala Leu Phe Leu Pro Leu Cys Cys Tyr Leu Arg
-20          -15          -10          -5
Leu Val Ser Ala Glu Gly Asp Pro Ile Pro Glu Glu Leu Tyr Glu Met
          1          5          10
Leu Ser Asp His Ser Ile Arg Ser Phe Asp Asp Leu Gln Arg Leu Leu
          15          20          25
His Arg Asp Ser Val Asp Glu Asp Gly Ala Glu Leu Asp Leu Asn Met
          30          35          40
Thr Arg Ala His Ser Gly Val Glu Leu Glu Ser Ser Ser Arg Gly Arg
45          50          55          60
Arg Ser Leu Gly Ser Leu Ala Ala Ala Glu Pro Ala Val Ile Ala Glu
          65          70          75
Cys Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Gln Ile Ser Arg Asn Leu Ile Asp
          80          85          90
Arg Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln
          95          100          105
Arg Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Ala Ser
          110          115          120
Gln Val Gln Met Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg
125          130          135          140
Lys Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu
          145          150          155
Ala Cys Lys Cys Glu Thr Ile Val Thr Pro Arg Pro Val Thr Arg Ser
          160          165          170
Pro Gly Thr Ser Arg Glu Gln Arg Ala Lys Thr Pro Gln Ala Arg Val
          175          180          185
Thr Ile Arg Thr Val Arg Ile Arg Arg Pro Pro Lys Gly Lys His Arg
190          195          200
Lys Phe Lys His Thr His Asp Lys Ala Ala Leu Lys Glu Thr Leu Gly
205          210          215          220
Ala

```

<210> 4

<211> 164

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 372 728 T3

Met	Cys	Asn	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Gln	Met	Ala	Thr	Asn	Val	Asn	Cys
1				5					10					15	
Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	His	Thr	Arg	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Met	Glu	Gly	Gly
			20					25					30		
Asp	Ile	Arg	Val	Arg	Arg	Leu	Phe	Cys	Arg	Thr	Gln	Trp	Tyr	Leu	Arg
		35					40					45			
Ile	Asp	Lys	Arg	Gly	Lys	Val	Lys	Gly	Thr	Gln	Glu	Met	Lys	Asn	Asn
	50					55					60				
Tyr	Asn	Ile	Met	Glu	Ile	Arg	Thr	Val	Ala	Val	Gly	Ile	Val	Ala	Ile
65					70					75					80
Lys	Gly	Val	Glu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Glu	Gly	Lys
				85					90					95	
Leu	Tyr	Ala	Lys	Lys	Glu	Cys	Asn	Glu	Asp	Cys	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu
			100					105					110		
Ile	Leu	Glu	Asn	His	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Ala	Ser	Ala	Lys	Trp	Thr	His
		115					120					125			
Asn	Gly	Gly	Glu	Met	Phe	Val	Ala	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Ile	Pro	Val
	130					135					140				
Arg	Gly	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Glu	Gln	Lys	Thr	Ala	His	Phe	Leu	Pro
145					150					155					160
Met	Ala	Ile	Thr												

**REIVINDICACIONES**

1. Uso del polipéptido de IL-18 humano (SEC ID N° 1) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico de cicatrización de una herida.
- 5 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la herida se escoge del grupo de: heridas en la piel, heridas quirúrgicas, úlceras en las extremidades inferiores, úlceras por diabetes, mucositis en la vejiga urinaria y lesiones pulmonares.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la herida es una úlcera de diabético o una herida en la piel.
4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, en la que la IL-18 humana (SEC ID N° 1) se administra por vía parenteral.
- 10 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la administración parenteral se escoge del grupo de: administración subcutánea, intramuscular, intravenosa e intranasal.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la herida es una herida en la piel y, además, en la que el polipéptido de IL-18 humano (SEC ID N° 1) se administra al paciente por vía tópica.
- 15 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido de IL-18 humana (SEC ID N° 1) está en combinación con un vehículo.
8. El polipéptido de IL-18 humano (SEC ID N° 1) para su uso en el tratamiento terapéutico de cicatrización de una herida.

**Figura 1**

**IL-18 humana (SEC ID N° 1)**

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDCRD NAPRT IFIIS 50  
MYKDS QPRGM AVTIS VKCEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100  
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM 150  
FTVQN ED 157

**Figura 2**

**IL-18 murina (SEC ID N° 2)**

NFGRL HCTTA VIRNI NDQVL FVDKR QPVFE DMTDI DQSAS EPQTR LIIYM 50  
YKDSE VRGLA VTLSV KDSKM STLSC KNKII SFEEM DPPEN IDDIQ SDLIF 100  
FQKRV PGHMK MEFES SLYEG HFLAC QKEDD AFKLI LKKKD ENGDK SVMFT 150  
LTNLH QS 157

**Figura 3**

**PDGF- $\beta$  murino (AMINOÁCIDOS 1-61 Y 171-221 DE LA SEC ID N° 3)**

**-20 MNRCWALFLP LCCYLRLVSA**

**1 EGDPIPEELY EMLSDHSIRS FDDLORLLHR DSVDEDGAEL DLNMTRAHSG**

**51 VELESSSRGR RSLGSLAAAE PAVIAECKTR TEVFQISRNL IDRTNANFLV**

**101 WPPCVEVQRC SGCCNNRNVQ CRASQVQMRP VQVRKIEIVR KKPIFKKATV**

**151 TLEDHLACKC ETIVTPREVT RSPGTSREOR AKTPOARVTI RTVRIRRPK**

**201 GKHRKFKHTH DKAALKETLG A**

**Figura 4**

**KGF humano (SEC ID N° 4)**

1      MCNDMTPEQM ATNVNCSSPE RHTRSYDYME GDIRVRRLF CRTQWYLRID  
51      KRGKVKGTQE MKNNYNIMEI RTVAVGIVAI KGVSEFYLA MNKEGKLYAK  
101     KECNEDCNFK ELILENHYNT YASAKWTHNG GEMFVALNOK GIPVRGKGTK  
151     KEQKTAHFLP MAIT

Figura 5

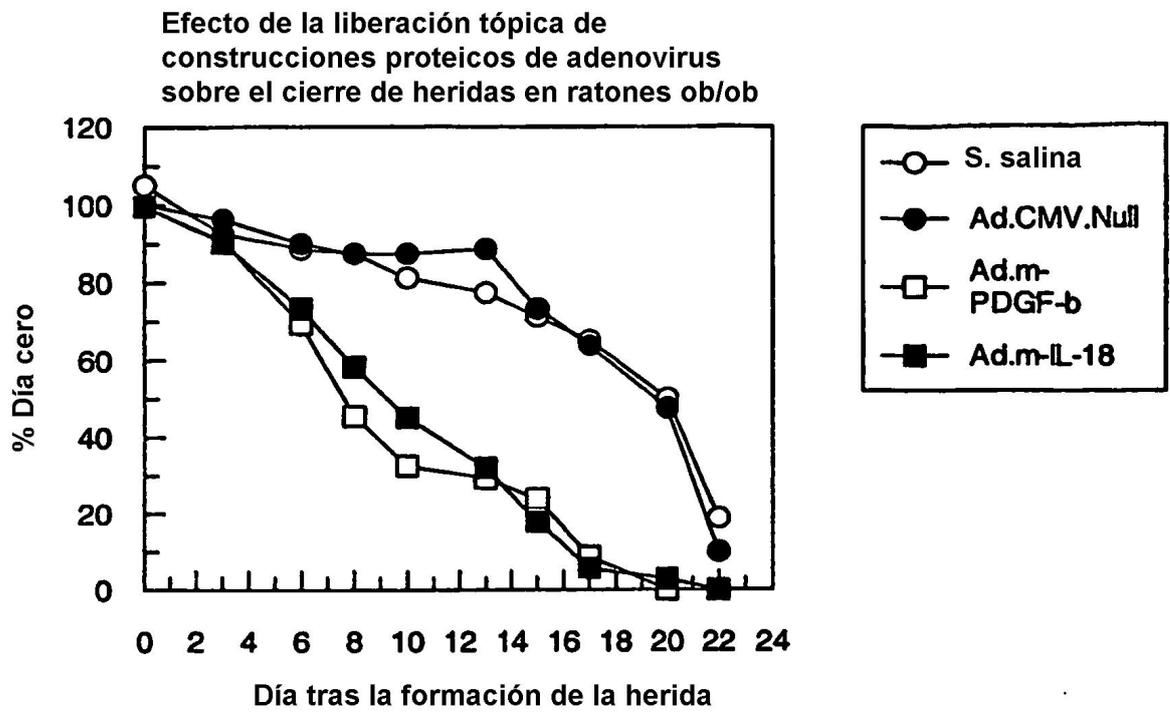


Figura 6

Efecto de la proteína IL-18 murina liberada por vía sistémica sobre el cierre de heridas en ratones ob/ob

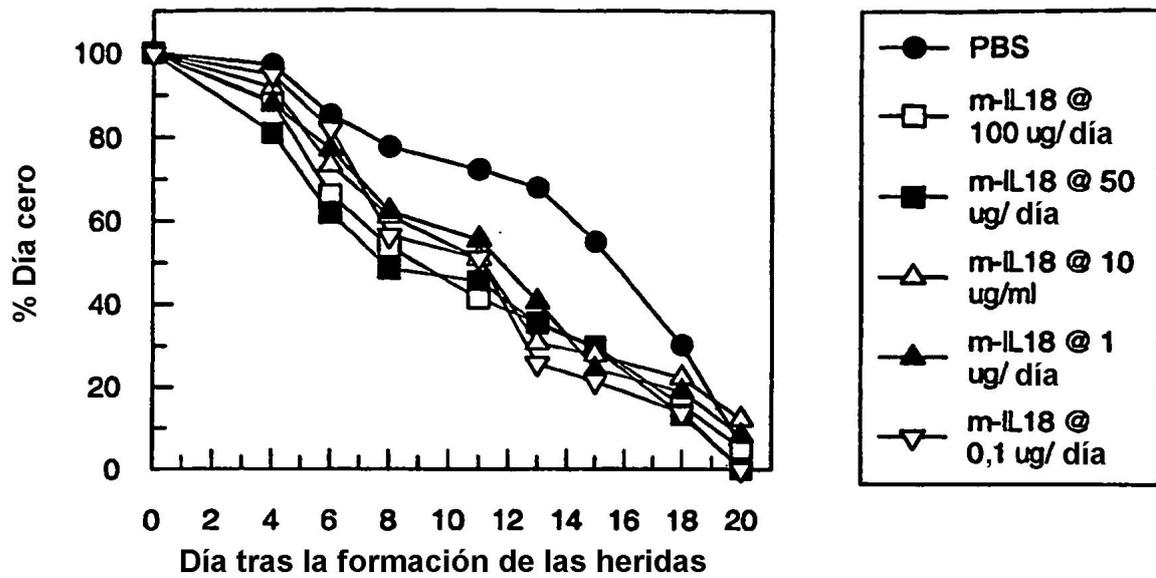


Figura 7

Efecto de la liberación tópica diaria de la proteína IL-18 murina sobre la reparación de heridas en ratones ob/ob

