

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 229**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61K 47/36** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2006 E 06808894 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1940448**

54 Título: **Complejo de polímero anfifilo - dX<sub>i</sub> Z**

30 Prioridad:

**26.09.2005 FR 0509803**

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

**06.06.2013**

73 Titular/es:

**ADOCIA (100.0%)  
115, AVENUE LACASSAGNE  
69003 LYON, FR**

72 Inventor/es:

**DUBREUCQ, GUY;  
DAHRI-CORREIA, LATIFA;  
CORREIA, JOSÉ;  
DURACHER, DAVID;  
SOULA, RÉMI;  
SOULA, OLIVIER y  
SOULA, GÉRARD**

74 Agente/Representante:

**ESPIELL VOLART, Eduardo María**

**ES 2 406 229 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

Complejo de polímero anfifilo - pdgf

La presente invención concierne a nuevos complejos del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) asociados a los polímeros anfifilos que permiten mejorar la estabilidad física y química *in vitro* e *in vivo* de la proteína terapéutica para aplicaciones farmacéuticas.

Los PDGF son glucoproteínas de aproximadamente 30.000 Daltons, formadas por dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por dos puentes de disulfuro. Se han identificado cuatro tipos de cadenas, A, B, C y D. La proteína natural existe en forma de homodímero o de heterodímero de tipo AB (Oefner C. EMBO J. 11, 3921 - 2926, 1992).

El PDGF se aisló por primera vez en las plaquetas. Estos son unos factores de crecimiento liberados durante la coagulación sanguínea, capaces de promover el crecimiento de diferentes tipos de células (Ross R. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 1207; Kohler N. & Lipton A., Exp. Cell Res. 1974, 87, 297). Ahora se sabe que el PDGF es producido por un cierto número de células distintas a las plaquetas y que es un mitógeno para la mayoría de las células derivadas del mesénquima, es decir, las células sanguíneas, musculares, óseas y cartilaginosas, así como las células del tejido conjuntivo (Raines E. W., en "Biology of Platelet-Derived Growth Factor", 1993, Westermarck, B. y C. Sorg, Ed. Basel, Kerger, pág. 74). Numerosos artículos tienden igualmente a demostrar que el PDGF procedente de los macrófagos se comporta como un agente quimiotáctico y mitógeno para las células musculares lisas, que contribuye al reguésamiento miointimo de las paredes arteriales característico de la arteriosclerosis (Ross R. y col., Science, 1990, 248, 1009). Las actividades del PDGF incluyen además, y particularmente, la estimulación de la liberación de los gránulos por los monocitos neutrófilos (Tzeng D. Y. y col., Blood, 1985, 66, 179), la facilitación de la síntesis de esteroides por las células de Leydig (Risbridger G. P., Mol. Cell, Endocrinol., 1993, 97, 125), la estimulación de la fagocitosis neutrófila (Wilson E. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 2213), la modulación de la expresión y de la secreción de la trombospondina (Majak R. A. y col., J. Biol. Chem., 1987, 262, 8821) y la post-regulación del gen ICAM-1 en las células musculares lisas vasculares (Morisaki N. y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 200, 612).

Teniendo en cuenta estas diversas propiedades, ya se ha contemplado la utilización de PDGFs recombinantes en el ámbito farmacéutico. Particularmente, la utilización del PDGF ha sido aprobada para el tratamiento de las úlceras del pie diabético (Regranex, J & J) y para la reparación periodontal (GEM 21S, Blomimetic).

La cicatrización de las úlceras, así como la cicatrización cutánea general, es un fenómeno complejo el cual necesita la intervención coordinada en el tiempo y en el espacio de numerosos tipos celulares, que puede resumirse en tres fases: una fase de inflamación, una fase de proliferación y una fase de remodelado.

En la fase inflamatoria, de aproximadamente 7 días para una cicatrización normal, los macrófagos destruyen las bacterias, desbridan los tejidos dañados y regeneran los tejidos. Para hacer esto, los macrófagos segregan collagenasas, citocinas y factores de crecimiento.

En el transcurso de la fase de proliferación, desde el tercer día hasta la tercera semana para una cicatrización normal, se suceden tres acontecimientos. La herida se llena de tejido de granulación, se desarrolla la angiogénesis y la herida se cubre con células epiteliales. El tejido de granulación crece desde el borde hacia el centro. Los fibroblastos producen abundantemente colágeno de tipo III.

En el transcurso del remodelado, desde la tercera semana hasta uno o incluso dos años, los tejidos de granulación maduran, los fibroblastos producen menos colágeno. Los vasos sanguíneos formados en el transcurso de la granulación que son inútiles son eliminados mediante apoptosis. El colágeno de tipo III es sustituido por colágeno de tipo I que se organiza según las líneas de tensión y se reticula.

En este proceso, el PDGF juega un papel primordial. Durante la formación de una herida, las plaquetas se agregan y liberan el PDGF. El PDGF atrae a los neutrófilos, los macrófagos y los fibroblastos a la herida y es un potente mitógeno. Los macrófagos, las células endoteliales sintetizan y segregan a su alrededor PDGF. El PDGF estimula la producción de la nueva matriz extracelular por los fibroblastos, esencialmente los compuestos no colagénicos tales como los grupos glucosaminoglucanos y las proteínas de adhesión (J. F. Norton y col., Essential practice of surgery, Springer, 2003, capítulo 7, 77 - 89).

Las heridas crónicas, tales como las úlceras del pie diabético, las úlceras venosas y las úlceras de presión, presentan la particularidad de cicatrizar muy lentamente y a menudo de forma incompleta, ya que el proceso de cicatrización no se desarrolla normalmente (R. Lobmann y col., J. of Diabetes and its complications, 2006, 20, 329 - 335).

El proceso de cicatrización es, de hecho, un delicado equilibrio entre un proceso de destrucción necesario con el fin de eliminar los tejidos lesionados, y el proceso de reparación que conduce a la formación de nuevos tejidos. Las proteasas y los factores de crecimiento juegan un papel crucial en este proceso regulando este equilibrio. En el caso de las heridas crónicas, este equilibrio se rompe en favor de la degradación, lo que explica el retraso en la cicatrización. Dado que existen diferentes tipos de heridas crónicas, bioquímicamente son relativamente similares en el sentido de que se caracterizan por fases prolongadas de inflamación que conducen a unos niveles elevados de proteasas y

disminuyen así la actividad de los factores de crecimiento (G. Lauer y col., J. Invest. Dermatol. 115 (2000) 12 - 18). Esta degradación de los factores de crecimiento contribuye a una pérdida global de los tejidos asociados a estas heridas crónicas, no favoreciendo la cicatrización (D. R. Yager y col., J. Invest. Dermatol. 107 (1996) 743 - 748).

5 Actualmente existe en el mercado un medicamento basado en PDGF-BB recombinante humano correspondiente a la denominación común internacional "becaplermin", vendido bajo la denominación comercial Regranex®. Este medicamento está indicado para el tratamiento de las úlceras de los miembros inferiores de diabéticos. Se presenta en forma de un gel de aplicación tópica y permite promover la cicatrización de las úlceras. Permite, en particular, al igual que el PDGF endógeno, favorecer la proliferación celular, y por tanto, la formación de nuevos tejidos.

10 Este tratamiento tiene una eficacia limitada (Cullen y col., The international journal of biochemistry & Cell Biology 34, 1544 - 1556, 2002), incluso si los estudios clínicos han demostrado mejoras en la cicatrización y en la duración necesaria para la cicatrización (Greenhalgh y col., American Journal of pathology, 136, 1235 - 1246 1990; Ladin Plastic and Reconstructive Surgery, 105, 1230 - 1231 2000; Holloway y col., Wounds, 5/4, 198 - 206; Mandracchia y col., Clinics in Podiatric Medecine and Surgery, 18, 189 - 209, 2001; Wieman T. J., American Journal of Surgery, 176, 74S - 79S, 1998).

15 El producto Regranex, que contiene PDGF-BS, comercializado por J&J, ha demostrado su eficacia aumentando el índice de curación hasta el 50% en los pacientes tratados frente a solamente el 36% para los pacientes que sólo han recibido un tratamiento estándar de la herida. A pesar de esta mejora significativa del tratamiento de la úlcera del pie diabético, es obligado constatar que solamente el 50% de los pacientes se curan tras un tratamiento prolongado y costoso. En el caso de que no haya curación, las consecuencias pueden ser extremadamente graves y conducir, en numerosos casos, a una amputación del miembro inferior. Es necesario añadir que la duración media del tratamiento es muy larga, de aproximadamente 20 semanas, y que su aplicación es costosa y exigente debido a la limpieza de la herida y a la aplicación de Regranex por la mañana seguido, 12 horas más tarde, de una limpieza de la herida. Estas dos intervenciones requieren muy a menudo el cuidado de una enfermera. Además, el coste medio de un tratamiento de una duración de veinte semanas es excesivamente elevado (del orden de 1.400 dólares americanos).

20 La eficacia parcial puede explicarse por una degradación rápida del PDGF en la herida que se va a tratar. Esta degradación resulta, en el caso de una herida crónica, de un estado de inflamación prolongado que genera, a nivel de la herida, un entorno hostil para el PDGF por la estimulación de una sobreproducción de proteasas.

30 Aunque el control de la degradación es necesario para la cicatrización de las heridas, una actividad proteolítica excesiva es perjudicial porque conduce a una degradación de la matriz extracelular (F. Grinnell y col., J. Invest. Dermatol. 106 (1996) 335 - 341, y C. N. Rao y col., J. Invest. Dermatol. 105 (1995) 572 - 578) y de las moléculas que juegan un papel funcional clave, tales como los factores de crecimiento (V. Falanga y col., J. Derm. Surg. Onc. 18 (1992) 604 - 606; D. R. Yager y col., Wound Rep. Reg. 5 (1997) 23 - 32, y M. Wlaschek y col., Br. J. Dermatol. 137 (1997) 646 - 647). En efecto, los factores de crecimiento tales como el PDGF, el TGF  $\beta$  o el bFGF son elementos clave en el proceso de cicatrización por sus capacidades de inducción de la migración de las células, la proliferación, la síntesis de proteínas, la formación de la matriz, y más generalmente, controlando el proceso de reparación. No obstante, estos factores de crecimiento son moléculas proteicas, y por consiguiente, son sensibles a la degradación proteolítica. Varios estudios demuestran que la degradación de los factores de crecimiento tales como el PDGF es mucho más rápida cuando se pone en contacto con los fluidos procedentes de heridas crónicas, ya que contienen concentraciones elevadas de metaloproteinasas (D. R. Yager y col. J. Invest. Dermatol. 107 (1996) 743 - 748).

40 Para el tratamiento de las úlceras venosas, Regranex sólo ha mostrado, en un estudio clínico piloto reseñado en la publicación (T. J. Wieman, Wounds, 2003, vol. 15, nº 8, 257 - 264) una mejora menor de los tratamientos actuales basados en una limpieza regular de la herida con una terapia de compresión.

45 El problema de la inestabilidad del PDGF se ha revelado, por ejemplo, tras la producción de la proteína. Se sabe que el PDGF es particularmente sensible a la proteólisis post-traducciona (Hart y col., Biochemistry 29: 166 - 172, 1990, y patente de US Serial nº 07/557.219), y particularmente a nivel de la unión entre el aminoácido arginina en la posición 32 y el aminoácido treonina en la posición 33 de la cadena madura de la proteína. Otros sitios son sensibles a la proteólisis, tales como la unión entre la arginina en la posición 79 y la lisina en la posición 80, o incluso la unión entre la arginina en la posición 27 y la arginina en la posición 28 de la cadena B del PDGF.

50 Esta inestabilidad proteolítica supone un problema importante en el marco de la obtención de esta proteína, que es producida de forma recombinante en levadura según el procedimiento descrito en la patente US Nº 4.845.075. En efecto, la patente US Nº 7.084.262 nos enseña que el análisis y la purificación del PDGF-BB conducen a la obtención de 21 isoformas resultantes de escisiones endoproteolíticas post-traduccionales. Esta gran heterogeneidad estructural tiene como consecuencia implicar una distribución del 50% en la actividad de la proteína producida mediante ingeniería genética con respecto a la proteína intacta de forma madura.

55 Además, los resultados clínicos recientes de Cardium, según un comunicado de prensa de fecha 14 de agosto de 2006 (www.prnewswire.com) sobre las úlceras del pie diabético no curadas después de 14 semanas, muestran el potencial que puede ofrecer un tratamiento con el PDGF-BB. La solución propuesta por Cardium consiste en introducir

5 el gen de expresión del PDGF-BB en las células de la herida para sobreexpresarlo localmente. Esta terapia génica con ayuda de un adenovector ha permitido cicatrizar cerca del 80% de las úlceras del pie diabético resistentes a los tratamientos habituales, en un conjunto de 15 pacientes. Esta solución terapéutica es prometedora. Pero los desarrollos farmacéuticos de tratamientos basados en la terapia génica son actualmente todavía demasiado peligrosos por razones de seguridad relacionadas con el empleo de vectores víricos de tipo adenovirus.

Existe por tanto una necesidad y una posibilidad de mejora de los tratamientos actuales de la úlcera del pie diabético con el PDGF.

En el caso del tratamiento de la úlcera del pie diabético, el objetivo final es triple:

> acelerar la curación

10 > aumentar el índice de curación

> simplificar el protocolo del tratamiento

Existe también el caso de las úlceras venosas y de las úlceras de presión, causas de dolores importantes y de complicaciones médicas muy graves.

El problema a resolver es por tanto esencialmente una protección del PDGF en la herida crónica.

15 Se han propuesto diversas soluciones.

La patente US 5.905.142 describe un modo de remediar estos problemas de la proteólisis relativa al PDGF generando mutantes de la proteína con una resistencia aumentada frente a los ataques proteolíticos sustituyendo o eliminando uno o varios aminoácidos lisina o arginina próximos a los sitios de escisión potenciales. Esta estrategia para hacer más resistente a la proteína frente a las proteasas no es satisfactoria. Esta modificación genética del PDGF puede implicar modificaciones de su actividad biológica con distintas afinidades frente a los diferentes receptores, lo que también puede inducir problemas toxicológicos. Además, dicha modificación del PDGF necesita un nuevo desarrollo farmacéutico, extremadamente costoso y peligroso.

25 En los años 1970, cuando se estudió esta proteína en profundidad, se reveló que la purificación era extremadamente delicada ya que el PDGF es «una proteína muy adhesiva» debido a sus propiedades catiónicas e hidrófobas (Heldin, C. H., EMBO J., 11: 4251 - 4259, 1992; Raines and Ross, J. Biol. Chem 257 (9): 5154 - 5160, 1982; Antoniades, PNAS 78: 7314, 1981; Deuel y col., J. Biol. Chem. 256: 8896, 1981). El PDGF es, en efecto, una proteína muy catiónica cuyo punto isoelectrónico está comprendido entre 9,8 y 10,5. Otros autores confirman este comportamiento, tales como Wei y col. (Journal of controlled release 112: 103 - 110, 2006), que explican que el PDGF se adsorbe fácilmente en las superficies del recipiente en el que se encuentra en disolución. Los autores solucionan el problema añadiendo a la mezcla BSA al 0,1% o una mezcla de BSA al 0,1%/Tween 20. Estas soluciones resuelven en gran parte el problema, ya que hasta el 95% de la proteína se encuentra en disolución. Pero estas soluciones no son satisfactorias desde un punto de vista farmacéutico, dado el origen animal de la BSA y los riesgos relacionados con la encefalopatía espongiiforme bovina.

35 Otra solución propuesta por los mismos autores consiste en añadir un tensioactivo aniónico más potente (SDS) que permite mantener el PDGF en disolución. Desafortunadamente, el SDS induce igualmente una desnaturalización parcial de la proteína que conduce a una pérdida de la bioactividad. Esta solución no es por tanto satisfactoria para estabilizar la proteína.

40 En la patente W093/08825, los inventores han puesto en evidencia que el PDGF purificado presenta una gran inestabilidad cuando se formula en forma de un gel para una aplicación tópica. Proporcionan como ejemplo la incompatibilidad del PDGF con un cierto número de productos utilizados tradicionalmente para formular los productos farmacéuticos, tales como metil celulosa o hidroxipropil celulosa, así como ciertos conservantes habituales, tales como el alcohol bencílico. Los autores presentan el problema explicando que existe una necesidad de formular el PDGF en forma de un gel para su administración tópica que tenga una buena estabilidad a largo plazo. Los mismos autores muestran que el PDGF en disolución se degrada mediante un proceso de desamidación a pH neutro, y que la proteína es más estable a un pH ligeramente ácido. Los autores muestran que combinando varios parámetros, un polímero que no presente interacciones con la proteína, un tampón a pH ligeramente ácido que permita limitar la reacción de desamidación y un conservante neutro con respecto a la proteína, es posible formular el PDGF con el fin de obtener una formulación estable desde un punto de vista farmacéutico.

50 Los autores muestran que es posible obtener una formulación estable al almacenamiento mediante la adición de un polímero que no presente interacciones con la proteína con la condición de mantener la formulación a un pH ligeramente ácido con el fin de evitar las reacciones de degradación por desamidación de la proteína. Sin embargo, esta solución no es del todo satisfactoria porque no permite proteger al factor de crecimiento de las degradaciones proteolíticas *in vivo* a pH fisiológico.

En la patente WO97/12601, que describe formulaciones del PDGF en forma de gel, los autores explican que el

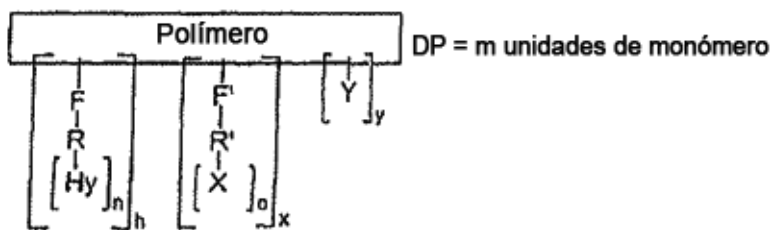
5 derivado de la celulosa que utilizan es capaz de estabilizar los factores de crecimiento frente a una eventual pérdida de actividad durante el almacenamiento. Para ello se basan en los resultados obtenidos anteriormente sobre el EGF en la patente US 4.717.717. No obstante, explican igualmente que la estabilidad del gel de celulosa que contiene el PDGF puede mejorarse ampliamente añadiendo a la formulación una especie química cargada, tal como aminoácidos cargados o iones metálicos. Aun así, esta disolución permite estabilizar los factores de crecimiento en la formulación durante el almacenamiento del producto, pero no permiten una estabilización de estos factores de crecimiento frente a las proteasas presentes en las heridas crónicas a pH fisiológico.

10 Existe por tanto un interés terapéutico por estabilizar y proteger los factores de crecimiento, particularmente el PDGF, con el fin de aumentar su eficacia en el marco de un tratamiento de heridas crónicas, y más particularmente el de heridas de úlceras del pie diabético. La invención concierne por tanto a la estabilización del PDGF frente a las degradaciones químicas o físicas que pueden intervenir al pH fisiológico *in vitro* e *in vivo* mediante la puesta a punto de un complejo entre un polímero anfifilo y un PDGF.

15 La invención concierne por tanto a la formación de un complejo entre un polímero anfifilo y un PDGF (polímero anfifilo-PDGF), aportando este complejo una estabilización química y física a la proteína frente a las degradaciones a pH fisiológico *in vitro* e *in vivo*.

La presente invención concierne por tanto a un complejo de polímero anfifilo-PDGF, física y químicamente estable, soluble en agua, caracterizado porque:

- los polímeros anfifilos están constituidos por un esqueleto polimérico hidrófilo funcionalizado por unos sustituyentes hidrófobos y unos agrupamientos hidrófilos según la fórmula general siguiente.



20 eligiéndose el polímero del grupo formado por los dextranos y las celulosas,

- siendo R, R' una unión o una cadena que comprende entre 1 y 18 carbonos, eventualmente ramificada y/o insaturada, que comprende uno o varios heteroátomos, tales como O, N o/y S, y siendo R y R' idénticos o diferentes entre sí
- 25 • siendo F, F' un éster, un tioéster, una amida, un carbonato, un carbamato, un éter, un tioéter, una amina, siendo F y F' idénticos o diferentes entre sí
- siendo X un agrupamiento hidrófilo elegido del grupo constituido por:
  - un carboxilato
  - un sulfato
  - 30 ○ un sulfonato
  - un fosfato
  - un fosfonato
- siendo Y un agrupamiento hidrófilo elegido del grupo constituido por:
  - un sulfato
  - 35 ○ un sulfonato
  - un fosfato
  - un fosfonato
- siendo Hy un agrupamiento hidrófobo elegido del grupo formado por:
  - un alquilo lineal o ramificado de C8 a C30,

eventualmente insaturado y/o que contiene uno o varios heteroátomos, tales como O, N o S.

- o un alquilarilo o un arilalquilo lineal o ramificado de C8 a C18, eventualmente insaturado y/o que contiene eventualmente un heteroátomo
- o un policiclo de C8 a C30 eventualmente insaturado,

5

n y o están comprendidos entre 1 y 3,

h representa la fracción molar del motivo hidrófobo con respecto a una unidad de monómero, comprendida entre 0,01 y 0,5

10

x representa la fracción molar de agrupamientos hidrófilos con respecto a una unidad de monómero, comprendida entre 0 y 2,0.

y representa la fracción molar de agrupamientos hidrófilos con respecto a una unidad de monómero, comprendida entre 0 y 0,5,

- el PDGF se elige del grupo de los PDGFs (factores de crecimiento derivados de plaquetas).

15

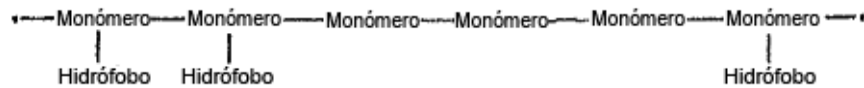
Conciene a un complejo caracterizado porque el PDGF se elige del grupo formado por los PDGFs recombinantes humanos que comprenden dos cadenas B (rhPDGF-BB).

Conciene a un complejo caracterizado porque el PDGF es el PDGF-BB.

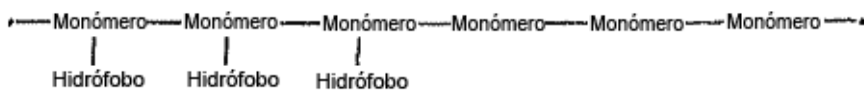
20

Los sustituyentes de los polímeros anfífilos están repartidos de forma controlada o estadística. De entre los polímeros con una repartición controlada de los sustituyentes se pueden citar, por ejemplo, los copolímeros en bloque y los copolímeros alternados.

Copolímero estadístico

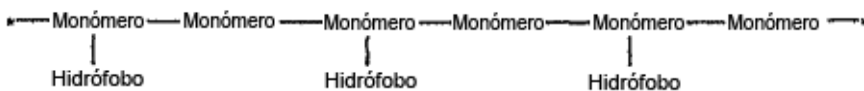


Copolímero en bloque



25

Copolímero alternado



Así, en un modo de realización, la invención conciene igualmente a un complejo de polímero anfífilo-PDGF caracterizado porque el polímero se elige de entre los polímeros cuyos sustituyentes están repartidos de forma estadística.

30

En un modo de realización, la invención conciene igualmente a un complejo de polímero anfífilo-PDGF caracterizado porque el polímero se elige de entre los polisacáridos.

En un modo de realización, los polisacáridos se eligen del grupo constituido por hialuronanos, alginatos, chitosanos, galacturonanos, sulfato de condroitina, dextranos, celulosas.

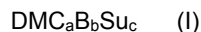
35

El grupo de las celulosas está constituido por celulosas funcionalizadas por ácidos, tales como carboximetil celulosa.

El grupo de los dextranos está constituido por dextranos funcionalizados por ácidos, tales como carboximetil dextrano.

Modo de realización no reivindicado

En un modo de realización igualmente descrito, el polisacárido es un derivado de dextrano soluble que responde a la fórmula (I) siguiente:



- 5 en la que:
- D representa una cadena de polisacáridos, constituida preferentemente por encadenamientos de unidades glucosídicas,
  - MC representa grupos metilcarboxílico,
  - B representa grupos N-bencilmetilencarboxamida,
- 10 - Su representa grupos sulfato (sulfatación de las funciones hidroxilo libres, portadas por las unidades glucosídicas),
- a, b y c representan el grado de sustitución (gs) respectivamente de los agrupamientos MC, B y Su con
    - i) a estrictamente superior a 0;
    - ii) b es tal que:
- 15 . bien b es superior o igual a 0,3 y c está comprendido entre 0,1 y 0,5;
- . o bien b es estrictamente inferior a 0,3 y c responde à la ecuación (1) siguiente:

$$C \geq 8,5 b^2 - 5,41 b + 0,86 \quad (1)$$

20 Estos derivados de dextrano de fórmula (I), así como su procedimiento de preparación, se describen de modo más general en la solicitud de patente WO 99/29734. Estos derivados de dextrano de fórmula (I) son denominados habitualmente DMCBSu y son considerados como copolímeros constituidos por subunidades R-OH y R-OX, pudiendo ser X un agrupamiento metilcarboxílico (MC), bencilamida (B) o sulfato (Su). Así, un dextrano metilcarboxílico (DMC) con un grado de sustitución (gs) de 0,6 en agrupamientos metilcarboxílicos contiene 0,6 de agrupamientos sustituidos (R-MC) y 2,4 de agrupamientos hidroxilos (R-OH), por unidad glucosídica.

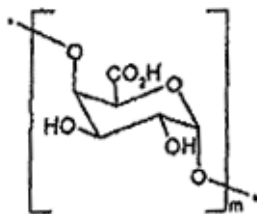
25 En un modo de realización, D presenta una masa molar comprendida entre 1.000 y 2.000.000 de Da, y en un modo de realización, inferior a 70.000 Da.

En un modo de realización, los derivados de dextrano se eligen de entre los compuestos de fórmula (I) en los cuales b es superior o igual a 0,35.

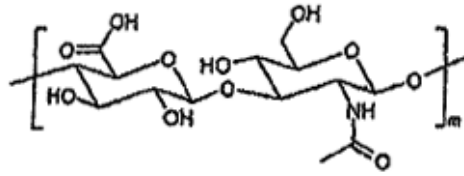
En este caso, y según un modo de realización, los derivados de dextrano se eligen de entre los compuestos de fórmula (I) en los que a está comprendido entre 0,5 y 0,8, y c está comprendido entre 0,1 y 0,5.

30 En un modo de realización, los polisacáridos se eligen del grupo constituido por hialuronanos, alginatos, chitosanos.

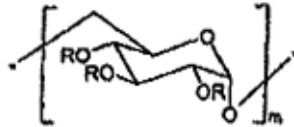
Estos diferentes polisacáridos pueden representarse como sigue:



Galacturonano



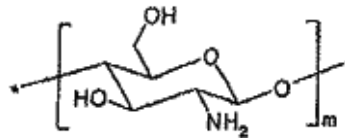
Hialuronano



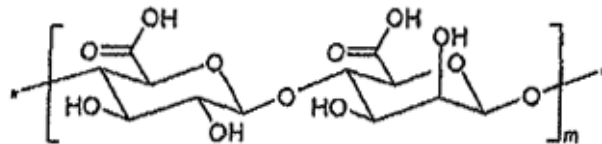
R = H, Dextrano

5

R = CH<sub>2</sub>COOH o H, Carboximetil Dextrano



Chitosano



Alginato

10

El polisacárido puede tener un grado de polimerización medio m comprendido entre 10 y 10.000.

En un modo de realización, tiene un grado de polimerización medio m comprendido entre 10 y 5.000.

En otro modo de realización, tiene un grado de polimerización medio m comprendido entre 10 y 500.

15

En un modo de realización, la invención concierne igualmente a un complejo de polímero anfífilo-PDGF caracterizado porque el grupo hidrófobo Hy se elige del grupo constituido por ácidos grasos, alcoholes grasos, aminas grasas, aminas bencílicas, derivados de colesterol y fenoles.

En un modo de realización, el derivado de colesterol es el ácido cólico.

En otro modo de realización, el fenol es el alfa-tocoferol.

En un modo de realización, el complejo de polímero anfífilo-PDGF según la invención es reversible,

20

Los polímeros utilizados se sintetizan según las técnicas conocidas por el experto en la materia o se compran a través de proveedores tales como, por ejemplo, Sigma-Aldrich, NOF Corp. o CarboMer Inc.

Los PDGF se eligen de entre los PDGF recombinantes humanos, obtenidos según las técnicas conocidas por el experto en la materia o se compran a través de proveedores tales como, por ejemplo, a través de las empresas Gentaur (EE.UU.) o Research Diagnostic Inc. (EE.UU.).

25

La constatación de la estabilización tanto química como física puede realizarse especialmente mediante la puesta en práctica de las siguientes pruebas:

- una prueba de constatación del complejo de polímero anfífilo-PDGF según la invención, realizada mediante electroforesis en gel (Gel Mobility Shift Assay)



- una prueba de ralentización de la degradación enzimática de un complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención realizada poniéndolo en contacto con una proteasa
- una prueba de estabilización física de un complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención a pH fisiológico realizada mediante SDS-Page.

5 La invención concierne igualmente a un complejo de polímero anfifilo-PDGF caracterizado porque es satisfactorio en las pruebas de constatación de la estabilidad química y física, a saber, una prueba de constatación del complejo (Gel Mobility Shift Assay), la prueba de ralentización de la degradación enzimática poniéndolo en contacto con una proteasa y la prueba de estabilización física a pH fisiológico realizada mediante SDS-Page.

10 La prueba de constatación del complejo realizada mediante Gel Mobility Shift Assay basada en el desplazamiento de los iones bajo el efecto de un campo eléctrico. Los complejos aniónicos migran hacia el ánodo y los complejos catiónicos se desplazan hacia el cátodo. Tras la migración, las proteínas son transferidas por capilaridad sobre una membrana de PVDF y reveladas con un anticuerpo específico de la proteína reconocido por un segundo anticuerpo acoplado a la peroxidasa. La proteína sola no migra, o poco, la proteína complejada con el polímero anfifilo migra hacia el ánodo o el cátodo en función de la carga global del complejo.

15 La prueba de ralentización de la degradación enzimática se basa en la verificación de la integridad de la proteína tras poner en contacto el complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención con una proteasa. Se añade una disolución de una proteasa (tripsina, quimiotripsina...) a la disolución del complejo y se realiza una cinética. La reacción se detiene añadiendo un inhibidor específico de la enzima (indol, benzamidina). A continuación se analiza la integridad de la proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page).

20 La prueba de estabilización física de un PDGF está basada en la verificación de la integridad de la proteína mediante la comparación de una disolución del complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención con una disolución de PDGF solo a pH 7,4 en términos de concentración de proteínas en disolución. Estas dos disoluciones se colocan en un banco de agitación durante 48 h a temperatura ambiente, y después se centrifugan. La concentración de PDGF en cada una de las disoluciones se evalúa mediante SDS-Page.

25 El complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención se forma poniendo en disolución acuosa un PDGF y un polímero anfifilo a pH fisiológico sin utilizar un disolvente orgánico susceptible de desnaturalizar la proteína. La formación del complejo de polímero anfifilo-PDGF es espontánea y no implica una unión covalente entre el PDGF y el polímero anfifilo. Esta asociación se realiza mediante uniones débiles que son esencialmente unas interacciones hidrófobas y unas interacciones iónicas.

30 La invención concierne igualmente al procedimiento de preparación del complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención, caracterizado porque se pone en contacto en disolución a pH fisiológico un PDGF y un polímero anfifilo.

Pueden realizarse otras pruebas para perfeccionar la constatación de la formación del complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención.

- 35
- una prueba de mantenimiento de la estructura terciaria del PDGF determinada mediante dicroísmo circular
  - una prueba de estabilidad de un PDGF en el complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención a pH fisiológico bajo estrés. El estrés puede ser un modo de agitación particular, la presencia de sales, etc.

La invención concierne igualmente a un complejo de polímero anfifilo-PDGF caracterizado porque la proporción de PDGF/polímero anfifilo está comprendida entre 1/5 y 1/5.000.

40 En un modo de realización, está comprendida entre 1/100 y 1/5.000.

En otro modo de realización, está comprendida entre 1/300 y 1/700.

La invención concierne igualmente a una composición terapéutica caracterizada porque comprende un complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención.

Se entiende por composición terapéutica una composición utilizable en medicina humana o veterinaria.

45 La composición farmacéutica según la invención es preferiblemente una composición de aplicación tópica que puede presentarse en forma de un gel, de crema, de un pulverizador, de una pasta o de un parche.

La naturaleza de los excipientes susceptibles de ser formulados con el complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención se elige en función de su forma de presentación según el conocimiento general del galeno.

50 Así, cuando la composición según la invención está en forma de un gel, éste puede realizarse, por ejemplo, a partir de polímeros tales como carboximetil celulosas (CMC), polímeros vinílicos, copolímeros de tipo PEO-PPG, polisacáridos, PEO, acrilamidas o derivados de acrilamidas.

En esta invención pueden utilizarse otros excipientes con el fin de ajustar los parámetros de la formulación, tales como un tampón para ajustar el pH, un agente que permite ajustar la isotonicidad, los conservantes tales como parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de propilo, m-cresol o fenol, o incluso un agente antioxidante tal como el clorhidrato de L-lisina.

5 Según la invención, la composición terapéutica se caracteriza porque permite una administración de aproximadamente 100 µg por ml de PDGF.

La presente invención concierne igualmente a la utilización de un complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención para la preparación de una composición terapéutica de acción cicatrizante destinada al tratamiento de las úlceras por vía tópica.

10 Concierne igualmente a un procedimiento de tratamiento terapéutico de uso humano o veterinario caracterizado porque consiste en administrar en el sitio de tratamiento una composición terapéutica que comprende el complejo de polímero anfifilo-PDGF según la invención.

### EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1: el complejo de PDGF-BB/DMCBSu no se corresponde con un objeto reivindicado

15 Síntesis de carboximetil dextrano sulfatado modificado con bencilamina (DMCBSu)

El polímero anfifilo se sintetiza a partir de un carboximetil dextrano con un grado de sustitución en carboximetilo por unidad de sacárido de 1,0 y una masa molar media de 40.000 g/mol. La bencilamina es injertada en los ácidos de este polímero según un procedimiento clásico de acoplamiento en agua en presencia de una carbodiimida hidrosoluble. El grado de sustitución de bencilamina por unidad de sacárido es de 0,4, determinado mediante RMN-<sup>1</sup>H. Este polímero se sulfata a continuación con un complejo de SO<sub>3</sub>/piridina. El grado de sustitución de sulfato por unidad de sacárido es de 0,3.

Preparación del complejo de PDGF-BB/DMCBSu

25 Se añaden 10 µl de una disolución de PDGF-BB de 0,1 mg/ml a 90 µl de una disolución de DMCBSu de 50 mg/ml. Las disoluciones de PDGF-BB y de DMCBSu se tamponan a pH 7,4 y a 300 mOsm. Esta disolución se pone en agitación suave doce horas a temperatura ambiente y después se almacena a 4°C.

Constatación de la formación de un complejo de PDGF-BB/DMCBSu

30 Se depositan 10 µl de la disolución del complejo PDGF-BB/DMCBSu descrita anteriormente sobre un gel de agarosa. La migración de los compuestos se efectúa bajo el efecto de un campo eléctrico (200 mA - 4 horas). Después de la migración, el PDGF-BB se transfirió sobre una membrana de PVDF durante una noche, y después se reveló mediante inmunotransferencia con anticuerpos de cabra anti-PDGF-BB sobre los cuales se fijaron unos anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra acoplados a la peroxidasa HRP revelada con un sustrato (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitrozul de tetrazolio).

El complejo de PDGF-BB/DMCBSu migra hacia el ánodo. Su carga negativa se explica por una composición mucho más rica en DMCBSu que en PDGF-BB. El control, constituido únicamente por PDGF-BB, no migra.

35 Constatación de la estabilidad de la disolución del complejo de PDGF- DMCBSu

40 Se colocan 10 µl de una disolución de PDGF-BB de 0,01 mg/ml a pH 7,4 y 10 µl de la disolución del complejo de PDGF-BB/DMCBSu a pH 7,4 descrita anteriormente, en un banco de agitación durante 48 h a temperatura ambiente. Después de la centrifugación, se evalúa la concentración de PDGF-BB en cada una de las disoluciones mediante SDS-Page. Parece que la concentración de PDGF-BB en disolución en el caso del complejo de PDGF-BB/DMCBSu no ha cambiado, mientras que la de la disolución de PDGF-BB sólo ha disminuido.

Constatación de la protección del PDGF-BB frente a la tripsina en el complejo de PDGF-BB/DMCBSu

Se vierten 10 µl de la disolución del complejo de BMP-2/DMCTrpOMe descrita anteriormente en 90 µl de una disolución de tripsina de 10 ng/ml a 37°C.

45 Tomando una muestra de 10 µl, se mide la concentración de PDGF-BB cada 30 minutos mediante ELISA después de haber detenido la reacción enzimática mediante la adición de 10 µl de una disolución de indol de 10 µg/ml.

Esta cinética revela que el PDGF-BB solo es totalmente degradado en 1 h 30 m, mientras que no lo es en el complejo de PDGF-BB/DMCBSu.

Validación de la actividad biológica del complejo de PDGF-BB/DMCBSu

Se ha realizado un cultivo primario de fibroblastos de dermis humana (Human Dermal Fibroblast adult) (HDFa)

a una temperatura de 37°C en un medio  $\alpha$ MEM con un 10% de suero bovino fetal (SVF) y un 1% de penicilina-estreptomicina en una atmósfera saturada en humedad y enriquecida en CO<sub>2</sub> (5%). El medio se renueva cada 4 días. A continuación se ha realizado una dilución de la suspensión celular en el medio de cultivo para sembrar placas de cultivo a una densidad de 5.000 células/pocillo para las placas de 96 pocillos (empresa Nunc).

5 Se ha verificado, para cada lote de células, el efecto estabilizante del PDGF-BB por el complejo a diferentes concentraciones, mediante la incorporación de timidina tritiada (5.000 células/pocillo en 100  $\mu$ l). 24 horas después de la siembra los fibroblastos son estimulados mediante la adición de PDGF-BB, a diferentes concentraciones que varían desde 0,1 hasta 100 ng/ml, en presencia o ausencia del polímero anfifilo de 1  $\mu$ g/ml. La incorporación de la timidina tritiada se realiza 18 horas después de la estimulación por el PDGF-BB en presencia o ausencia del complejo, mediante  
10 la adición de una disolución de 50  $\mu$ Ci/ml, es decir, 0,5  $\mu$ Ci/pocillo. La radioactividad se recupera en los frascos de medición, los pocillos se aclaran con 100  $\mu$ l de NaOH 100 mM y se mide la radiactividad después de la adición de 1 ml de líquido de centelleo (Zinsser Analytic), con un contador automático.

Los resultados obtenidos están representados en la figura 1 anexa, en la cual se expresa la cantidad de timidina tritiada incorporada por los fibroblastos (en Dpm x 103), en función de la concentración de PDGF-BB en  $\mu$ g/ml.

15 La curva continua representa los resultados del complejo según la invención a una concentración de 1  $\mu$ g/ml de derivado de dextrano, y la curva discontinua los resultados en ausencia del derivado de dextrano.

La DE50 corresponde a la concentración de PDGF-BB necesaria para conseguir el 50% de proliferación de los fibroblastos humanos. La proporción R es la relación entre las DE50 calculada como sigue:

$$R = \text{DE50 (PDGF-BB)} / \text{DE50 (PDGF-BB + DMCBSu)}$$

20 Estos resultados muestran que cuando se utiliza el PDGF-BB solo, es necesario emplear 6  $\mu$ g/ml para obtener una proliferación del 50%, mientras que cuando el PDGF-BB está complejado con un derivado de dextrano de fórmula (I), es suficiente con 2  $\mu$ g/ml para alcanzar una proliferación del 50%. La proporción R, es en este caso igual a 3.

Ejemplo 2: *complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe*

Síntesis de carboximetil dextrano modificado por el éster metílico del triptófano (DMCTrpOMe)

25 El polímero anfifilo se sintetiza a partir de un carboximetil dextrano con un grado de sustitución de carboximetilo por unidad de sacárido de 1,0 y una masa molar media de 40.000 g/mol. El éster metílico de triptófano se injerta en los ácidos de este polímero según un procedimiento clásico de acoplamiento en agua en presencia de una carbodiimida hidrosoluble. El grado de sustitución de triptófano por unidad de sacárido es de 0,3, determinado mediante RMN-<sup>1</sup>H.

30 Preparación del complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe

Se añaden 10  $\mu$ l de una disolución de PDGF-BB de 0,1 mg/ml a 90  $\mu$ l de una disolución de DMCTrpOMe de 50 mg/ml. Las disoluciones de PDGF-BB y de DMCTrpOMe se tamponan a pH 7,4 y a 300 mOsm. Esta disolución se pone en agitación suave doce horas a temperatura ambiente y después se almacena a 4°C.

Constatación de la formación de un complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe

35 Se depositan 10  $\mu$ l de la disolución del complejo PDGF-BB/DMCTrpOMe descrita anteriormente sobre un gel de agarosa para una electroforesis en gel con un revelado inmunológico. La migración de los compuestos se efectúa bajo el efecto de un campo eléctrico (200 mA - 4 horas). Después de la migración, el PDGF-BB es transferido sobre una membrana de PVDF durante una noche, y después se revela mediante inmunotransferencia con anticuerpos de cabra anti-PDGF-BB sobre los cuales se fijarán unos anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra acoplados a la peroxidasa revelada con un sustrato (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitrozol de tetrazolio).  
40

El complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe migra hacia el ánodo. Su carga negativa se explica por una composición mucho más rica en DMCTrpOMe que en PDGF-BB. El control, constituido únicamente por PDGF-BB, no migra.

Constatación de la estabilidad del complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe

45 Se colocan 10  $\mu$ l de una disolución de PDGF-BB de 0,01 mg/ml a pH 7,4 y 10  $\mu$ l de la disolución del complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe a pH 7,4 descrita anteriormente, en un banco de agitación durante 48 h a temperatura ambiente. Se evalúa la concentración de PDGF-BB en cada una de las disoluciones mediante SDS-Page. Parece que la concentración de PDGF-BB en disolución en el caso del complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe no ha cambiado, mientras que la de la disolución de PDGF-BB solo ha disminuido.

50 Constatación de la protección del PDGF-BB frente a la tripsina en el complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe

Se incuban 10  $\mu$ l de la disolución del complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe descrita anteriormente con 90  $\mu$ l de una disolución de tripsina de 10 ng/ml a 37°C. Tomando una muestra de 10  $\mu$ l cada 30 minutos, se evaluó la integridad estructural del PDGF-BB mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page) después de haber detenido la reacción enzimática mediante la adición de 10  $\mu$ l de una disolución de indol de 10  $\mu$ g/ml.

- 5 Esta cinética revela que el PDGF-BB solo es totalmente degradado en 1 h 30 m, mientras que no lo es en el complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe.

Ejemplo de referencia 3: el complejo de PDGF-BB/CMCBSu no se corresponde con un objeto reivindicado

Síntesis de la carboximetil celulosa sulfatada modificada por bencilamina (CMCBSu)

- 10 El polímero anfifilo se sintetiza a partir de una carboximetil celulosa con un grado de sustitución de carboximetilo por unidad de sacárido de 1,2 y una masa molar media de 30.000 g/mol. La bencilamina se injerta en los ácidos de este polímero según un procedimiento clásico de acoplamiento en agua en presencia de una carbodiimida hidrosoluble. El grado de sustitución de bencilamina por unidad de sacárido es de 0,2 determinado mediante RMN-<sup>1</sup>H. La sulfatación se realiza en presencia de un complejo de SO<sub>3</sub>/piridina, el grado de sustitución de sulfato es de 0,30.

Preparación del complejo de PDGF-BB/CMCBSu

- 15 Se añaden 10  $\mu$ l de una disolución de PDGF-BB de 0,1 mg/ml a 90  $\mu$ l de una disolución de CMCB de 50 mg/ml. Las disoluciones de PDGF-BB y de CMCBSu se tamponan a pH 7,4 y a 300 mOsm. Esta disolución se pone en agitación suave dos horas a temperatura ambiente y después se almacena a 4°C.

Constatación de la formación de un complejo de PDGF-BB/CMCBSu

- 20 Se depositan 10  $\mu$ l de la disolución del complejo PDGF-BB/CMCBSu descrita anteriormente sobre un gel de agarosa para una electroforesis en gel con un revelado inmunológico. La migración de los compuestos se efectúa bajo el efecto de un campo eléctrico (200 mA - 4 horas). Después de la migración, el PDGF-BB es transferido sobre una membrana de PVDF durante una noche, y después se revela mediante inmunotransferencia con anticuerpos de cabra anti-PDGF-BB sobre los cuales se fijaron unos anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra acoplados a la peroxidasa HRP revelada con un sustrato (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul de tetrazolio).

- 25 El complejo de PDGF-BB/DMCTrpOMe migra hacia el ánodo. Su carga negativa se explica por una composición mucho más rica en CMCBSu que en PDGF-BB. El control, constituido únicamente por PDGF-BB, no migra.

Constatación de la estabilidad del complejo de PDGF-BB/CMCBSu

- 30 Se colocan 10  $\mu$ l de una disolución de PDGF-BB de 0,01 mg/ml a pH 7,4 y 10  $\mu$ l de la disolución del complejo de PDGF-BB/CMCBSu a pH 7,4 descrita anteriormente, en un banco de agitación durante 48 h a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se evalúa la concentración de PDGF-BB en cada una de las disoluciones mediante SDS-Page. Parece que la concentración de PDGF-BB en disolución en el caso del complejo de PDGF-BB/CMCBSu no ha cambiado, mientras que la de la disolución de PDGF-BB solo ha disminuido.

Constatación de la protección del PDGF-BB frente a la tripsina en el complejo de PDGF-BB/CMCBSu

- 35 Se incuban 10  $\mu$ l de la disolución del complejo de PDGF-BB/CMCBSu descrita anteriormente con 90  $\mu$ l de una disolución de tripsina de 10 ng/ml a 37°C. Tomando una muestra de 10  $\mu$ l cada 30 minutos, se evaluó la integridad estructural del PDGF-BB mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-Page) después de haber detenido la reacción enzimática mediante la adición de 10  $\mu$ l de una disolución de indol de 10  $\mu$ g/ml.

Esta cinética revela que el PDGF-BB solo es totalmente degradado en 1 h 30 m, mientras que no lo es en el complejo de PDGF-BB/DMCBSu.

- 40 Contraejemplo 1: complejo de PDGF-BB/CMCB

Síntesis de la carboximetil celulosa modificada por bencilamina (CMCB)

- 45 El polímero anfifilo se sintetiza a partir de una carboximetil celulosa con un grado de sustitución de carboximetilo por unidad de sacárido de 1,2 y una masa molar media de 30.000 g/mol. La bencilamina se injerta en los ácidos de este polímero según un procedimiento clásico de acoplamiento en agua en presencia de una carbodiimida hidrosoluble. El grado de sustitución de bencilamina por unidad de sacárido es de 0,2, determinado mediante RMN-<sup>1</sup>H.

Preparación del complejo de PDGF-BB/CMCB

Se añaden 10  $\mu$ l de una disolución de PDGF-BB de 0,1 mg/ml a 90  $\mu$ l de una disolución de CMCB de 50 mg/ml. Las disoluciones de PDGF-BB y de CMCB se tamponan a pH 7,4 y a 300 mOsm. Esta disolución se pone en agitación suave dos horas a temperatura ambiente y después se almacena a 4°C.

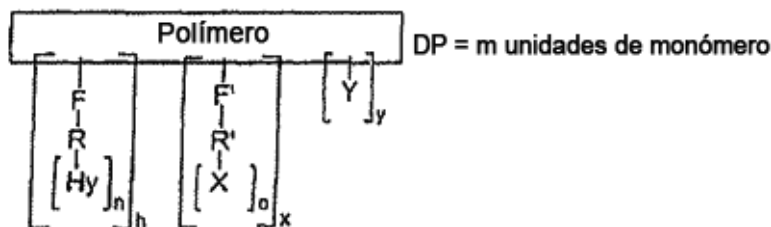
Constatación de la formación de un complejo de PDGF-BB/CMCB

5 Se depositan 10  $\mu$ l de la disolución del complejo PDGF-BB/CMCB descrita anteriormente, sobre un gel de agarosa para una electroforesis en gel con un revelado inmunológico. La migración de los compuestos se efectúa bajo el efecto de un campo eléctrico (200 mA - 4 horas). Después de la migración, el PDGF-BB es transferido sobre una membrana de PVDF durante una noche, y después se revela mediante inmunotransferencia con unos anticuerpos de cabra anti-PDGF-BB sobre los cuales se fijaron unos anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra acoplados a la peroxidasa HRP revelada con un sustrato (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul de tetrazolio).

10 El revelado no muestra migración del PDGF-BB solo con el polímero anfifilo. No ha habido formación de complejo entre el CMCB y el PDGF-BB.

**REIVINDICACIONES**

1. Complejo de polímero anfífilo-PDGF, física y químicamente estable, soluble en agua, caracterizado porque:
- los polímeros anfífilos están constituidos por un esqueleto polimérico hidrófilo funcionalizado por unos sustituyentes hidrófobos y unos agrupamientos hidrófilos según la fórmula general siguiente,



- 5
- eligiéndose el polímero del grupo formado por dextranos y celulosas,
  - siendo R, R' una unión o una cadena que comprende entre 1 y 18 carbonos, eventualmente ramificada y/o insaturada, que comprende uno o varios heteroátomos, tales como O, N o/y S, siendo R y R' idénticos o diferentes entre sí
- 10
- siendo F, F' un éster, un tioéster, una amida, un carbonato, un carbamato, un éter, un tioéter, una amina, siendo F y F' idénticos o diferentes entre sí
  - siendo X un agrupamiento hidrófilo elegido del grupo constituido por:
    - un carboxilato
    - un sulfato
    - un sulfonato
    - un fosfato
    - un fosfonato
- 15
- siendo Y un agrupamiento hidrófilo elegido del grupo constituido por:
    - un sulfato
    - un sulfonato
    - un fosfato
    - un fosfonato
- 20
- siendo Hy un agrupamiento hidrófobo elegido del grupo constituido por:
    - un alquilo lineal o ramificado de C8 a C30, eventualmente insaturado y/o que contiene uno o varios heteroátomos, tales como O, N o S.
    - un alquilarilo o un arilalquilo lineal o ramificado de C8 a C18, eventualmente insaturado y/o que contiene eventualmente un heteroátomo
    - un policiclo de C8 a C30 eventualmente insaturado,
- 25
- 30
- n y o están comprendidos entre 1 y 3,  
h representa la fracción molar del motivo hidrófobo con respecto a una unidad de monómero, comprendida

entre 0,01 y 0,5

x representa la fracción molar de agrupamientos hidrófilos con respecto a una unidad de monómero, comprendida entre 0 y 2,0.

y representa la fracción molar de agrupamientos hidrófilos con respecto a una unidad de monómero, comprendida entre 0 y 0,5,

- el PDGF se elige del grupo de los PDGFs (factores de crecimiento derivados de plaquetas).

2. Complejo según la reivindicación 1, caracterizado porque el PDGF se elige del grupo formado por los PDGFs recombinantes humanos que comprenden dos cadenas B (rhPDGF-BB).
3. Complejo según la reivindicación 1, caracterizado porque el polímero se elige de entre los polímeros cuyos sustituyentes están repartidos de forma estadística.
4. Complejo según la reivindicación 1, caracterizado porque el grupo hidrófobo Hy se elige del grupo formado por ácidos grasos, alcoholes grasos, aminas grasas, aminas bencílicas, derivados de colesterol y fenoles.
5. Complejo según la reivindicación 1, caracterizado porque el grupo de las celulosas está constituido por celulosas funcionalizadas por ácidos, tales como carboximetil celulosa.
6. Complejo según la reivindicación 1, caracterizado porque el grupo de dextranos está constituido por dextranos funcionalizados por ácidos, tales como carboximetil dextrano.
7. Complejo según la reivindicación 1, caracterizado porque el polímero es el carboximetil dextrano modificado por el éster metílico del triptófano.
8. Complejo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la formación del complejo de polímero anfifilo-PDGF es reversible.
9. Complejo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque satisface las pruebas de constatación de la estabilización química y física.
10. Complejo según la reivindicación 9, caracterizado porque las pruebas de constatación de la estabilización química y física se eligen del grupo constituido por la prueba de constatación del complejo (Gel Mobility Shift Assay), la prueba de ralentización de la degradación enzimática poniéndolo en contacto con una proteasa y la prueba de estabilización física a pH fisiológico realizada mediante SDS-Page.
11. Complejo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la proporción de PDGF/polímero anfifilo está comprendida entre 1/5 y 1/5.000.
12. Complejo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la proporción de PDGF/polímero anfifilo está comprendida entre 1/100 y 1/5.000.
13. Complejo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la proporción de PDGF/polímero anfifilo está comprendida entre 1/300 y 1/700.
14. Procedimiento de preparación del complejo de PDGF/polímero anfifilo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque este complejo de polímero/PDGF-BB se prepara en medio acuoso y en ausencia de un disolvente orgánico susceptible de desnaturalizar la proteína.
15. Composición terapéutica caracterizada porque ella comprende un complejo de polímero anfifilo-PDGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
16. Composición terapéutica según la reivindicación 15, caracterizada porque ella permite una administración de 100 µg por ml de PDGF.
17. Complejo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su utilización en el tratamiento de las úlceras por vía tópica.

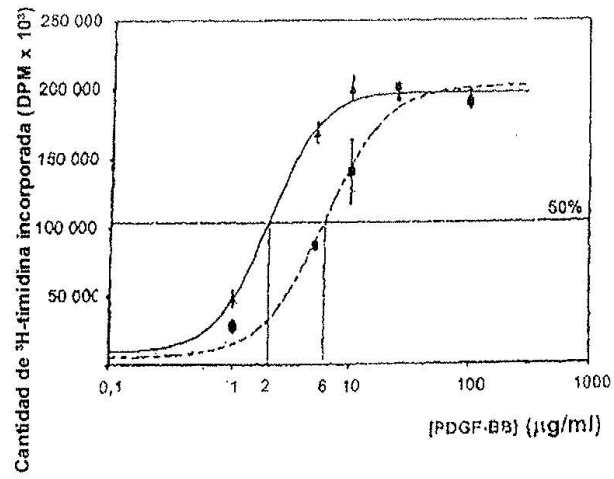


FIGURA 1



## DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

### Documentos de patente indicados en la descripción

- US 07557219 B [0018]
- US 4845075 A [0019]
- US 7084262 B [0019]
- US 5905142 A [0026]
- WO 9308825 A [0029]
- WO 9712601 A [0031]
- US 4717717 A [0031]
- WO 9929734 A [0044]

### Literatura no especificada en la descripción de la patente

- OEFNER C. *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 3921-2926 [0002]
- ROSS R. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, vol. 71, 1207 [0003]
- KOHLER N. ; LIPTON A. *Exp. Cell Res.*, 1974, vol. 87, 297 [0003]
- RAINES E.W. *Biology of Platelet-Derived Growth Factor*. 1993, 74 [0003]
- ROSS R. et al. *Science*, 1990, vol. 248, 1009 [0003]
- TZENG D.Y. et al. *Blood*, 1985, vol. 66, 179 [0003]
- RISBRIDGER G.P. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1993, vol. 97, 125 [0003]
- WILSON E. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 2213 [0003]
- MAJAK R.A. et al. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 8821 [0003]
- MORISAKI N. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 200, 612 [0003]
- J. F. NORTON et al. *Essential practice of surgery*. Springer, 2003, 77-89 [0009]
- R. LOBMANN et al. *J. of Diabetes and its complications*, 2006, vol. 20, 329-335 [0010]
- G. LAUER et al. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, vol. 115, 12-18 [0011]
- D.R. YAGER et al. *J. Invest. Dermatol.*, 1996, vol. 107, 743-748 [0011] [0016]
- CULLEN et al. *The International Journal of biochemistry & Cell Biology*, 2002, vol. 34, 1544-1556 [0013]
- GREENHALGH et al. *American Journal of pathology*, 1990, vol. 136, 1235-1246 [0013]
- *Ladin Plastic and Reconstructive Surgery*, 2000, vol. 105, 1230-1231 [0013]
- HOLLOWAY et al. *Wounds*, vol. 5/4, 198-206 [0013]
- MANDRACCHIA et al. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 2001, vol. 18, 189-209 [0013]
- WIEMAN T.J. *American Journal of Surgery*, 1998, vol. 176, 74S-79S [0013]
- F. GRINNELL et al. *J. Invest. Dermatol.*, 1996, vol. 106, 335-341 [0016]
- C.N. RAO et al. *J. Invest. Dermatol.*, 1995, vol. 105, 572-578 [0016]
- V. FALANGA et al. *J. Derm. Surg. Onc.*, 1992, vol. 18, 604-606 [0016]
- D.R. YAGER et al. *Wound Rep. Reg.*, 1997, vol. 5, 23-32 [0016]
- M. WLASCHEK. *Br. J. Dermatol.*, 1997, vol. 137, 646-647 [0016]
- T.J. WIEMAN. *Wounds*, 2003, vol. 15 (8), 257-264 [0017]
- HART et al. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, 166-172 [0018]
- HELDIN,C.H. *EMBO J.*, 1992, vol. 11, 4251-4259 [0027]
- RAINES ; ROSS. *J.Biol.Chem.*, 1982, vol. 257 (9), 5154-5160 [0027]
- ANTONIADES. *PNAS*, 1981, vol. 78, 7314 [0027]
- DEUEL et al. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, 8896 [0027]
- WEI et al. *Journal of controlled release*, 2006, vol. 112, 103-110 [0027]