

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 949**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 15/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2013** **PCT/EP2013/066560**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014** **WO14023773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2013** **E 13750667 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017** **EP 2882448**

54 Título: **KGF/FGF7 para uso en el tratamiento de la atrofia vaginal inducida por la quimioterapia**

30 Prioridad:

09.08.2012 IT RM20120404

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

07.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "LA
SAPIENZA" (100.0%)
Piazzale Aldo Moro, 5
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**MARCHESE, CINZIA;
CECCARELLI, SIMONA y
ANGELONI, ANTONIO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 949 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

KGF/FGF7 para uso en el tratamiento de la atrofia vaginal inducida por la quimioterapia

Campo de la invención

5 La presente invención se define en las reivindicaciones 1-11. En este documento se describe el uso del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF/FGF7) y de composiciones farmacéuticas de los mismos en el tratamiento de la atrofia vaginal, disuria, dolor vaginal y/o sequedad vaginal inducida por un estado posmenopáusico, por una intervención quirúrgica, por enfermedad y/o por tratamientos de quimioterapia o radioterapia.

Antecedentes de la invención

10 La falta de estrógenos en la posmenopausia provoca alteraciones en el epitelio vaginal en más del 50% de las mujeres de edades comprendidas entre 50 y 60 años [Pandit et al., 1997]. Estos trastornos se caracterizan por su cronicidad y recurrencia, a veces también están acompañados de una disfunción sexual consecuente, y su importancia supera fácilmente su gravedad real en la medida en que refuerzan el temor a un deterioro general [Rossin-Amar, 2000]. La falta de estrógenos provoca una atrofia progresiva de la vulva, lo que da como resultado una descomposición gradual de la mucosa, con una reducción del 30-50% de los niveles de vascularización. La reducción simultánea del glucógeno, en particular en las células del estrato intermedio, provoca un cambio en el ecosistema vaginal, con un consiguiente aumento del riesgo de presencia de agentes patógenos responsables de una vaginitis recurrente. Además, la atrofia vaginal también puede presentarse en mujeres premenopáusicas que han sido sometidas a una intervención quirúrgica debido a cáncer endometrial, incluyendo cáncer de pelvis o linfadenectomía paraaórtica y son tratadas con braquiterapia vaginal adyuvante (VBT) con el fin de reducir el riesgo de recaídas locales y para mejorar la tasa de supervivencia de las pacientes [Scholten 2005; Keys 2004; Lee 2006]. Todos estos tratamientos pueden dar lugar a efectos adversos en un porcentaje variable de pacientes, que incluyen disuria, dolor vaginal, atrofia de la mucosa vaginal y sequedad vaginal [Dickler 2010]. Estos síntomas pueden ser considerados como un problema sanitario importante para una parte considerable de la población femenina mundial, ya que frecuentemente están ligados a inflamación, dispareunia y pérdida de placer sexual.

25 La pérdida de estrógenos se ha reconocido como la causa más común de los síntomas de la menopausia, causando frecuentemente el tratamiento de los trastornos vulvo-vaginales posmenopáusicos con una terapia de reemplazo hormonal sistémico (HRT). Sin embargo, la implicación de los estrógenos en la génesis y la progresión de tumores del endometrio, ovario y mama, a pesar de que el aumento del riesgo de cáncer depende del tipo de terapia de reemplazo hormonal, la duración del uso, la masa corporal y el período entre la menopausia y el inicio de la terapia de reemplazo hormonal, conduce a un escepticismo entre las mujeres, y también a una reticencia entre algunos médicos para aconsejar la terapia adyuvante [Hendrix et al., 2005; Grodstein et al., 2004], que ha sido puesto en duda seriamente. Hasta ahora, no se ha llegado a ningún acuerdo con respecto a la terapia adecuada: la HRT se tiene que administrar a las mujeres que padecen trastornos menopáusicos con el fin de satisfacer sus necesidades individuales, teniendo en cuenta su perfil de riesgo individual y los objetivos terapéuticos generales.

35 Por estas razones, se han introducido formulaciones de estrógenos intravaginales con el fin de evitar una exposición sistémica a los estrógenos y se han preferido en mujeres que no tienen otros síntomas de la menopausia que requieran un tratamiento sistémico [Johnston et al., 2004; Willhite y O'Connell, 2011]. Sin embargo, se ha demostrado que el estradiol tópico se absorbe significativamente y aparece en la circulación general [Martin et al., 1979; Furuhi et al., 1980; Deutsch et al., 1981; Mandel et al., 1983; Ballag, 2005; Kendall et al., 2006; Kvorning y Jensen, 40 en: Publicación presentada en: workshop internacional, Copenhague, 1986], lo que confirma una exposición a un aumento del riesgo de cáncer de mama y cáncer de endometrio después de un tratamiento hormonal local [Notelovitz et al., 2002; Rioux et al., 2000; Schiff et al., 1977]. De cara a esta consideración, se han desarrollado preparaciones no hormonales para el tratamiento de la atrofia vaginal [Kendall et al., 2006; Berger et al., 2008], tales como isoflavonas obtenidas a partir de la soja. Sin embargo, el uso de formulaciones tópicas basadas en isoflavonas de la soja con el objetivo de prevenir los síntomas posmenopáusicos, ha proporcionado unos resultados insuficientes en 45 términos de eficacia [Levis et al., 2011].

El receptor de estrógenos alfa (ER α , del inglés "oestrogen receptor alpha") realiza su función predominantemente a través de la unión a su ligando, estradiol 17 β (E2), que induce cambios conformacionales que permiten el reclutamiento de moléculas coactivadoras y la unión a elementos de respuesta a estrógenos (EREs) en el ADN, para controlar la transcripción de genes diana (ruta de señalización "clásica" del ER). En la última década, pruebas emergentes han apoyado la importancia de una ruta de señalización alternativa de ER α (referida como una ruta "no clásica") en la mediación de las acciones de los estrógenos [Hall et al., 2001].

55 Esta ruta puede proporcionar efectos genotrópicos en las células diana y es independiente de la unión entre ER y ERE. La señal genotrófica mediada por ER α implica otros factores de transcripción, tales como la proteína activadora 1 (AP1), la proteína de especificidad 1 (SP1) y NF- κ B [Paech et al., 1997; Coleman y Smith, 2001; Porter et al., 1996; Cerillo et al., 1998], que a su vez median en la regulación de la transcripción de sus genes diana. La señal genotrófica mediada por ER α incluye la activación del receptor asociado a la membrana y la estimulación de rutas citoplasmáticas, tales como PI3K/AKT, ERK y la cascada de señalización de p38 [Singh, 2001; Watters et al., 1997;

Zhou et al., 1996]. Es interesante señalar que los factores que determinan si la señal mediada por ER se transmite a través de la ruta clásica o a través de la ruta no clásica, siguen siendo prácticamente desconocidos.

En los últimos años, se ha demostrado que varios factores de crecimiento tienen un papel en la proliferación de las células cancerosas de la mama, interaccionando con la ruta de los estrógenos, aunque los mecanismos y los efectos de tal interacción no están todavía claros. Un cierto número de estudios han proporcionado sugerencias de una interacción entre la señalización de ER y la señalización de EGF/EGFR. En particular, se ha planteado la hipótesis de que el desarrollo de una resistencia al tamoxifeno en las células de cáncer de mama puede estar correlacionado con la activación, mediada por ER, de EGFR, HER2/neu e IGF.

El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF/FGF7) (Secuencia de referencia del NCBI NM_002009.3, secuencia de aminoácidos de GenBank: CAG46799.1), un miembro de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), tiene un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular, la migración y la diferenciación durante el desarrollo y como respuesta al daño y la regeneración de tejidos [Finch y Rubin, 2004]. Actúa mediante la unión al receptor de la tirosina cinasa FGFR2-IIIb/KGFR, generado por medio de un corte y empalme alternativo del gen de FGFR2 y se expresa predominantemente sobre las células epiteliales de diferentes órganos, teniendo un papel clave en el control del crecimiento epitelial y la diferenciación [Zhang et al., 2006]. La ruta de KGF/KGFR es esencial para mantener la integridad y la función de las células epiteliales adultas debido al efecto citoprotector y regenerativo de KGF. De hecho, la expresión de KGF está fuertemente regulada al alza después de lesiones en diversos tejidos epiteliales, tales como la piel, los riñones, la vejiga, el páncreas, el estómago y el intestino [Werner et al., 1992; Marchese et al., 1995; Brauchle et al., 1996; Werner, 1998]. Además, el KGF protege frente a las lesiones del epitelio pulmonar y mejora la regeneración distal de las vías respiratorias, la estimulación de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis y los radicales de oxígeno libres, y la movilización de las células progenitoras epiteliales [Gomerts et al., 2007].

Se ha demostrado que el tratamiento con KGF recombinante (palifermina) es capaz de proteger las células epiteliales contra una variedad de lesiones, incluyendo la lesión inducida por radiación, y por lo tanto el KGF ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de la mucositis oral grave resultante de la radioterapia y/o quimioterapia del cáncer en pacientes con tumores hematológicos o de cabeza o cuello [Spielberger et al., 2004; Beaven y Shea, 2007; Brizel et al., 2008; Barash et al., 2009].

Por otro lado, la administración de KGF a ratones con vaginas en desarrollo durante el período neonatal, da lugar a un crecimiento de estrógenos, independientemente del epitelio vaginal, lo que sugiere una posible relación entre el tratamiento con estrógenos y la activación de la señal de KGF/KGFR [Masui et al., 2004]. Además, los autores ya han llevado a cabo el primer trasplante autólogo de tejido vaginal en una mujer que padece el síndrome de Mayer Rokitansky Kuster Hauser (MRKHS) por medio de la utilización de tejido vaginal autólogo cultivado *in vitro* [Panici et al., 2007], estableciendo por lo tanto el modelo ideal *in vitro* para analizar el efecto de los estrógenos y KGF sobre el trofismo de la mucosa vaginal.

El documento de solicitud internacional WO 2006/083087 describe que el péptido N-terminal AIMP1 es capaz de estimular la síntesis de colágeno y/o la expresión de KGF. Sin embargo, la capacidad del péptido para pasar a través de la capa epidérmica y la membrana plasmática y de ser, por lo tanto, realmente eficaz en tratamientos cutáneos, no se ha demostrado. Como se conoce actualmente por las publicaciones, las sustancias proteicas no pasan a través de la capa epidérmica en presencia de piel no dañada.

Existe por tanto una necesidad de proporcionar un agente terapéutico capaz de tratar localmente los trastornos de la menopausia, incluyendo la sequedad y la atrofia vaginal, que sustituya las terapias ya en uso (formulaciones a base de estrógenos).

Descripción de la invención

Los autores han investigado la interacción entre los precursores de estrógeno y KGFR con el fin de aclarar los mecanismos que son la causa del efecto de los estrógenos que favorece el crecimiento y el papel potencial de los factores de crecimiento en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la atrofia de la mucosa. Además, los autores han comparado la eficacia *in vivo* del tratamiento local con estrógenos, con la administración tópica de KGF, demostrando que KGF se puede utilizar como terapia alternativa para la atrofia vaginal posmenopáusica u otras disfunciones, tales como las que tienen lugar en pacientes sometidos a radioterapia después de una intervención quirúrgica para el cáncer de endometrio.

Se indica que la atrofia vaginal (vaginitis atrófica) se define como un adelgazamiento y una inflamación de las paredes vaginales debido a una disminución de los estrógenos. Menos estrógenos circulantes hacen que los tejidos vaginales sean más delgados, más secos, menos elásticos y más frágiles. Por otra parte, la función genital está estrechamente relacionada con la función del sistema urinario. De hecho, los síntomas de atrofia vaginal incluyen sequedad vaginal, ardor vaginal, ardor con la micción, urgencia para orinar, más infecciones del tracto urinario, incontinencia urinaria, un ligero sangrado después del coito, molestias durante el coito y acortamiento y endurecimiento del canal vaginal. Estos síntomas, que incluyen disuria y dolor vaginal están estrecha y directamente relacionados con un adelgazamiento de la mucosa vaginal. Por lo tanto, el efecto positivo de KGF sobre el trofismo del epitelio

vaginal observado en la presente invención, representa un tratamiento con éxito de estos síntomas, en particular cuando son posteriores a una atrofia vaginal. Se ha encontrado inesperadamente que el KGF puede tratar con éxito la atrofia vaginal. En particular, se observa el efecto técnico inesperado de KGF en el tratamiento de la atrofia vaginal después de un uso tópico y a dosis muy bajas (0,4 microgramos/ml y 1,2 microgramos/ml que se corresponden respectivamente con 10 ng/25 ul y 30 ng/25 ul). Además, los autores demostraron que el efecto *in vivo* de KGF es mejor que el de E2, ya que se puede obtener el mismo aumento del espesor del epitelio mediante el uso de KGF a 30 ng/25 ul y E2 a 1 ug/25 ul (véase la fig. 8B). Finalmente, demostraron que KGF no solo era capaz de contrarrestar la disminución del espesor vaginal mediante una estimulación de la proliferación de las células epiteliales, sino que también de restaurar la lubricación del epitelio mediante una estimulación de las células mucinosas (véase la fig. 9B).

La invención se refiere por tanto al factor de crecimiento de queratinocitos (KGF/FGF7), a ortólogos y a fragmentos de los mismos para uso en el tratamiento de afecciones seleccionadas entre la atrofia vaginal y/o la disuria relacionada con la atrofia vaginal, y/o el dolor relacionado con la atrofia vaginal y/o la sequedad vaginal, en donde tales afecciones están inducidas por un tratamiento de quimioterapia en el que dicho ortólogos, derivados y fragmentos de los mismos poseen las mismas propiedades terapéuticas que el factor de crecimiento de queratinocitos y en donde la quimioterapia es un compuesto anticancerígeno que pertenece a la familia de los moduladores del receptor de estrógeno selectivos.

La expresión "factor de crecimiento de queratinocitos" o "KGF/FGF7" o "KGF" significa la proteína KGF silvestre completa (secuencia de referencia del NCBI: NM_002009.3 (SEQ ID No. 1):

AGTTTTAATTGCTTCCAATGAGGTCAGCAAAGGTATTTATCGAAAAGCCCTGAATAAAAGGCTCACACAC
ACACACAAGCACACACGCGCTCACACACAGAGAGAAAATCCTTCTGCCTGTTGATTTATGGAAACAATTA
TGATTCTGCTGGAGAACTTTTCAGCTGAGAAATAGTTTGTAGCTACAGTAGAAAGGCTCAAGTTGCACCA
GGCAGACAACAGACATGGAATTCTTATATATCCAGCTGTTAGCAACAAAACAAAAGTCAAATAGCAAACA
GCGTCACAGCAACTGAACTTACTACGAACTGTTTTTATGAGGATTTATCAACAGAGTTATTTAAGGAGGA
ATCCTGTGTTGTTATCAGGAACTAAAAGGATAAGGCTAACAATTTGGAAAGAGCAACTACTCTTTCTTAA
ATCAATCTACAATTCACAGATAGGAAGAGGTCAATGACCTAGGAGTAACAATCAACTCAAGATTCATTTT
CATTATGTTATTCATGAACACCCGGAGCACTACACTATAATGCACAAATGGATACTGACATGGATCCTGC
CAACTTTGCTCTACAGATCATGCTTTCACATTATCTGTCTAGTGGGTACTATATCTTTAGCTTGCAATGA
CATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGAACTGTTCCAGCCCTGAGCGACACACAAGAAGTTATGAT
TACATGGAAGGAGGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTTCTGTGCAACACAGTGGTACCTGAGGATCGATA
AAAGAGGCAAAGTAAAAGGGACCCAAGAGATGAAGAATAATTACAATATCATGGAAATCAGGACAGTGGC
AGTTGGAATTGTGGCAATCAAAGGGGTGGAAAGTGAATTCATCTTGCAATGAACAAGGAAGGAAAACCTC
TATGCAAAGAAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTCAAAGAATAATTCTGGAAAACCATTTACAACACAT
ATGCATCAGCTAAATGGACACACAACGGAGGGGAAATGTTTGTGCTTAAATCAAAGGGGATTCTCTGT
AAGAGGAAAAAAACGAAGAAAGAACAAAAAACAGCCCACTTTCTTCCTATGGCAATAACTTAATTGCAT
ATGGTATATAAAGAACCAGTTCAGCAGGGAGATTTCTTTAAGTGGACTGTTTTCTTTCTTCTCAAAATT
TTCTTTCTTTTATTTTTTTAGTAATCAAGAAAGGCTGGAAAACCTACTGAAAACTGATCAAGCTGGACTT
GTGCATTTATGTTTGTTTTAAAGACACTGCATTAAAGAAAGATTTGAAAAGTATACACAAAAATCAGATTT
AGTAACTAAAGGTTGTAAAAAATTGTAAACTGGTTGTACAATCATGATGTTAGTAACAGTAATTTTTTTT
CTTAAATTAATTTACCCTTAAGAGTATGTTAGATTTGATTATCTGATAATGATTATTTAAATATTCCTAT
CTGCTTATAAAATGGCTGCTATAATAATAATAACAGATGTTGTTATATAAGGTATATCAGACCTACAG
GCTTCTGGCAGGATTTGTCAGATAATCAAGCCACACTAACTATGGAAAATGAGCAGCATTTTAAATGCTT

TCTAGTGAAAAATTATAATCTACTTAACTCTAATCAGAAAAAAATTTCTCAAAAAAATCTATTATGAAAG
TCAATAAAATAGATAATTTAACAAAAGTACAGGATTAGAACATGCTTATACCTATAAATAAGAACAAAAT
TTCTAATGCTGCTCAAGTGGAAAGGGTATTGCTAAAAGGATGTTTCCAAAAATCTTGTATATAAGATAGC
AACAGTGATTGATGATAATACTGTACTTCATCTTACTTGCCACAAAATAACATTTTATAAATCCTCAAAG

TAAAATTGAGAAATCTTTAAGTTTTTTTCAAGTAACATAATCTATCTTTGTATAATTCATATTTGGGAAT
 ATGGCTTTTAATAATGTTCTTCCCACAAATAATCATGCTTTTTTCCTATGGTTACAGCATTAACCTCTAT
 TTTAAGTTGTTTTGAACTTTATTGTTTTGTTATTTAAGTTTATGTTATTTATAAAAAAAAACCTTAAT
 AAGCTGTATCTGTTTCATATGCTTTTAATTTTAAAGGAATAACAAAACCTGTCTGGCTCAACGGCAAGTTT
 CCCTCCCTTTTCTGACTGACACTAAGTCTAGCACACAGCACTTGGGCCAGCAAATCCTGGAAGGCAGACA
 AAAATAAGAGCCTGAAGCAATGCTTACAATAGATGTCTCACACAGAACAATACAAATATGTAAAAAATCT
 TTCACCACATATTCTTGCCAATTAATTGGATCATATAAGTAAAATCATTACAAATATAAGTATTTACAGG
 ATTTTAAAGTTAGAATATATTTGAATGCATGGGTAGAAAATATCATATTTTAAACTATGTATATTTAA
 TTTAGTAATTTTCTAATCTCTAGAAATCTCTGCTGTTCAAAAGGTGGCAGCACTGAAAGTTGTTTTCTTG
 TTAGATGGCAAGAGCACAATGCCCAAATAGAAGATGCAGTTAAGAATAAGGGGCCCTGAATGTCATGAA
 GGCTTGAGGTCAGCCTACAGATAACAGGATTATTACAAGGATGAATTTCCACTTCAAAGTCTTTCATTG
 GCAGATCTTGGTAGCACTTTATATGTTACCAATGGGAGGTCAATATTTATCTAATTTAAAGGTATGCT
 AACCCTGTGGTTTTAATTTCAAATATTTGTCATTCAAGTCCCTTTACATAAATAGTATTTGGTAATAC
 ATTTATAGATGAGAGTTATATGAAAAGGCTAGGTCAACAAAAACAATAGATTCATTTAATTTTCTGTGG
 TTGACCTATACGACCAGGATGTAGAAAAGTAAAGAACTGCCCTTCCTCAGATATACTCTTGGGAGAGA
 GCATGAATGGTATTCTGAACTATCACCTGATTCAAGGACTTTGCTAGCTAGGTTTTGAGGTCAGGCTTCA
 GTAAGTGTAGTCTTGTGAGCATATTGAGGGCAGAGGAGGACTTAGTTTTTCATATGTGTTTCCTTAGTGC
 CTAGCAGACTATCTGTTTATAATCAGTTTTTCTAGTGTGAATTCAGTGAATGTTTATAGACAAAAGAAAATA
 CACACTAAAAGTAACTCTTCAATTTTAAAGGGTAAACATGACTATACAGAAAATTTAAATAGAAAATAGTGT
 ATATACATATAAAATACAAGCTATGTTAGGACCAATGCTCTTTGTCTATGGAGTTATACTTCCATCAAA
 TTACATAGCAATGCTGAATTAGGCAAACCAACATTTAGTGGTAAATCCATTCCTGGTAGTATAAGTCAC
 CTAAAAAGACTTCTAGAAAATATGTACTTTAATTATTTGTTTTTCTCCTATTTTAAATTTATTATGCAA
 ATTTTAGAAAATAAAATTTGCTCTAGTTACACACCTTTAGAAATCTAGAATATTTAAACTGTAAGGGGCC
 TCCATCCCTCTTACTCATTTGTAGTCTAGGAAATTGAGATTTTGATACACCTAAGGTCACGCAGCTGGGT
 AGATATACAGCTGTCACAAGAGTCTAGATCAGTTAGCACATGCTTTCTACTCTTCGATTATTAGTATTAT
 TAGCTAATGGTCTTTGGCATGTTTTTGTTTTTTATTTCTGTTGAGATATAGCCTTTACATTTGTACACAA
 ATGTGACTATGTCTTGGCAATGCACTTCATACACAATGACTAATCTATACTGTGATGATTTGACTCAAAA
 GGAGAAAAGAAATTATGTAGTTTTCAATTCTGATTCCTATTACCTTTTGTATTGAATGGAAAGCTTTG
 TGCAAAATATACATATAAGCAGAGTAAGCCTTTTAAAAATGTTCTTTGAAAGATAAAATTAAATACATGA
 GTTTCTAACAATTAGA

Secuencia de aminoácidos de GenBank: CAG46799.1 (SEQ ID No. 2):

MHKWILTWILPTLLYRSCFHIICLVGTISLACNDMTPEQMATNVNCSSPERHTRSVDYMEGGDIRVRLFCRTQWYLR
 IDKRKGVKGTQEMKNNYNIMEIRTVAVGIVAIGVSEFYLAMNKEGKLYAKKECNEDCNFKELILENHYNITYASAKW
 THNGGEMFVALNQKGI PVRGKKTKEQKTAHFLPMAIT

o de KGF humano recombinante (secuencia de aminoácidos de SwissProt: P21781 # (SEQ ID No. 3):

MHKWILTWILPTLLYRSCFHIICLVGTISLACNDMTPEQMATNVNCSSPERHTRS YDMEGGDIRVRRLFCRTQWYLR
IDKRGKVKGTQEMKNNYNIMEIRTVAVGIVAIGVESEFYLAMNKEGKLYAKKECNEDCNFKELILENHYN TYASAKW
THNGGEMFVALNQKGI PVRGKKTKEQKTAHFLPMAIT

el KGF humano recombinante palifermina (DrugBank: DB00039 (fragmentado desde el aa. 56 hasta el aa. 194 de SEQ ID No. 3):

YDMEGGDIRVRRLFCRTQWYLRIDKRGKVKGTQEMKNNYNIMEIRTVAVGIVAIGVESEFYLAMNKEGKLYAKKEC
NEDCNFKELILENHYN TYASAKWTHNGGEMFVALNQKGI PVRGKKTKEQKTAHFLPMAIT

- 5 o sus variantes alélicas u ortólogos, fragmentos, mutantes, derivados o análogos funcionales.

En la presente invención, las variantes, fragmentos, derivados mutantes o análogos funcionales poseen la misma actividad farmacológica que la proteína de KGF.

Preferiblemente, la variante de KGF o los ortólogos, derivados y fragmentos de la misma tienen al menos un residuo sustituido por un residuo de aminoácidos diferente.

- 10 Las variantes de KGF de la presente invención, obtenidas por tecnologías conocidas en la técnica, son proteínas mutantes, que difieren en la secuencia de aminoácidos del KGF de tipo silvestre por la mutación de uno o varios aminoácidos individuales. En una realización muy preferida de la presente invención, solamente se realiza una sustitución de aminoácidos en la secuencia de la proteína natural. Sin embargo, se incluye en el objeto de la presente invención que la proteína natural se puede optimizar adicionalmente mediante la sustitución de una pluralidad, por
15 ejemplo dos o más, de las sustituciones de aminoácidos. Por tanto, las variantes pueden diferir de la secuencia de la proteína de tipo silvestre por sustituciones de aminoácidos en 1-10, preferiblemente 1, 2, 3, 4, 5 y 6 posiciones diana de aminoácidos diferentes.

Por otra parte, los mutantes o las variantes de la invención muestran la misma actividad farmacológica que la proteína KGF de tipo silvestre.

- 20 El término "mutación" o "variante" tal y como se usa en el contexto de la presente invención, se puede entender como una sustitución, delección y/o adición de un solo aa en la secuencia diana.

Preferiblemente, la mutación de la secuencia diana en la presente invención es una sustitución. La sustitución puede tener lugar con un aminoácido diferente, codificado genéticamente o mediante aminoácidos no codificados genéticamente. Ejemplos de aminoácidos no codificados genéticamente son homocisteína, hidroxiprolina, ornitina, hidroxilisina, citrulina, carnitina, etc.

- 25 En una realización preferida, el tratamiento comprende braquiterapia vaginal adyuvante.

En una realización preferida, el agente quimioterapéutico es tamoxifeno.

- La invención se refiere además a una composición farmacológica que comprende excipientes farmacéuticamente aceptables (o vehículos) y un compuesto para uso en el tratamiento de afecciones de atrofia vaginal, disuria relacionada con la atrofia vaginal, dolor relacionado con la atrofia vaginal y/o sequedad vaginal, en donde tales afecciones están inducidas por tratamientos de quimioterapia en donde dicho compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste en:

- el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF/FGF7), ortólogos y fragmentos de los mismos;
- un vector que comprende dicho polinucleótido y

- 35 - una célula hospedadora modificada genéticamente que expresa dicho polipéptido,

en donde dichos ortólogos, derivados y fragmentos de los mismos poseen las mismas propiedades terapéuticas que el factor de crecimiento de queratinocitos y en donde la quimioterapia es un compuesto anticancerígeno que pertenece a la familia de inhibidores del receptor de estrógenos selectivo. Dicha composición farmacológica está destinada preferiblemente a la administración tópica.

- 40 La composición farmacológica de acuerdo con la invención comprende preferiblemente una cantidad farmacéuticamente eficaz de factor de crecimiento de queratinocitos.

En una realización preferida, el factor de crecimiento de queratinocitos tiene una concentración de 0,1 a 100 µg/ml, más preferiblemente una concentración de 0,1 a 10 µg/ml, aún más preferiblemente de 5 µg/ml. La composición farmacológica de la invención comprende también preferiblemente un agente gelificante. Dicho agente gelificante es
45 preferiblemente Pluronic F127.

Las composiciones farmacológicas de la invención se pueden preparar mezclando el factor de crecimiento de queratinocitos que tiene el grado de pureza deseado con vectores opcionales, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables (Remington Pharmaceutical Sciences edición 16ª, Osol, A. Ed., 1980) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Vectores, excipientes o agentes estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, y pueden incluir tampones, antioxidantes, conservantes, péptidos, proteínas, polímeros hidrófilos, agentes quelantes tales como EDTA, azúcares, sales que forman contraiones tales como sodio, complejos con metales (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos sometidos a ensayo, tales como TWEEN®, Pluronic® o polietilenglicoles (PEG).

El tratamiento tópico con KGF está altamente especializado y es específico para el tratamiento local de trastornos de la menopausia y, por lo tanto, está indicado con el fin de combatir síntomas tales como la sequedad y la atrofia vaginal. Por lo tanto, KGF puede sustituir las terapias ya en uso, tales como formulaciones a base de estrógenos.

Las ventajas proporcionadas por el uso de KGF, como resultado de su origen proteico, se deben a la impenetrabilidad de la barrera epitelial y a la presencia fisiológica de su receptor específico en la membrana, lo que permite desarrollar su función sin pasar a través. De hecho, a diferencia de los estrógenos, KGF no pasa a la circulación (de forma transcutánea).

En una realización preferida de la composición farmacológica de la invención, KGF se administra con una dosis de 10-30 ng/día, lo que garantiza que solo la proporción introducida y liberada puede actuar localmente, sin una reacción cruzada con otras rutas de señalización.

La composición farmacéutica descrita en este documento se puede emplear para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas.

La formulación exacta, la ruta de administración y la dosificación pueden ser elegidas por cada médico de cara a las afecciones del paciente. La administración se puede lograr en una dosis única o en dosis repetidas a intervalos. La cantidad y el intervalo de la dosificación se pueden ajustar individualmente con el fin de proporcionar el efecto terapéutico, que se traduce en una mejoría de los síntomas o una prolongación de la supervivencia de un paciente. La cantidad real de composición administrada dependerá, por supuesto, del sujeto al que se está tratando, del peso del sujeto, de la gravedad del padecimiento, de la forma de administración y del juicio del médico que indica el tratamiento. Una dosificación diaria adecuada estará entre 0,001 a 10 mg/kg, particularmente de 0,1 a 5 mg/kg. La administración se puede llevar a cabo por métodos conocidos, por ejemplo, mediante inyección, en particular mediante una inyección intravenosa, intramuscular, transmucosa, subcutánea o intraperitoneal y/o mediante administración oral, tópica, nasal, por inhalación, aerosol y/o aplicación rectal, etc. La administración puede ser local o sistémica. Además, las variantes de HMGB1 objeto de esta invención se pueden inmovilizar de forma reversible y/o adsorber sobre la superficie y/o dentro de dispositivos médicos o sistemas de liberación/transporte de fármacos (microesferas). Los dispositivos médicos y las microesferas se pueden cargar de forma reversible con las variantes de esta invención, a través de su unión, impregnación y/o adsorción sobre la superficie del dispositivo médico o de la microesfera o sobre una capa que recubre su superficie. Cuando el dispositivo médico o la microesfera entran en contacto con fluidos biológicos, la variante inmovilizada de forma reversible se libera.

Por tanto, el dispositivo médico y la microesfera actúan como herramientas de liberación de fármacos que eluyen la molécula objeto de esta invención, de tal manera que se puede controlar su cinética de liberación, asegurando una liberación controlada o sostenida, como es requerida por el tratamiento. Los métodos para el revestimiento/impregnación de los dispositivos médicos y la carga de microesferas son bien conocidos por los expertos en estas tecnologías. En la presente memoria se describe un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de SEQ ID No. 1. Dicho polipéptido se elige a partir del grupo que consiste en un homólogo, un derivado, un equivalente y un fragmento de un polipéptido.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "equivalente" se entenderá que significa un péptido que tiene al menos una de las actividades del presente polipéptido. "Homólogo" se entenderá como un polipéptido que muestra ciertas modificaciones, en comparación con el polipéptido natural. Estas modificaciones pueden ser una delección, un truncamiento, una extensión, una fusión quimérica y/o una mutación. Entre los polipéptidos equivalentes, se prefieren los que muestran más de un 80% de homología.

"Derivado" se refiere a cualquier polipéptido, eventualmente mutado, truncado y/o extendido, que ha sido modificado químicamente o que contiene aminoácidos inusuales.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "polipéptido" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos que tiene propiedades terapéuticas para el tratamiento de afecciones de atrofia vaginal, disuria, dolor vaginal y/o sequedad vaginal inducidas por un estado posmenopáusico, por una cirugía, por una patología y/o por tratamientos de quimioterapia o radioterapia. Este polipéptido, si es necesario, se puede modificar *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo, mediante glicosilación, miristoilación, amidación, carboxilación o fosforilación, y se puede obtener, por ejemplo, mediante métodos sintéticos o recombinantes conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "ortólogos" se refiere a proteínas en especies diferentes a las proteínas de SEQ ID NO.1 en el Homo sapiens, que han evolucionado a partir de un gen ancestral común mediante espe-

ciación. A modo de ejemplo de tales ortólogos, se pueden citar las proteínas correspondientes a KGF en *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* y *Danio rerio*.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "derivados" se refiere a polipéptidos que tienen un porcentaje de identidad de al menos del 75% con SEQ ID NO. 1, o un ortólogo de los mismos, preferiblemente de al menos 85%, a modo de ejemplo de al menos 90%, y más preferiblemente de al menos 95%.

Tal como se utiliza en esta memoria, "fragmentos" se refiere a polipéptidos que tienen una longitud de al menos 25 aminoácidos, preferiblemente de al menos 50 aminoácidos, a modo de ejemplo de al menos 75 o 85 aminoácidos, y más preferiblemente de al menos 100 aminoácidos. En esta memoria se describen fragmentos y derivados que poseen propiedades terapéuticas para tratar afecciones de atrofia vaginal, disuria, dolor vaginal y/o sequedad vaginal inducidas por un estado posmenopáusico, por una cirugía, por una patología y/o por tratamientos de quimioterapia o radioterapia.

Tal como se utiliza en esta memoria, un "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácidos, significa el porcentaje de aminoácidos idénticos, entre las dos secuencias que se van a comparar, obtenido con el mejor alineamiento de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico y extendiéndose aleatoriamente las diferencias entre estas dos secuencias sobre las secuencias de aminoácidos. Tal como se utiliza en esta memoria, "mejor alineamiento" o "alineamiento óptimo", significa la alineación para la cual el porcentaje de identidad determinado (véase más adelante) es el más alto. La comparación de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se realiza por lo general mediante una comparación de las secuencias que se han alineado previamente de acuerdo con la mejor alineación; esta comparación se realiza sobre segmentos de comparación con el fin de identificar y comparar las regiones locales de similitud. El mejor alineamiento de las secuencias para llevar a cabo la comparación se puede realizar, además de manualmente, mediante el uso del algoritmo de homología global desarrollado por Smith y Waterman (Ad. App. Math., vol. 2, p: 482, 1981), empleando el algoritmo de homología local desarrollado por Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., vol. 48, p: 443, 1970), utilizando el método de similitudes desarrollado por Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p: 2444, 1988), mediante el uso de programas informáticos para ordenador usando tales algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el paquete de programas informáticos de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI EE.UU.), utilizando algoritmos de alineación múltiples MUSCLE (Edgar, Robert C, Nucleic Acids Research, vol. 32, p: 1792, 2004). Para obtener la mejor alineación local, se puede usar preferiblemente el programa informático BLAST, con la matriz BLOSUM 62, o la matriz PAM 30. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima, siendo capaces las secuencias de aminoácidos de comprender adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, con el fin de obtener la alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y a composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente una reacción adversa alérgica o similar, tal como molestias gástricas, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o mencionado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. La expresión "excipiente o vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los que son originarios del petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Soluciones salinas de agua o acuosas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas se emplean preferentemente como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados están descritos en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN, preferiblemente a ADN. Dicho ADN puede ser de cadena doble o de cadena sencilla.

Preferiblemente, el polinucleótido comprende la secuencia de SEQ ID No. 1. Preferiblemente, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica la secuencia de KGF (SEQ ID No. 2, o SEQ ID No. 3 o del aa 56 al aa 194 de SEQ ID No. 3).

El polinucleótido de la invención también puede incluir la secuencia que codifica el polipéptido definido anteriormente, una secuencia codificadora adicional tal como una secuencia líder o una secuencia de proproteína, y/o una secuencia no codificadora adicional, tal como intrones o secuencias 5' y/o 3' de UTR.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "vector" se refiere a un vector de expresión, y puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula vírica, un fago, etc. Tales vectores pueden incluir plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores obtenidos a partir de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN vírico tal como de vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y la seudorrabia. Un gran número de vectores adecuados es conocido por los expertos en la técnica y están disponibles comercialmente.

Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (QIAGEN), pbs, pDIO, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH[beta]a, pNH18A, pNH46A (STRATAGENE), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (PHARMACIA). Eucariotas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (STRATAGENE), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (PHARMACIA). Sin embargo, se puede emplear cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el hospedador. La secuencia de polinucleótidos, preferiblemente la secuencia de ADN en el vector está ligada funcionalmente a una o varias secuencias apropiadas de control de la expresión (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. A modo de ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar promotores procariotas o eucariotas, tales como CMV inmediato temprano, HSV timidina cinasa, SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus y metalotioneína I de ratón. El vector de expresión también contiene un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un vector de transcripción.

El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

Además, los vectores contienen preferiblemente uno o varios genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedadoras transformadas, tales como dihidro folato reductasa o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucariotas, o tales como la resistencia a la tetraciclina o la ampicilina en *E. coli*.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "célula hospedadora modificada genéticamente" se refiere a células hospedadoras que han sido transducidas, transformadas o transfectadas con el polinucleótido o con el vector descrito anteriormente.

A modo de ejemplos representativos de células hospedadoras apropiadas, se pueden citar células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas tales como levadura, células de insecto tales como Sf9, células animales tales como CHO o COS, células vegetales, etc. La selección de un hospedador apropiado se considera dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas del presente documento.

Preferiblemente, dicha célula hospedadora es una célula animal, y más preferiblemente una célula humana.

La introducción del polinucleótido o del vector descrito anteriormente en la célula hospedadora se puede efectuar mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica, tal como transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano o electroporación.

La composición de la invención puede comprender uno o varios aditivos (por ejemplo, agentes estabilizadores, conservantes). Véase, en general, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6ª ed. (varios compiladores, 1989-1998, Marcel Dekker).

De acuerdo con la presente invención, una "cantidad eficaz" de una composición es una que es suficiente para conseguir un efecto biológico deseado, en este caso, el tratamiento de afecciones como atrofia vaginal, disuria, dolor vaginal y/o sequedad vaginal, inducidas por un estado posmenopáusico, por una cirugía, por una patología y/o por tratamientos de quimioterapia o radioterapia. Se entiende que la dosificación eficaz dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. Los intervalos de dosis eficaces proporcionados no pretenden limitar la invención y representan intervalos de dosis preferidos. Sin embargo, la dosificación preferida se puede adaptar al sujeto individual, tal y como entiende y puede determinar un experto en la técnica, sin una experimentación indebida. Dicho polipéptido, polinucleótido, vector y célula hospedadora son como se han descrito previamente.

La presente invención se describirá por medio de ejemplos no limitativos, haciendo referencia a las siguientes figuras:

Figura 1. Efecto del tratamiento con KGF y E2 sobre la proliferación de KC. (A) Análisis de la inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal directo contra Ki67 en KC no tratadas o tratadas con diferentes concentraciones de KGF o E2 (0,5-20 ng/ml) durante 24 h. (B) Evaluación de la proliferación de las células después del tratamiento con KGF y E2 (20 ng/ml) en dos poblaciones diferentes de KC, obtenidas a partir de biopsias tomadas de mujeres premenopáusicas o posmenopáusicas, respectivamente. (C) Evaluación del posible efecto sinérgico o aditivo de KGF y E2. Las células KC se trataron con KGF, E2 o una combinación de los mismos y se sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Ki67. (D) Evaluación del efecto proliferativo de KGF y E2 en presencia de tamoxifeno. Las KCs se trataron con KGF, E2, tamoxifeno (Tam, 100 nM), KGF después Tam o E2 después Tam durante 24 h. Después de 24 h, las células se fijaron y se tiñeron con violeta cristal al 1% o se sometieron a inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Ki67. El porcentaje de células positivas para Ki67 se determinó contando el número de núcleos positivos para Ki67, comparado con el número total de núcleos en diez áreas diferentes, seleccionadas al azar a partir de tres experimentos diferentes. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 2. Efecto de KGF y E2 sobre la activación de las rutas no genómicas de ER-alfa. (A) Las células MCF-7 se trataron con KGF y E2 (20 ng/ml) durante 5 o 30 minutos, y el análisis con transferencia de tipo Western del estado de la fosforilación de ERK se llevó a cabo usando un anticuerpo monoclonal de ERK fosfoespecífico (pERK). Los niveles totales de ERK se evaluaron mediante una "transferencia" con un anticuerpo específico de ERK2. (B) El análisis con transferencia de tipo Western del estado de la fosforilación de MAPK p38 se llevó a cabo utilizando un

anticuerpo monoclonal de p38 fosfoespecífico (pp38). Los niveles de p38 total se evaluaron mediante una "transferencia" con un anticuerpo específico de p38. (C) El análisis con transferencia de tipo Western del estado de la fosforilación de Akt se llevó a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal de Akt fosfoespecífico (pAkt). Los niveles de Akt total se evaluaron mediante una "transferencia" con un anticuerpo específico de Akt. (D) El análisis con transferencia de tipo Western del estado de la fosforilación de ERalfa se llevó a cabo utilizando un anticuerpo monoclonal de ERalfa fosfoespecífico (pERa). Los niveles de ERalfa total se evaluaron mediante una "transferencia" con un anticuerpo específico de ERalfa.

Figura 3. Evaluación de la regulación al alza mediada por E2 del KGFR. (A) Las células MCF-7 se trataron o no con E2 (20 ng/ml) durante 24 h, y la cantidad de proteína KGFR se evaluó por medio de una transferencia de tipo Western utilizando un anticuerpo policlonal anti-bek ERK. La tubulina se utilizó como control de carga. (B) Los niveles de expresión del ARNm de KGFR se determinaron usando PCR en tiempo real y se normalizaron para los niveles de ARNm 18s. La cantidad de ARNm de KGFR en las células tratadas con E2, se expresó como un aumento en el nivel de ARNm de KGFR, en comparación con las células no tratadas.

Figura 4. Localización celular de ERalfa después del tratamiento con KGF o E2. (A) Fraccionamiento subcelular de las células MCF-7. Las fracciones citoplasmáticas y nucleares se analizaron con anti-ERalfa, anti- β -tubulina como control para el fraccionamiento citoplasmático y anti-lamina B como marcador nuclear. (B) Inmunofluorescencia de MCF-7 tratadas o no tratadas con KGF, E2 o una combinación de los mismos durante 5 o 30 min. Las células se trataron con anticuerpos anti-ERalfa primarios, seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con FITC (verde). Los microfilamentos de actina se evidenciaron con rojo de Texas conjugado con faloidina (rojo). Se muestran las imágenes fusionadas.

Figura 5. Papel de KGF en la estimulación de los efectos genómicos de ERalfa. La estructura artificial ERE-LUC se transfirió en las células MCF-7 tratadas o no tratadas con KGF o E2 durante 24 h, y se determinó la actividad de la luciferasa. La información relativa al ensayo informador de luciferasa se expresó como un aumento en comparación con el control (células no tratadas) y representa el promedio de tres experimentos distintos después de la reacción conjunta para las diferencias en la eficiencia de la transfección por medio de la actividad de pRL-TK. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 6. Estudios *in vivo* sobre un modelo de ratón. (A) La cepa de ratón CD1 utilizada en este estudio se sometió a ovariectomía con el fin de inducir atrofia vaginal y, por lo tanto, se trató localmente con 25 μ l de hidrogel cargado con KGF (10 o 30 ng/día) o con E2 (30 ng/día o 1 μ g/día). (B) Estudio reológico sobre hidrogel de Pluronic F127. Una solución de F127 (cP = 20% p/v en H₂O) se calentó con una tasa de 2°C/min desde 10 hasta 40°C, y los valores de G' (módulo de elasticidad) y G'' (módulo de pérdida) se midieron durante este aumento de la temperatura y se registraron en forma de gráfico. (C) Diagrama esquemático de las moléculas modelo utilizadas para la prueba de liberación *in vitro* con Pluronic F127. (D) Ensayo de liberación con Pluronic F127. El hidrogel cargado con las moléculas modelo se introdujo en una bolsa de membrana de diálisis y se incubó en 60 ml de agua destilada a 37°C con agitación, con una tasa de 50 rpm. Los perfiles de liberación de los hidrogeles cargados se expresaron en porcentajes de salida acumulados a lo largo del tiempo.

Figura 7. Evaluación del efecto *in vivo* de KGF y E2 sobre el epitelio vaginal. (A) Concentraciones séricas de E2 y KGF en ratas tratadas, medidas utilizando los kits de ELISA convencionales para E2 y KGF. Los valores se expresan en pg/ml, con ND como promedio insignificante $\pm$ desviación estándar (menos de 10 pg/ml). (B) Las secciones de tejido procedentes de la vagina de los ratones de control, ratones sometidos a ovariectomía tratados solo con el vehículo, y ratones tratados con dosis bajas y dosis altas de E2 o KGF, se tiñeron con hematoxilina y eosina. La mucosa vaginal de los grupos de control muestra un epitelio escamoso estratificado con estrato córneo y presencia de un estrato lúcido bien formado. Una inducción significativa de la estratificación del epitelio vaginal e hiperqueratosis se observa en la vagina expuesta tanto a E2 como a KGF (ligeramente más evidente en los grupos tratados con dosis altas), pero no en el grupo tratado solo con el vehículo, en el que la mucosidad vaginal mostraba una reducción significativa del espesor epitelial, en comparación con el grupo de control (aumentos de 20x en comparación con el original).

Figura 8. Cuantificación del efecto *in vivo* de KGF y E2 sobre el epitelio vaginal. (A) Las secciones de tejido procedentes de la vagina de ratones de control, ratones sometidos a ovariectomía y tratados solo con el vehículo, y ratones tratados con dosis bajas y altas de E2 o KGF, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se observó un epitelio vaginal cornificado en las vaginas expuestas tanto a E2 como a KGF, pero no en el grupo tratado con el vehículo (aumentos de 40x en comparación con el original). (B) El número de capas epiteliales, el espesor del epitelio y la relación entre la superficie epitelial y la longitud de la membrana basal se calcularon para cada tratamiento. Resumiendo, se trataron tres animales por cada grupo y se capturaron tres imágenes para cada animal. Los valores promedio se obtuvieron a partir de cinco mediciones de cada imagen. Las barras verticales representan los errores estándar.

Figura 9. Evaluación de la proliferación basal del epitelio vaginal después del tratamiento con KGF y E2. (A) Secciones del epitelio vaginal se sometieron a inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-PCNA con el fin de identificar la proliferación del estrato basal. Las secciones se tiñeron mediante colorante de contraste con hematoxilina. Se muestran secciones representativas de cada grupo de tratamiento (aumentos de 20x en comparación con el original). (B) Las secciones de tejido se sometieron a procedimientos de tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Se muestran

secciones de tejido representativas para cada grupo de tratamiento (aumentos de 10x en comparación con el original). Un área significativa en cada panel está indicada por un cuadrado y una ampliación de esta área se muestra en el panel superpuesto (aumentos de 40x en comparación con el original). Las flechas indican células positivas para PAS.

5 Ejemplos

Materiales y métodos

Cultivos celulares y tratamientos

La línea celular de adenocarcinoma de mama humana MCF-7 positiva para receptores de estrógenos α , adquirida a partir de la American Type Culture Collection (n° HTB-22, ATCC-LGC Promochem, Teddington, Reino Unido), se cultivó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; Invitrogen) y antibióticos. Se establecieron cultivos primarios de queratinocitos sensibles a estrógenos humanos (KCs) a partir de biopsias de la mucosa del vestíbulo vaginal de 1 cm² de espesor total. Después de la disociación enzimática, los queratinocitos se sembraron en placas de cultivo recubiertas con colágeno IV (10 mg/ml), como se ha descrito anteriormente [Panici et al., 2007], y se mantuvieron en medio basal de queratinocitos (KBM, Lonza) complementado con partes alícuotas de KGM (Lonza), con un cambio de medio dos veces por semana. Para todos los experimentos con estradiol 17 β (E2) y tamoxifeno, las células MCF-7 se cultivaron en DMEM sin rojo de fenol con 10% de FBS tratado con dextrano/carbón (Invitrogen), y las KCs se transfirieron a un medio con esteroides de concentración reducida (KGM sin EGF y BPE). Tanto MCF-7 como KC fueron privadas de suero durante 4 horas y después se trataron durante 48 h con KGF recombinante humano (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), E2 (Sigma-Aldrich, Milán, Italia), tamoxifeno (Sigma-Aldrich, 100 nM) o combinaciones de los mismos.

RT-PCR cuantitativa

Las células se recogieron y el ARN total se extrajo con el uso de reactivo TRIzol (Invitrogen). Se generó ADNc con oligo (dT) a partir de 1 μ g de ARN, usando el kit de transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen). Después de la transcripción inversa, la abundancia de KGFR en las células MCF-7 tratadas y no tratadas con E2 se cuantificó mediante Q-RT-PCR. Para el KGFR, se desarrollaron ensayos TaqMan[®] personalizados específicos (Applied Biosystems de Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) (KGFR "directo", 5'-GGCTCTGTTC AATGTGACCGA-3' SEQ ID NO 4; KGFR "inverso", 5'-GTTGGCCTGCCCTATATAATTGGA-3' SEQ ID NO. 5. Sonda TaqMan, 5'-TTCCCCAGCATCCGCC-3' SEQ ID NO. 6), utilizados con una concentración de 1x por pocillo. Se añadió un total de 2 μ l/pocillo de la placa a los pocillos de la muestra junto con una mezcla maestra de Taqman Universal PCR, con una concentración de 1x y agua hasta un volumen de 25 μ l/pocillo. Los ensayos se realizaron por triplicado en un aparato ABI 7500 en tiempo real (Applied Biosystems) usando las siguientes condiciones: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, y luego 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min, repetido 40 veces. La cuantificación relativa se realizó usando ARNm 18s como control endógeno. Los datos se expresaron como un aumento del ARNm de KGFR en comparación con el control.

Microscopía de inmunofluorescencia

Las células, cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio, se trataron como se ha descrito anteriormente, después se fijaron en 4% de paraformaldehído en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 min a 25°C, seguido de tratamiento con glicina 0,1 M en PBS durante 20 min a 25°C y con 0,1% de Triton X-100 en PBS durante 5 min adicionales a 25°C para permitir la permeabilización. Para evaluar la proliferación celular, las células se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-Ki67 de conejo (1:50 en PBS; Zymed Laboratories, San Francisco, CA), que identifica las células en división. El anticuerpo primario se visualizó usando IgG de cabra anti-conejo conjugada con rojo de Texas (1:100 en PBS; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Los núcleos se visualizaron usando diclorhidrato de 4',6-diamido-2-fenilindol (DAPI) (1:10000 en PBS; Sigma-Aldrich). Las señales fluorescentes se analizaron recogiendo imágenes teñidas, empleando una cámara digital de color CCD con refrigeración SPOT-2 (Diagnostic Instruments Incorporated, Sterling Heights, MI) y un programa informático Axiovision (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemania).

El porcentaje de células positivas para Ki67 se evaluó mediante un recuento, para cada tratamiento, de un total de 500 células, tomadas al azar a partir de diez campos microscópicos en tres experimentos diferentes, expresado como valor medio $\pm$ 95% de CI y se registró en forma de gráfico. Para los experimentos relativos a la localización de ER α , el citoesqueleto de actina se visualizó usando TRITC faloidina (1:100 en PBS) y ER α se visualizó usando un anticuerpo monoclonal anti-ER α (Santa Cruz) (1:100 en PBS). Las imágenes teñidas individuales y combinadas se capturaron utilizando Zeiss Apotome[®] y el programa informático AxioVision (Carl Zeiss, Jena, Alemania) usando lentes de 40x.

55 Ensayo de supervivencia celular

Para evaluar la citotoxicidad de las células tratadas con tamoxifeno, las células MCF-7 se trataron como se ha descrito anteriormente, se fijaron durante 10 min en una solución de 10% de ácido acético - 10% de metanol, se tiñeron

con cristal violeta (1% p/v) y se fotografiaron usando una cámara digital Power Shot G5 (Canon, Inc., Tokio, Japón).

Análisis de transferencia de tipo Western

Las células MCF-7 no tratadas o tratadas con KGF o E2, se lisaron en tampón RIPA. Las proteínas totales (50-150 µg) se descompusieron en condiciones reductoras en 7%-10% de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas Im-mobilon-FL (Millipore, Billerica, MA). Las membranas se bloquearon en TBS que contenía 0,5% de Tween 20 (TBS-T) y 5% de leche durante 1 hora a 25°C y después se lavaron dos veces durante 20 minutos en cada caso en TBS-T. Las membranas se incubaron durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios utilizados eran los siguientes: antifosfo-p44/42 MAPK, antifosfo-Akt, anti-Akt, antifosfo-p38, anti-p38, antifosfo-ERα (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, EE.UU.), anti ERK2, anti-Bek (C-17), anti-ERα, anti-lamina B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-tubulina (Sigma-Aldrich). Las membranas se incubaron a continuación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a 25°C. El anticuerpo unido se detectó mediante reactivos de detección con quimioluminiscencia potenciada (Pierce Biotechnology, Inc, Rockford, IL, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. La tubulina se controló con el fin de normalizar. El análisis densitométrico se realizó utilizando Quantity One Program (Bio-Rad Laboratories srl, Segrate, MI, Italia).

Fraccionamiento subcelular

Las células se recogieron en PBS y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos para obtener un sedimento, se resuspendieron en tampón de lisis celular que contenía Hepes 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM pH 8, 0,2% de TritonX100, sacarosa 500 mM e inhibidores de la proteasa, se agitaron y se colocaron sobre hielo durante 15 min. Después de centrifugar a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C, el material sobrenadante representaba la fracción citoplásmica. Después, el sedimento se lavó dos veces con un tampón de lavado de núcleos que contenía Hepes 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM pH 8 y 25% de glicerol. Se obtuvo la fracción de proteína nuclear después de centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a 4°C e incubar el sedimento durante 15 min a 4°C con un tampón que contenía Hepes 10 mM pH 8, NaCl 350 mM, EDTA 0,1 mM pH 8 y 25% de glicerol. La eficacia del fraccionamiento se analizó mediante una inmunotransferencia empleando un anticuerpo anti-β-tubulina como marcador citoplásmico y un anticuerpo anti-lamina B como marcador nuclear.

Transfección celular y ensayo informador de luciferasa

Las células MCF-7 se sembraron sobre placas de 24 pocillos con una densidad de células/pocillo de 2×10^5 y se cotransfectaron con 1 µg de la estructura artificial 3x ERE TATA LUC, un plásmido que contenía el gen informador para la luciferasa de luciérnaga bajo el control de tres secuencias de ADN a las que se une ER, denominadas elementos de respuesta a estrógenos (EREs) (Addgene), y con 300 ng de plásmido de control pRL-TK (luciferasa de Renilla) para la normalización de la eficacia del proceso de transfección. Las transfecciones se realizaron usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Después de 6 h, las células se trataron con KGF o E2. Se determinó la actividad de la luciferasa usando un sistema de ensayo de informador de luciferasa dual (Promega), 24 h después del tratamiento, según el protocolo del fabricante. Todas las transfecciones se realizaron por triplicado.

Estudios reológicos de Pluronic F127

Pluronic F127 (PEO₁₀₀-PPO₆₅-PEO₁₀₀) (PM ≈ 12600) (cat. P2443, Sigma Aldrich, Milán, Italia), un polímero sintético anfifílico formado a partir de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno), cuando se disuelve en agua a altas concentraciones (>15%), tiene la característica de volverse líquido a temperaturas menores de 25°C y adquiere la consistencia de un hidrogel a temperaturas más altas. Para demostrar la transición de solución a gel que se produce con el aumento de la temperatura, un estudio reológico de una solución de F127 (cP = 20% p/v en H₂O) se llevó a cabo, calentando la solución con una tasa de 1°C/min desde 10 a 40°C y midiendo, durante ese aumento de la temperatura, el valor de G' (módulo de elasticidad) y el valor de G'' (módulo de pérdida): estos parámetros describen, respectivamente, la capacidad para acumular y disipar la energía y describen la naturaleza elástica o viscosa de un material. Específicamente, una sustancia en estado líquido se caracteriza por valores de G'' mayores que los valores de G' y, vice versa, una sustancia en forma de gel tiene valores de G'' menores que los valores de G'.

Ensayo de liberación *in vitro* de Pluronic F127

Para el ensayo de liberación *in vitro*, se utilizaron dos moléculas como modelo: mioglobina, una proteína hidrófila con PM comparable al de KGF, y prednisolona, una hormona lipofílica caracterizada por una estructura química similar a la de E2. Se introdujeron 2 ml de hidrogel cargado que contenía 4 mg de mioglobina o prednisolona en una solución de 20% de Pluronic F127 p/v, en una bolsa de membrana de diálisis (MWCO 3500 Da), y la bolsa de diálisis sellada en el extremo se incubó en 60 ml de medio de liberación (agua destilada) a 37°C y se agitó con una tasa de 50 rpm. Las condiciones de saturación se evitaron por medio de una sustitución frecuente del agua de nuevo aporte. A intervalos predeterminados, se retiraron partes alícuotas de 0,5 ml de medio de liberación y se sustituyeron por un volumen igual de solución de nuevo aporte. El comportamiento de liberación *in vitro* del hidrogel cargado con mioglobina se comparó con el del hidrogel cargado con prednisolona. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los perfiles de liberación se expresaron en porcentajes de liberación acumulada a lo largo del tiempo.

Animales

La cepa de ratón CD1 se utilizó en este estudio (Charles Rivers). Los ratones se mantuvieron en un alojamiento convencional para animales de laboratorio con iluminación controlada (12 h/día) y temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) y se les proporcionó comida y agua a voluntad. Todos los protocolos experimentales relativos a los animales estaban de acuerdo con las directrices de la Universidad Sapienza para el cuidado y el uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité de Ética de la institución mencionada anteriormente. Cuarenta ratones hembra se sometieron a ovariectomía con el fin de inducir una atrofia vaginal y se les administró una dieta de Altromin C1000 sin fitoestrógenos (Altromin, Lage, Alemania) durante el periodo de duración de los experimentos. Después de 30 días, los ratones fueron tratados a nivel local, introduciendo diariamente en el canal vaginal 25 μl de hidrogel cargado con KGF (10 o 30 ng/día) o con E2 (30 ng/día o 1 μg /día). Un grupo de control se trató solo con hidrogel. Después de 60 días de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y las vaginas se explantaron inmediatamente, se fijaron en formalina y se procesaron para un análisis histológico.

Histología

Las secciones en serie de la mucosidad vaginal obtenidas a partir de cuatro grupos de ratones, se tiñeron con hematoxilina/eosina, se colocaron permanentemente bajo una placa de vidrio y se analizaron histológicamente. El grosor y los estratos de las células epiteliales de la vagina se determinaron después en tres animales para cada grupo, en tres imágenes para cada animal (aumentos de 10x). Los valores medios se obtuvieron a partir de cinco mediciones de cada imagen. Con el fin de cuantificar el espesor del epitelio vaginal, se midió la distancia vertical entre la superficie inferior de las células en el estrato basal y la superficie apical de las células en el estrato superficial con la ayuda de NIH Image J v 1.56 (National Institutes of Health, Bethesda, MD), y se indicó como el grosor. Para estimar el número de capas epiteliales vaginales, la capa de células que cubría cinco células basales contiguas se contó en la muestra.

Inmunohistoquímica

Se analizaron secciones en serie de la mucosidad vaginal, obtenidas a partir de los cuatro grupos de ratones para estudiar la expresión de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen, un marcador de la proliferación celular) por medio de inmunohistoquímica. Las secciones se elaboraron utilizando la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa (DAKO, Glostrup, Dinamarca) y se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-A-rata-PCNA (clon P10, 1:4000) (Abcam, Cambridge, Reino Unido), el cual reconoce las células proliferantes.

Ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA)

Las concentraciones de E2 y KGF en el suero de los ratones tratados, se midieron usando un kit de ELISA convencional (R & D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). La sensibilidad del ensayo ELISA era $\geq 10 \text{ pg/mL}$. Se emplearon preparaciones convencionales de E2 o KGF como controles internos. Los valores se presentan como media $\pm$ desviación estándar.

Análisis estadístico

Cada serie de experimentos se repitió al menos por triplicado, y se calcularon los valores de la desviación estándar. Se utilizó la prueba t de Student para el análisis estadístico, y los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Comparación de la eficacia de KGF y E2 en la inducción de la proliferación *in vitro* del epitelio vaginal

Con el fin de verificar la posibilidad de utilizar KGF como un medio terapéutico alternativo en comparación con la administración de estrógenos, los autores compararon primero el efecto de KGF y E2 sobre un epitelio vaginal reconstruido *in vitro* a partir de una biopsia del vestíbulo vaginal. La posibilidad de reconstruir tiras de mucosidad vaginal *in vitro* proviene de la experiencia, consolidada ahora por los autores, en reconstruir una neovagina autóloga en pacientes que padecen el síndrome de Mayer Rokitansky Kuster Hauser (MRKHS) (Panici et al., 2007). Para el estudio, se inscribieron 20 pacientes premenopáusicas y 16 pacientes posmenopáusicas que habían sido sometidas a cirugía debido a enfermedades no relacionadas, a partir de las cuales los autores fueron capaces de tomar muestras, después de un consentimiento fundamentado previo, de las biopsias de la mucosa vaginal, a partir de las cuales se obtuvieron cultivos de células primarias. Para cada paciente, los autores sometieron el cultivo de la mucosidad vaginal obtenido *in vitro* a un tratamiento con diversas dosis de E2, KGF o una combinación de los dos, con el objetivo de comparar sus efectos en términos de proliferación celular (evaluada mediante técnicas de inmunofluorescencia), determinación del porcentaje de células positivas para el antígeno Ki67, un marcador de células en división. La capacidad proliferativa de KGF y la de E2 se compararon mediante la producción de una curva de dosis-respuesta (Figura 1A). Los resultados obtenidos indicaron una eficacia ligeramente mayor, en términos de proliferación celular, de E2 (incremento de 1,2 veces), en comparación con el KGF, pero solo a dosis bajas (0,5 ng/ml). A las dosis utilizadas comúnmente en la bibliografía (20 ng/ml para KGF y 2,7 ng/ml para E2), el efecto proliferativo de KGF era absolutamente comparable al de la hormona. Los datos obtenidos a partir de los dos grupos de pacientes (premeno-

páusicas y posmenopáusicas) se analizaron por separado para determinar cualquier diferencia en la eficacia del tratamiento con E2 o KGF. A pesar de una diferencia en los niveles basales de proliferación (mayores en las células de pacientes jóvenes y más bajos en las de pacientes posmenopáusicas), los resultados indican que en ambas poblaciones, el KGF era capaz de estimular la proliferación del epitelio vaginal de una manera comparable a la del estradiol (Figura 1B).

En otra serie de experimentos, se analizó el efecto combinado de ambos factores, KGF y E2, pero no se demostró ningún efecto sinérgico o aditivo (Figura 1C).

Al mismo tiempo, las células de la mucosa vaginal de ambos grupos se sometieron a un pretratamiento con tamoxifeno con el fin de verificar el efecto de este fármaco quimioterapéutico sobre la proliferación inducida por KGF o los estrógenos. Los datos obtenidos, tanto a través de inmunofluorescencia con anti-Ki67 como a través de una tinción de las células vivas con cristal violeta, demostraron que mientras que el efecto proliferativo de E2 está inhibido por la presencia de tamoxifeno, KGF es capaz de estimular la proliferación celular, incluso en presencia de tamoxifeno (Figura 1D). Una evidencia de este tipo sugiere que KGF podría ser eficaz en el tratamiento de trastornos posmenopáusicos incluso en pacientes oncológicos sometidos a quimioterapia con tamoxifeno con el fin de tratar tumores sensibles al estrógeno, lo que implica en esos pacientes una ineficacia del tratamiento local con estrógenos.

Análisis de la interacción entre la transducción de la señal activada por E2 y KGF

Indicaciones de la existencia de una interacción entre la ruta de señalización del receptor de estrógenos y la de la receptor de tirosina cinasa ya se obtuvieron para EGF/EGFR y para IGF-IR. Por tanto, los autores han analizado en un modelo celular representado por la línea celular de carcinoma de mama MCF-7 que expresa tanto KGFR como el receptor de estrógenos ER alfa, la interacción potencial entre la ruta de señalización activada por los estrógenos y la ruta de señalización mediada por la unión de KGF/KGFR. Se sabe que los estrógenos son reguladores del crecimiento y la diferenciación en una amplia gama de tejidos diana, incluyendo los órganos reproductivos, la glándula mamaria, el sistema nervioso, el sistema cardiovascular y el sistema esquelético. Estos también están implicados en muchos procesos patológicos, en particular, tumores de mama y tumores endometriales. Los efectos biológicos de los estrógenos están mediados principalmente por la unión y la activación de ER α , ER beta y el receptor GPER. ER α y ERb regulan la transcripción, interactuando con los elementos de respuesta a estrógenos (EREs) localizados dentro del promotor de los genes diana. Además de esta ruta definida como "genómica" o ruta clásica, ha habido una creciente prueba en los últimos años de que las respuestas biológicas frente a los estrógenos pueden estar mediadas por señales iniciadas a nivel de membrana, lo que desencadena una transducción intracelular rápida, activando la ruta de señalización tal como la de MAPK o PI3K/Akt. Tales señales se denominan rutas "no genómicas" del ER. En particular, esta ruta es responsable de los efectos rápidos inducidos por estrógenos, incluyendo la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la estimulación de la transcripción del gen de IGF-IR.

Para comprobar el nivel de activación de las rutas de señalización implicadas en la ruta no genómica en relación con E2 y KGF, los autores investigaron la activación de MAPK ERK1 y 2 en células MCF-7, en donde demostraron la activación coherente y constante de MAPK inducida por KGF después de 5 y 30 minutos de tratamiento. Por el contrario, después del tratamiento con E2, se observó un aumento menos consistente de los niveles de fosforilación de ERK1 y 2, limitado a 5 min de tratamiento, mientras que la activación de ERK 1 y 2 se redujo considerablemente con tiempos más largos (30 min, Figura 2A). Por tanto, los autores procedieron a analizar la activación de otra ruta de estrógenos no genómica - la de p38. También en este caso, parece que ambos tratamientos eran capaces de fosforilar la proteína p38 (Figura 2B). A continuación, los autores llevaron a cabo experimentos dirigidos a una mejora de la activación de la ruta PI3K/Akt después del tratamiento con KGF o E2, con el fin de verificar si esta ruta también se activa con ambos factores y por lo tanto puede representar un punto de contacto adicional entre la ruta de los estrógenos y la de KGFR. Para este fin, se analizó la fosforilación de Akt. Los resultados obtenidos demostraron un efecto similar de KGF y E2 en la activación de Akt (Figura 2C). Esto confirma que la interacción entre las dos rutas se produce aguas arriba de la activación de estas tres rutas de señalización y parece sugerir una colaboración entre las dos señales en la membrana plasmática.

Los análisis de la activación independiente de ligando, del receptor de estrógenos después del tratamiento con KGF, por medio de una transferencia de tipo Western con anticuerpos específicos capaces de reconocer la forma activa del receptor (fosforilado en Ser118), también han demostrado que KGF es capaz de inducir, al igual que E2, la fosforilación de ER alfa, lo que confirma un papel directo de KGF en la ruta no genómica de los estrógenos (Figura 2D).

Al mismo tiempo, como el estudio de la ruta de transducción de la señal, un análisis de los niveles de expresión del receptor KGFR en las células MCF-7 tratadas con E2, también se llevó a cabo. Los resultados obtenidos por medio de una transferencia de tipo Western indican claramente un aumento de la proteína KGFR determinada a partir del tratamiento con E2 (Figura 3A). El análisis del ARNm celular llevado a cabo por medio de PCR en tiempo real muestra también una regulación al alza de la expresión de KGFR después del tratamiento con E2 (incremento de 2,2 veces) (Figura 3B), el cual, dado el papel de KGF/KGFR en la activación de la ruta no genómica de ER, podría representar un mecanismo importante para incrementar el efecto de los estrógenos sobre el tejido epitelial.

La ruta genómica, por el contrario asegura que ERalfa, una vez activado por su ligando E2, se traslada al núcleo, en donde se estimula la transcripción de sus genes diana por medio de la unión a secuencias ERE. Para verificar si

KGF también estimula la ruta genómica de los estrógenos, los autores llevaron a cabo experimentos de fraccionamiento nucleocitoplásmico sobre lisados de células MCF-7 tratadas con E2 o KGF en diversos tiempos, seguidos de transferencia de tipo Western con anticuerpos anti-ER en ambas fracciones. La pureza de las dos fracciones se comprobó utilizando como control una proteína expresada exclusivamente en el citoplasma (tubulina) y una proteína expresada en el núcleo (lamina B). Los resultados demostraron que, en ausencia de tratamiento, ER se distribuye de manera uniforme en las dos fracciones, mientras que después del tratamiento con E2, incluso después de 5 minutos, hay una redistribución notable de ER en el núcleo, con una reducción considerable de su cantidad en la fracción citoplásmica. El tratamiento con KGF por el contrario, con las mismas dosis y en los mismos tiempos, no parece ser capaz de inducir ninguna redistribución significativa del receptor en el núcleo (Figura 4A). Para entender mejor estos resultados y verificar la localización efectiva del ER después del tratamiento con KGF, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia con un anticuerpo específico. El análisis se llevó a cabo por medio de microscopía de fluorescencia con el módulo Apotome, con el fin de obtener secciones ópticas y con el fin de identificar la localización de señales adicionales. En particular, el análisis, llevado a cabo marcando el citoesqueleto celular con faloidina-TRITC, el núcleo con DAPI y el ER con un anticuerpo específico seguido de un anticuerpo secundario FITC, ha hecho posible demostrar el movimiento de ER en el núcleo después de un tratamiento con E2 (confirmando los datos de fraccionamiento nucleocitoplásmico), pero también identificar una localización inesperada de ER sobre la membrana plasmática después del tratamiento con KGF (Figura 4B).

Se postula un contacto directo entre KGFR y ER en la membrana plasmática, mediado por KGF. Por lo tanto, KGF actuaría para conducir ER hacia la ruta no genómica.

Para confirmar que KGF actúa exclusivamente por medio de la ruta no genómica, los autores llevaron a cabo un ensayo de transactivación *in vitro* con un plásmido que contenía una secuencia de tres elementos de respuesta a estrógenos (EREs), secuencias de ADN a las que se une ER, presentes en los genes activados por el tratamiento con estrógenos y unidos al gen de la luciferasa. Este conjunto de experimentos muestra que solo E2, y no KGF, es capaz de determinar la activación de una construcción de este tipo, lo que confirma la ausencia de estimulación de la ruta genómica de los estrógenos por parte de KGF (Figura 5).

Todas las indicaciones obtenidas con respecto a los modelos *in vitro* han apoyado por lo tanto la hipótesis inicial de un uso de KGF como alternativa a la terapia hormonal. De hecho, KGF es tan activo como E2 en la estimulación de la proliferación del epitelio vaginal y, además, no pierde su eficacia en el caso de un tratamiento conjunto con tamoxifeno. Finalmente no estimula la ruta genómica de los estrógenos, que es la principal causa de los efectos sistémicos del tratamiento con E2, principalmente el aumento de la incidencia de tumores de mama y de endometrio.

Análisis del efecto de E2 y KGF en un modelo animal de ratones sometidos a ovariectomía

Los resultados obtenidos *in vitro* se transfirieron entonces *in vivo* mediante un estudio realizado en un modelo animal, en el que se evaluó el efecto de la administración local de KGF sobre la atrofia vaginal. El protocolo, que contó con la aprobación del Ministerio de Trabajo, Salud y Política Social, Dep. de Salud Pública y Veterinaria, Nutrición y Seguridad de Dietas, Dirección General de Salud Animal y Medicación Veterinaria, después de la presentación del proyecto de investigación para el uso de animales en experimentos de conformidad con el Decreto Legislativo 116/02, se llevó a cabo en una cepa CD1 base de ratones de sexo femenino. Con este fin, 10 ratones hembra sin tratar de dos meses de edad, en edad fértil, se compararon con 40 ratones hembra de la misma cepa y a una edad en la que se habían sometido a una ovariectomía (Figura 6A).

Treinta días después de la ovariectomía, se midieron los valores de E2 circulante para verificar que habían disminuido en gran medida en los 40 ratones ovariectomizados. Todos los animales incluidos en el estudio fueron alimentados con una dieta especial desprovista de estrógenos (Altromin C1000 especial, dieta exenta de fitoestrógenos). Los ratones sometidos a una ovariectomía se dividieron entonces en grupos de 8: un grupo no recibió ningún tratamiento; un grupo recibió solo el vehículo; un grupo recibió el vehículo + 30 ng/día de E2; un grupo recibió el vehículo + 1 µg/día de E2; un grupo recibió el vehículo + 10 ng/día de KGF; y un grupo recibió el vehículo + 30 ng/día de KGF.

Evaluación de la eficacia del vehículo utilizado

Con el objetivo de obtener un único vehículo que permita la liberación de KGF y de E2, la matriz seleccionada para el estudio fue Pluronic F127, un polímero de bloques sintético anfifílico, formado a partir de 2 bloques de poli(óxido de etileno) (PEO) separados por un bloque de óxido de propileno (PPO). Este polímero parecía adaptarse perfectamente al objetivo ya que es capaz de liberar dos sustancias diferentes: una proteína hidrófila (KGF) y una hormona lipófila (E2). El polímero, que ya se utiliza ampliamente en el campo biomédico (curación de heridas, ingeniería de tejidos, anti-adhesivo en un contexto quirúrgico) gracias a su biocompatibilidad, solubilizado en agua a concentraciones elevadas ($c \geq 15\%$ p/v), tiene la densidad de un líquido a baja temperatura, por lo que es posible diluir homogéneamente las sustancias que se utilizan en los tratamientos, pero asume la densidad de un hidrogel a mayores temperaturas ($T > 25^\circ\text{C}$), lo que permite una aplicación local. Antes de utilizar esta sustancia, los autores llevaron a cabo un estudio comparativo para comprobar que el efecto de transporte de E2 y KGF, así como sus cinéticas de liberación en un tratamiento *in vivo* en las vaginas de ratones, era comparable.

Para demostrar la transición solución-gel que se produce con el aumento de la temperatura, los autores realizaron

un estudio reológico de una solución de Pluronic F127 (20% peso/volumen en H₂O), calentando la solución con una tasa de 2°C/min de 10 a 40°C y midiendo, durante este aumento de la temperatura, el valor de G' (módulo de elasticidad) y el valor de G'' (módulo de pérdida): estos parámetros describen, respectivamente, la capacidad de acumular y disipar la energía y, por lo tanto, la naturaleza elástica o viscosa de un material. Específicamente, una sustancia en estado líquido se caracteriza por valores de G'' mayores que los valores de G' y, viceversa, una sustancia en estado de gel tiene valores de G'' inferiores a los valores de G' (Figura 6B). La muestra de F127 al 20% es una solución a una T de menos de 25°C; entre 25 y 28°C hay una transición del material, el cual poco a poco se vuelve más elástico, antes de convertirse en un hidrogel a una temperatura mayor que 28°C. Por tanto, es posible almacenar la solución de polímero en un refrigerador, tomar muestras cómodamente utilizando una pipeta y a continuación, aplicarla *in situ*, en donde se convierte inmediatamente en un gel a la temperatura corporal.

Para comparar las cinéticas de liberación de ambas moléculas (KGF y E2), se utilizaron dos moléculas modelo: mioglobina (MGB), una proteína hidrófila de PM comparable al KGF (PMMGB = 16700, PMKGF = 19000) y prednisolona, una hormona lipófila caracterizada por una estructura química similar al estradiol (Figura 6C). Los hidrogeles cargados se prepararon mediante una solubilización a baja temperatura, en un vial de 5 ml, de una cantidad exacta de molécula modelo (aproximadamente 4-5 mg) en 2 ml de solución de F127 al 20% p/v; a continuación, la solución se llevó al estado de hidrogel colocando el vial herméticamente cerrado a 37°C. El vial, cerrado en la parte superior con una malla perforada, se introdujo después en el medio de liberación (60 ml de H₂O bidestilada, T = 37°C) y se mantuvo con agitación constante y suave. La liberación se produjo por lo tanto, por medio de una difusión desde la superficie superior del gel al medio de disolución. Periódicamente, se retiraron partes alícuotas del medio (V = 2 ml) y se sustituyeron por un volumen igual de H₂O. Los datos de la liberación tuvieron en cuenta estos efectos de la dilución. La liberación fue casi idéntica para las dos moléculas diferentes; esto se indica por el hecho de que Pluronic permite la misma tipología de liberación para moléculas lipófilas que para moléculas hidrófilas (Figura 6D). La liberación de las moléculas modelo también era casi total al cabo de un período de 24 horas.

Después de un tratamiento diario durante 60 días, los animales fueron sacrificados con el fin de evaluar el trofismo del epitelio vaginal después del tratamiento. Al final del tratamiento, se tomaron muestras de sangre de todos los animales con el fin de evaluar los niveles séricos de E2 y KGF. La determinación mediante un ensayo ELISA hizo posible verificar que KGF, que no pasaba a través de la barrera de la membrana celular, no se liberaba en el torrente sanguíneo, en contraposición a E2, que alcanzaba el torrente sanguíneo incluso después de un tratamiento con dosis bajas (Figura 7A).

Los animales fueron sacrificados y las vaginas se retiraron y se fijaron inmediatamente en formalina y se procesaron para la histología. El epitelio vaginal de los ratones tratados se analizó histológicamente por medio de hematoxilina/eosina y se comparó con el epitelio del grupo de ratones que no se había sometido a ovariectomía (Figuras 7B y 8A). Los criterios adoptados con el fin de determinar el trofismo de la mucosa vaginal eran el espesor (evidenciado mediante el recuento del número de capas epiteliales presentes y midiendo el espesor del epitelio en µm y también por medio de la relación entre el área de la capa epitelial y la longitud de la membrana basal) (Figura 8B) y la capacidad proliferativa de los queratinocitos (determinada por medio de análisis de la expresión de PCNA, un marcador de la proliferación celular) (Figura 9).

En conclusión, KGF es muy eficaz tanto *in vitro* como *in vivo* en la estimulación de la proliferación del epitelio vaginal. Por tanto, los autores creen que KGF representa una nueva estrategia terapéutica posible en el tratamiento de la atrofia vaginal posmenopáusica que todavía proporciona un nivel de eficacia igual al de los tratamientos hormonales actualmente en uso, pero con menores riesgos asociados con tales tratamientos.

Referencias bibliográficas

1. Pandit L, Ouslander JG 1997, Am J Med Sci 314:228-231
2. Rossin-Amar B 2000, Gynecol Obstet Fertil 28:245-249
3. Santoro N, Komi J 2009, J Sex Med 6:2133-2142
4. Farage M, Maibach H 2006, Arch Gynecol Obstet 273:195-202
5. Keys HM, et al., 2004, Gynecol Oncol 92:744-751
6. Scholten AN, et al., 2005, Int J Radiat Oncol Biol Phys 63:834-838
7. Lee CM, et al., 2006, JAMA 295:389-397
8. Dickler A, et al., 2010, Radiat Oncol 5:67
9. Grodstein F, et al., 2004, Obstet Gynecol 103:254-260
10. Hendrix SL, et al., 2005, JAMA 293:935-948
11. Colditz GA, et al., 1995, N Engl J Med 332:1589-1593

12. Ross RK, et al., 2000, J Natl Cancer Inst 92:328-332
13. Chlebowski RT, et al., 2010, JAMA 304:1684-1692
14. Trabert B, et al., 2013, Int J Cancer 132:417-426
15. Hall JM, Couse JF, Korach KS 2001, J Biol Chem 276:36869-36872
- 5 16. Porter W, Wang F, Wang W, Duan R, Safe S 1996, Mol Endocrinol 10:1371-1378
17. Paech K, et al., 1997, Science 277:1508-1510
18. Cerillo G, et al., 1998, J Steroid Biochem Mol Biol 67:79-88
19. Coleman KM, Smith CL 2001, Front Biosci 6:D1379-D1391
20. Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM 1996, Endocrinology 137:2163-2166
- 10 21. Watters JJ, et al., 1997, Endocrinology 138:4030-4033
22. Singh M 2001, Endocrine 14:407-415
23. Kahlert S, et al., 2000, J Biol Chem 275:18447-18453
24. Shou J, et al., 2004, J Natl Cancer Inst 96:926-935
25. Pancholi S, et al., 2008, Endocr Relat Cancer 15:985-1002
- 15 26. Santen RJ, et al., 2009, Steroids 74:586-594
27. Bartella V, et al., 2012, Cell Signal 24:1515-1521
28. Finch PW, Rubin JS 2004, Adv Cancer Res 91:69-136
29. Zhang X, et al., 2006, J Biol Chem 281:15694-15700
30. Werner S, et al., 1992, Proc Natl Acad Sci U S A 89:6896-6900
- 20 31. Marchese C, et al., 1995, J Exp Med 182:1369-1376
32. Brauchle M, et al., 1996, Am J Pathol 149:521-529
33. Werner S 1998, Cytokine Growth Factor Rev 9:153-165
34. Gomperts BN, et al., 2007, Am J Respir Cell Mol Biol 37:48-56
35. Spielberger R, et al., 2004, N Engl J Med 351:2590-2598
- 25 36. Beaven AW, Shea TC 2007, Support Cancer Ther 4:188-197
37. Brizel DM, et al., 2008, J Clin Oncol 26:2489-2496
38. Barasch A, Epstein J, Tilashalski K 2009, Biologics 3:111-116
39. Masui F, Matsuda M, Mori T 2004, Cell Tissue Res 318:591-598
40. Panici PB, et al., 2007 Hum Reprod 22:2025-2028
- 30 41. Hall JM, McDonnell DP 1999, Endocrinology 140:5566-5578
42. Chambliss KL, et al., 2010, J Clin Invest 120:2319-2330
43. Beral V, et al., 2011, J Natl Cancer Inst 103:296-305
44. Allen NE, et al., 2010, Am J Epidemiol 172:1394-1403
45. Tsilidis KK, et al., 2011, Cancer Causes Control 22:1075-1084.
- 35 46. Trabert B, et al., 2012, Br J Cancer 107:1181-1187
47. Furuhielm M, Karlgren E, Carlström K 1980, Int J Gynaecol Obstet 17:335-339
48. Mattsson LA, Cullberg G, Eriksson O, Knutsson F 1989, Maturitas 11:217-222

49. Willhite LA, O'Connell MB 2001, *Pharmacotherapy* 21:464-480
50. Johnston SL, et al., 2004, *J Obstet Gynaecol Can* 26:503-515
51. Ballagh SA 2005, *Semin Reprod Med* 23:126-140
52. Schiff I, Tulchinsky D, Ryan KJ 1977, *Fertil Steril* 28:1063-1066
- 5 53. Martin PL, Yen SS, Burnier AM, Hermann H 1979, *JAMA* 242:2699-2700
54. Deutsch S, Ossowski R, Benjamin I 1981, *Am J Obstet Gynecol* 139:967-968
55. Mandel FP, et al., 1983, *J Clin Endocrinol Metab* 57:133-139
56. Kendall A, Dowsett M, Folkard E, Smith I 2006 *Ann Oncol* 17:584-587
57. Bakken K, et al., 2011 *Int J Cancer* 128:144-156
- 10 58. Murkies AL, et al., 1995, *Maturitas* 21:189-195
59. Dalais FS, et al., 1998, *Climacteric* 1:124-129
60. Wuttke W, et al., 2002, *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:133-147
61. Nikander E, et al., 2005, *Fertil Steril* 83:137-142
62. Kaari C, et al., 2006, *Maturitas* 53:49-58
- 15 63. Levis S, et al., 2011, *Arch Intern Med* 171:1363-1369
64. Kabanov AV, et al., 2002, *Adv Drug Deliv Rev* 54:223-233
65. Wang QG, Hughes N, Cartmell SH, Kuiper NJ 2010, *Eur Cell Mater* 19:86-95
66. Nie S, Hsiao WL, Pan W, Yang Z 2011, *Int J Nanomedicine* 6:151-166
67. Lee YH, et al., 2012, *Exp Diabetes Res* 2012:504693
- 20 68. Rotolo S, et al., 2008, *PLoS One* 3:e2528
69. Pandini G, et al., 2007, *Cancer Res* 67:8932-8941
70. Ignar-Trowbridge DM, et al., 1993, *Mol Endocrinol* 7:992-998
71. Kato S, et al., 1995, *Science* 270:1491-1494
72. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D 1996, *EMBO J* 15:2174-2183
- 25 73. Harrington WR, et al., 2006, *Mol Endocrinol* 20:491-502
74. Madak-Erdogan Z, et al., 2008, *Mol Endocrinol* 22:2116-2127
75. Dai R, et al., 2008, *Blood* 112:4591-4597
76. Wickramasinghe NS, et al., 2009, *Nucleic Acids Res* 37:2584-2595
77. Murphy AJ, Guyre PM, Pioli PA 2010, *J Immunol* 184:5029-5037
- 30 78. Yu X, et al., 2012 *BMC Cancer* 12:29
79. He YQ, Sheng JQ, Ling XL, Yen L, Rao J 2012 *Exp Mol Med* 44:723-732
80. Xu N, et al., 2011, *J Invest Dermatol* 131:1521-1529
81. Ceccarelli S, et al., 2012, *Expert Opin Ther Targets* 16:377-393.

Listado de Secuencias

<110> Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
 MARCHESE, Cinzia
 ANGELONI, Antonio
 5 CECCARELLI, Simona

<120> Uso de KGF en el tratamiento de trastornos menopáusicos

<130> PCT 121035

<150> RM2012A000404

<151> 09-08-2012

10 <160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 3936

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

agttttaatt gcttccaatg aggtcagcaa aggtatttat cgaaaagccc tgaataaaaag	60
gctcacacac acacacaagc acacacgcgc tcacacacag agagaaaatc cttctgcctg	120
ttgatttatg gaaacaatta tgattctgct ggagaacttt tcagctgaga aatagtttgt	180
agctacagta gaaaggctca agttgcacca ggcagacaac agacatggaa ttcttatata	240
tccagctgtt agcaacaaaa caaaagtcaa atagcaaaca gcgtcacagc aactgaactt	300
actacgaact gtttttatga ggatttatca acagagttat ttaaggagga atcctgtgtt	360
gttatcagga actaaaagga taaggctaac aatttggaag gagcaactac tctttcttaa	420
atcaatctac aattcacaga taggaagagg tcaatgacct aggagtaaca atcaactcaa	480
gattcatttt cattatgtta ttcattgaaca cccggagcac tacactataa tgcacaaatg	540
gatactgaca tggatcctgc caactttgct ctacagatca tgctttcaca ttatctgtct	600
agtgggtact atatcttttag cttgcaatga catgactcca gagcaaatgg ctacaaatgt	660
gaactgttcc agccctgagc gacacacaag aagttatgat tacatggaag gaggggatat	720
aagagtgaga agactcttct gtcgaacaca gtggtacctg aggatcgata aaagaggcaa	780
agtaaaaggg acccaagaga tgaagaataa ttacaatatc atggaaatca ggacagtggc	840
agttggaatt gtggcaatca aaggggtgga aagtgaattc tatcttgcaa tgaacaagga	900
aggaaaactc tatgcaaaga aagaatgcaa tgaagattgt aacttcaaag aactaattct	960
ggaaaaccat tacaacacat atgcatcagc taaatggaca cacaacggag gggaaatgtt	1020
tgttgcctta aatcaaaagg ggattcctgt aagaggaaaa aaaacgaaga aagaacaaaa	1080
aacagcccac tttcttccta tggcaataac ttaattgcat atggtatata aagaaccagt	1140
tccagcaggg agatttcttt aagtggactg ttttctttct tctcaaaatt ttctttcctt	1200

ttatTTTTTTta gtaatcaaga aaggctggaa aactactgaa aaactgatca agctggactt	1260
gtgcattttat gtttgTTTTa agacactgca ttaaagaaag atttgaaaag tatacacaaa	1320
aatcagatttt agtaactaaa gggttgtaaaa aatttgtaaaa ctgggtgtac aatcatgatg	1380
ttagtaacag taatTTTTTT cttaaattaa tttaccctta agagtatgtt agatttgatt	1440
atctgataat gattatttta atattcctat ctgcttataa aatggctgct ataataataa	1500
taatacagat gttgtttatat aaggatatatc agacctacag gcttctggca ggatttgtca	1560
gataatcaag ccacactaac tatggaaaat gagcagcatt ttaaagtctt tctagtgaaa	1620
aattataatc tactttaaact ctaatcagaa aaaaaattct caaaaaaact attatgaaag	1680
tcaataaaat agataattta acaaaagtac aggattagaa catgcttata cctataaata	1740
agaacaaaat ttctaagtct gctcaagtgg aaaggggtatt gctaaaagga tgtttccaaa	1800
aatcttgtat ataagatagc aacagtgtt gatgataata ctgtacttca tcttacttgc	1860
cacaaaataa catttttata atcctcaaag taaaattgag aaatcttta gtttttttca	1920
agtaacataa tctatctttg tataattcat atttgggaat atggctttta ataatgttct	1980
tcccacaaat aatcatgctt ttttcctatg gttacagcat taaactctat ttttaagttgt	2040
ttttgaactt tattgttttg ttatttaagt ttatgttatt tataaaaaaa aaaccttaat	2100
aagctgtatc tgtttcatat gcttttaatt ttaaaggaat aacaaaactg tctggctcaa	2160
cggcaagttt ccctcccttt tctgactgac actaagtcta gcacacagca cttgggccag	2220
caaatcctgg aaggcagaca aaaataagag cctgaagcaa tgcttacaat agatgtctca	2280
cacagaacaa tacaaatatg taaaaaatct ttcaccacat attcttgcca attaattgga	2340
tcatataagt aaaatcatta caaatataag tattttacagg attttaaagt tagaatatat	2400
ttgaatgcat gggtagaaaa tatcatattt taaaactatg tatattttaa tttagtaatt	2460
ttctaattctc tagaaatctc tgctgttcaa aagggtggcag cactgaaagt tgttttcctg	2520
ttagatggca agagcacaat gcccaaaata gaagatgcag ttaagaataa ggggccctga	2580
atgtcatgaa ggcttgaggt cagcctacag ataacaggat tattacaagg atgaatttcc	2640
acttcaaaag tctttcattg gcagatcttg gtagcacttt atatgttcac caatgggagg	2700
tcaatatttta tctaatttta aaggatatgct aaccactgtg gttttaattt caaaatattt	2760
gtcattcaag tccctttaca taaatagtat ttggtaatac atttatagat gagagttata	2820
tgaaaaggct aggtcaacaa aaacaataga ttcatttaat tttcctgtgg ttgacctata	2880
cgaccaggat gtagaaaact agaaagaact gcccttcctc agatatactc ttgggagaga	2940
gcatgaatgg tattctgaac tatcacctga ttcaaggact ttgctagcta ggttttgagg	3000
tcaggcttca gtaactgtag tcttgtgagc atattgaggg cagaggagga cttagttttt	3060

ES 2 657 949 T3

catatgtggtt tccttagtgc ctagcagact atctgttcat aatcagtttt cagtgtgaat 3120
 tcactgaatg tttatagaca aaagaaaata cacactaaaa ctaatcttca ttttaaaagg 3180
 gtaaaacatg actatacaga aatttaaata gaaatagtgt atatacatat aaaatacaag 3240
 ctatgttagg accaaatgct ctttgtctat ggagttatac ttccatcaaa ttacatagca 3300
 atgctgaatt aggcaaaacc aacatttagt ggtaaatcca ttcctggtag tataagtcac 3360
 ctaaaaaaga cttctagaaa tatgtacttt aattatttgt ttttctccta tttttaaatt 3420
 tattatgcaa attttagaaa ataaaatttg ctctagttac acacctttag aattctagaa 3480
 tattaanaact gtaagggggc tccatccctc ttactcattt gtagtctagg aaattgagat 3540
 tttgatacac ctaagggtcac gcagctgggt agatatacag ctgtcacaag agtctagatc 3600
 agttagcaca tgctttctac tcttcgatta ttagtattat tagctaattg tctttggcat 3660
 gtttttggtt tttatttctg ttgagatata gcctttacat ttgtacacaa atgtgactat 3720
 gtcttggaac tgcacttcat acacaatgac taatctatac tgtgatgatt tgactcaaaa 3780
 ggagaaaaga aattatgtag ttttcaattc tgattcctat tcaccttttg tttatgaatg 3840
 gaaagctttg tgcaaaatat acatataagc agagtaagcc ttttaaaaat gttctttgaa 3900
 agataaaatt aaatacatga gtttctaaca attaga 3936

<210> 2
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg
 1 5 10 15

Ser Cys Phe His Ile Ile Cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys
 20 25 30

Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser
 35 40 45

Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile
 50 55 60

Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
 65 70 75 80

Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn
 85 90 95

Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly

ES 2 657 949 T3

	100		105		110												
	Val	Glu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Tyr	
			115					120					125				
	Ala	Lys	Lys	Glu	Cys	Asn	Glu	Asp	Cys	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Ile	Leu	
		130					135					140					
	Glu	Asn	His	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Ala	Ser	Ala	Lys	Trp	Thr	His	Asn	Gly	
	145					150					155					160	
	Gly	Glu	Met	Phe	Val	Ala	Leu	Asn	Gln	Lys	Gly	Ile	Pro	Val	Arg	Gly	
					165					170					175		
	Lys	Lys	Thr	Lys	Lys	Glu	Gln	Lys	Thr	Ala	His	Phe	Leu	Pro	Met	Ala	
				180					185					190			
	Ile	Thr															
	<210>	3															
	<211>	194															
	<212>	PRT															
5	<213>	Homo sapiens															
	<400>	3															
	Met	His	Lys	Trp	Ile	Leu	Thr	Trp	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Leu	Tyr	Arg	
	1				5					10					15		
	Ser	Cys	Phe	His	Ile	Ile	Cys	Leu	Val	Gly	Thr	Ile	Ser	Leu	Ala	Cys	
				20					25					30			
	Asn	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Gln	Met	Ala	Thr	Asn	Val	Asn	Cys	Ser	Ser	
			35					40					45				
	Pro	Glu	Arg	His	Thr	Arg	Ser	Tyr	Asp	Tyr	Met	Glu	Gly	Gly	Asp	Ile	
		50					55					60					
	Arg	Val	Arg	Arg	Leu	Phe	Cys	Arg	Thr	Gln	Trp	Tyr	Leu	Arg	Ile	Asp	
	65				70					75					80		
	Lys	Arg	Gly	Lys	Val	Lys	Gly	Thr	Gln	Glu	Met	Lys	Asn	Asn	Tyr	Asn	
					85					90					95		
	Ile	Met	Glu	Ile	Arg	Thr	Val	Ala	Val	Gly	Ile	Val	Ala	Ile	Lys	Gly	
				100					105					110			
	Val	Glu	Ser	Glu	Phe	Tyr	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Tyr	

ES 2 657 949 T3

	115		120		125
	Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu				
	130		135		140
	Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly				
	145		150		155
	Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly				
		165		170	175
	Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala				
		180		185	190

	Ile Thr	
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
	<400> 4	
	ggctctgttc aatgtgaccg a	21
10	<210> 5	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador sintético	
	<400> 5	
	gttggcctgc cctatataat tgga	24
	<210> 6	
	<211> 16	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
	<400> 6	
25	ttccccagca tccgcc	16

REIVINDICACIONES

1. El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF/FGF7), ortólogos y fragmentos de los mismos para uso en el tratamiento de afecciones seleccionadas a partir de la atrofia vaginal y/o disuria relacionada con la atrofia vaginal, y/o dolor relacionado con la atrofia vaginal y/o sequedad vaginal en donde tales afecciones están inducidas por un tratamiento de quimioterapia en donde dicho ortólogos y fragmentos de los mismos poseen las mismas propiedades terapéuticas que el factor de crecimiento de queratinocitos y en donde la quimioterapia es un compuesto anticancerígeno que pertenece a la familia de inhibidores del receptor de estrógenos selectivos.
2. El factor de crecimiento de queratinocitos, ortólogos y fragmentos de los mismos para uso según la reivindicación 1, en donde el factor de crecimiento de queratinocitos estimula la proliferación del epitelio vaginal.
3. El factor de crecimiento de queratinocitos, ortólogos y fragmentos de los mismos para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el tratamiento comprende una braquiterapia vaginal adyuvante.
4. El factor de crecimiento de queratinocitos, ortólogos y fragmentos de los mismos para uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la quimioterapia es tamoxifeno.
5. Una composición farmacológica que comprende excipientes farmacéuticamente aceptables y un compuesto para uso en el tratamiento de afecciones seleccionadas entre atrofia vaginal, disuria relacionada con la atrofia vaginal, dolor relacionado con la atrofia vaginal y/o sequedad vaginal, en donde tales afecciones están inducidas por un tratamiento de quimioterapia, en donde dicho compuesto se selecciona a partir del grupo que consiste en:
 - el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF/FGF7), ortólogos y fragmentos de los mismos;
 - un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido y
 - una célula hospedadora modificada genéticamente que expresa dicho factor de crecimiento de queratinocitos,en donde dichos ortólogos y fragmentos de los mismos poseen las mismas propiedades terapéuticas que el factor de crecimiento de queratinocitos y en donde la quimioterapia es un compuesto anticancerígeno que pertenece a la familia de inhibidores del receptor de estrógenos selectivos.
6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, para administración tópica.
7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5 o 6, en donde el factor de crecimiento de queratinocitos está en una concentración de 0,1 a 100 µg/ml.
8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, en donde el factor de crecimiento de queratinocitos está en una concentración de 0,1 a 10 µg/ml.
9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en donde el factor de crecimiento de queratinocitos está en una concentración de 5 µg/ml.
10. La composición farmacéutica para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, que comprende adicionalmente un agente gelificante.
11. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10, en la que el agente gelificante es Pluronic F127.

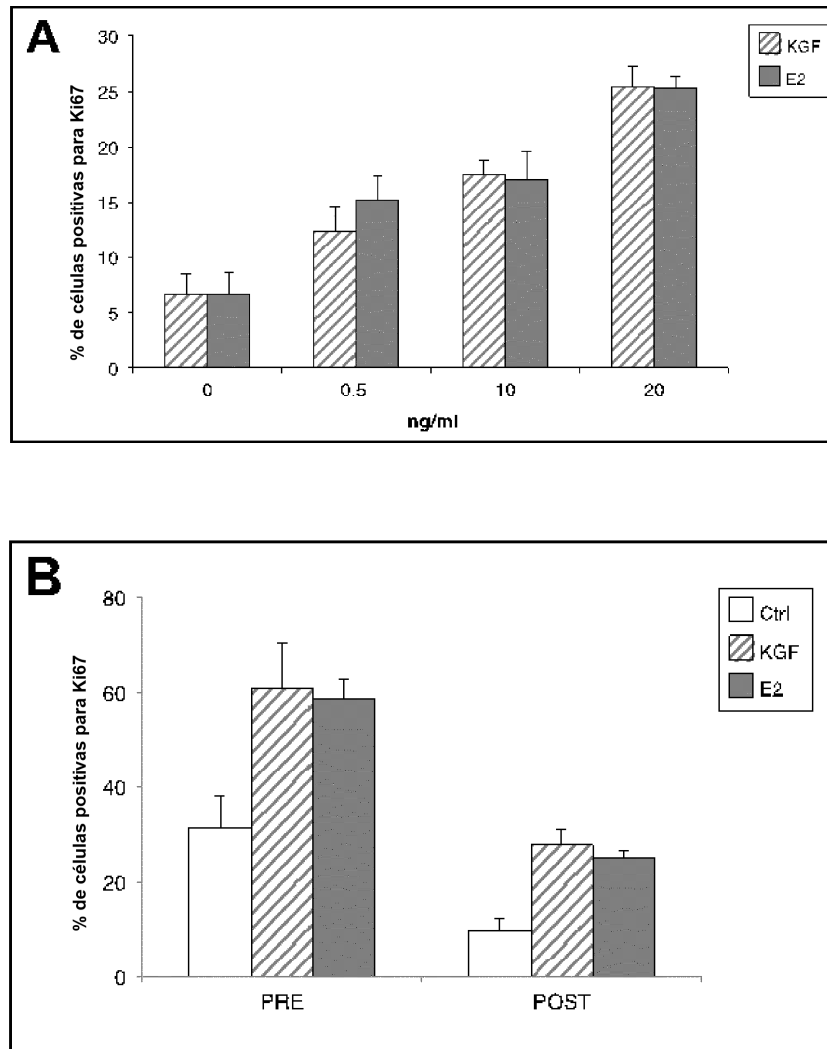


Fig. 1 (1/2)

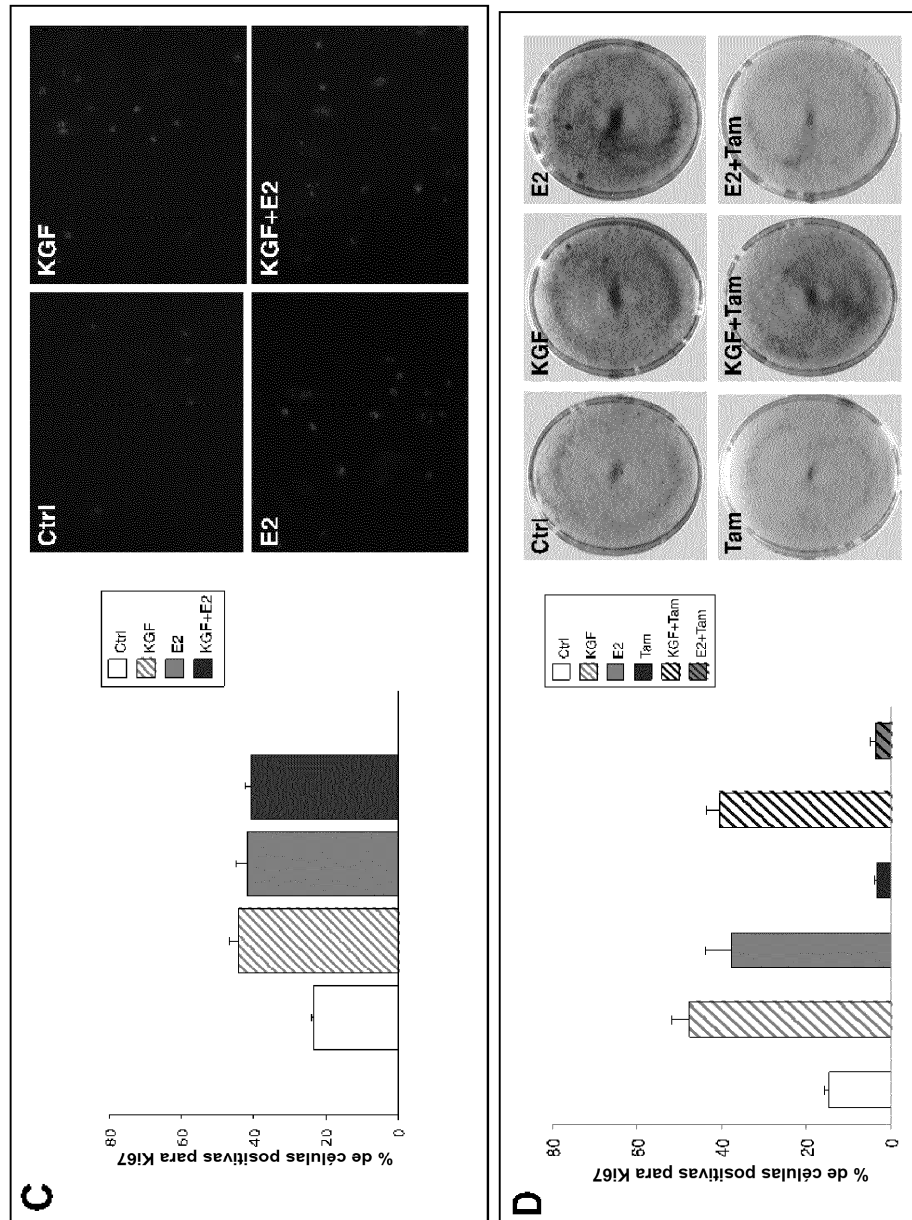


Fig. 1 (2/2)

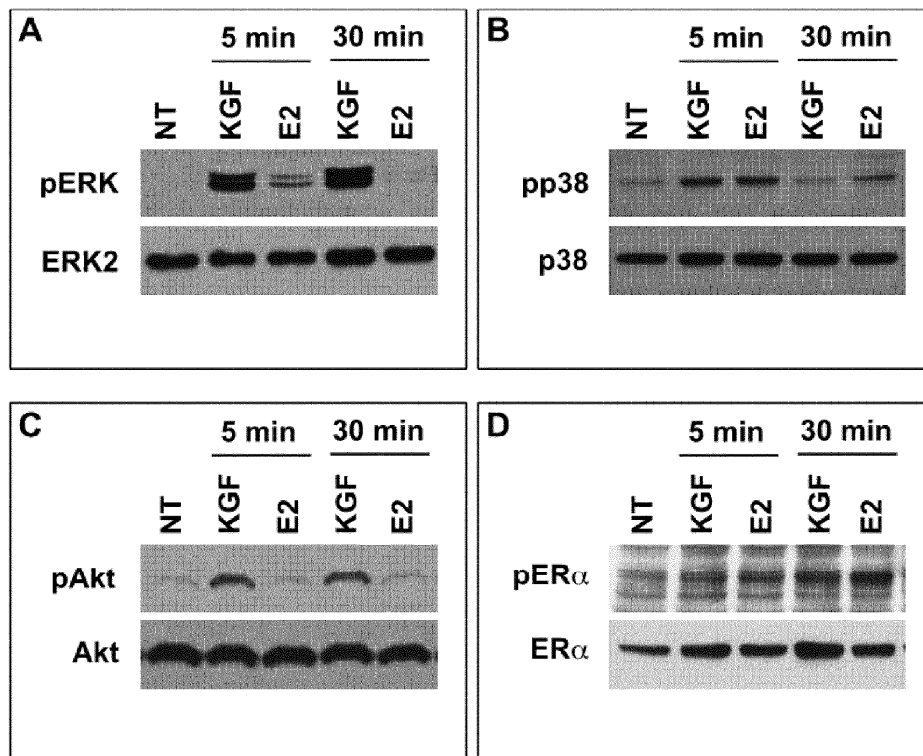


Fig. 2

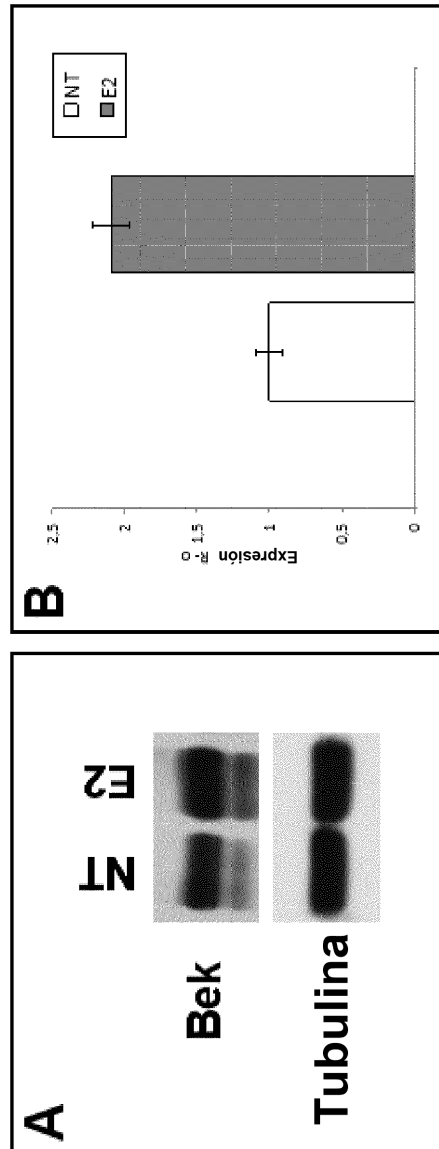


Fig. 3

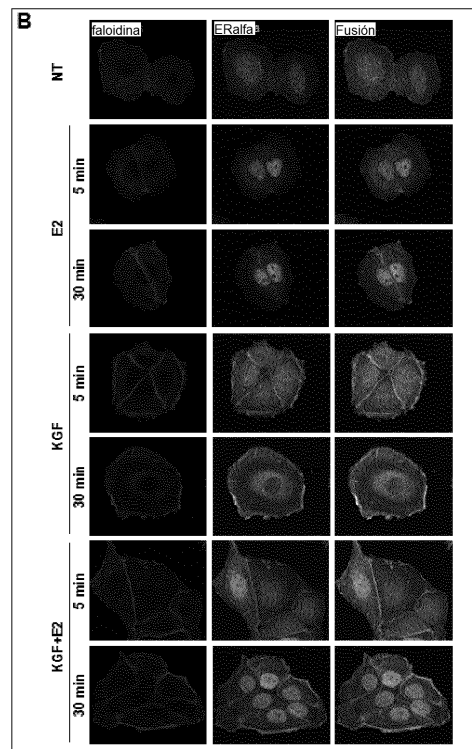
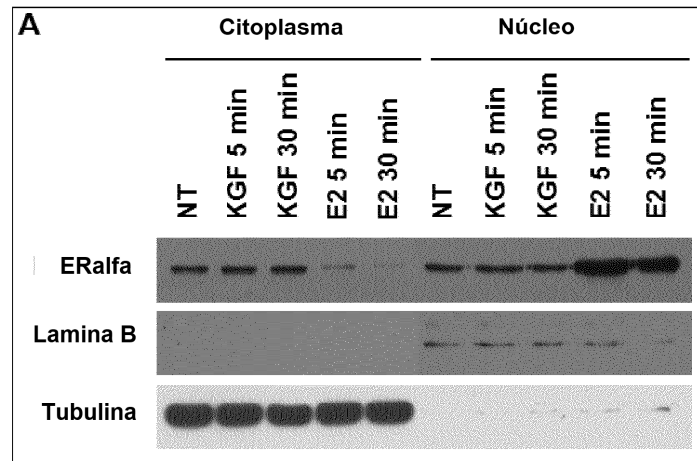


Fig. 4

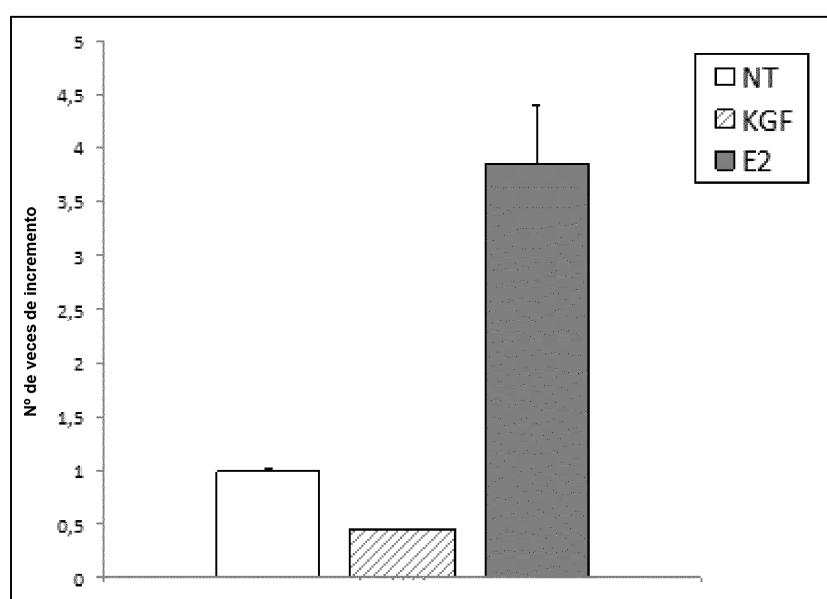


Fig. 5

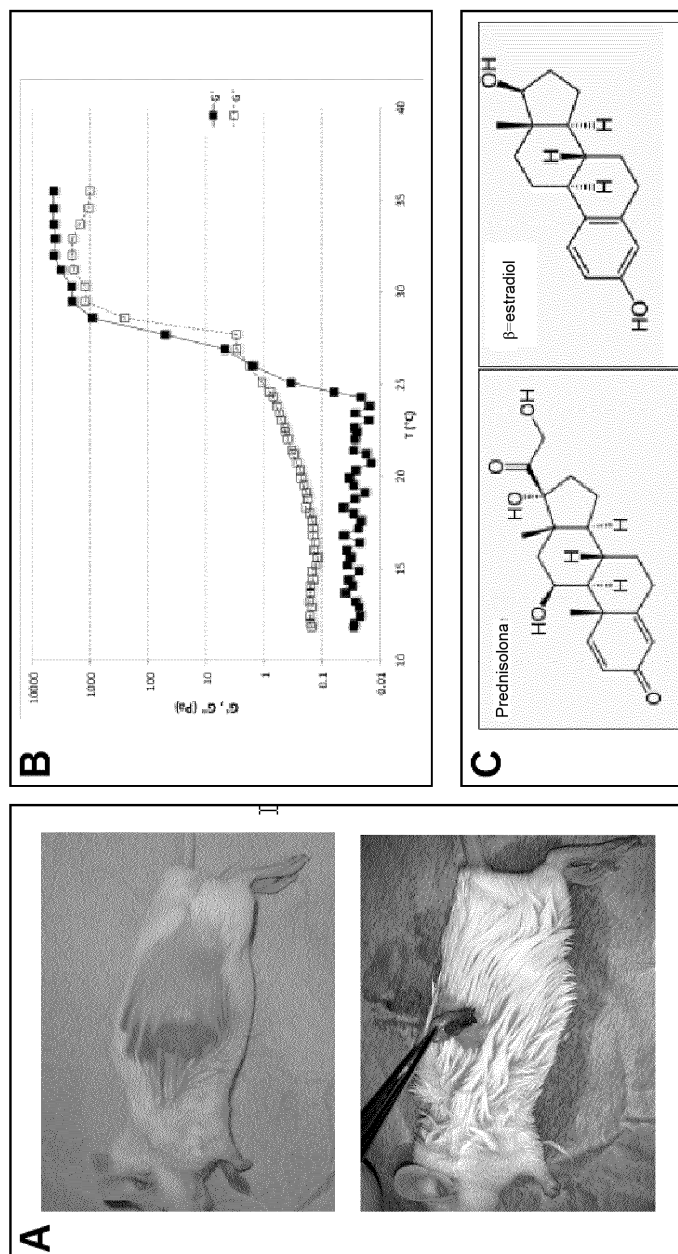


Fig. 6 (1/2)

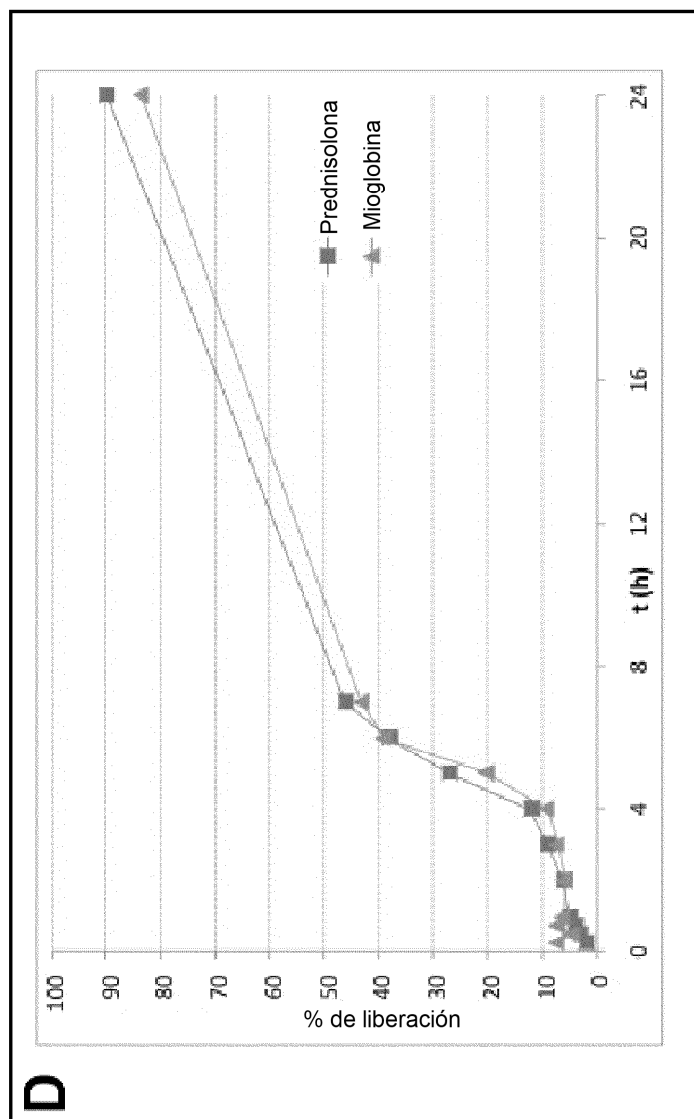


Fig 6 (2/2)

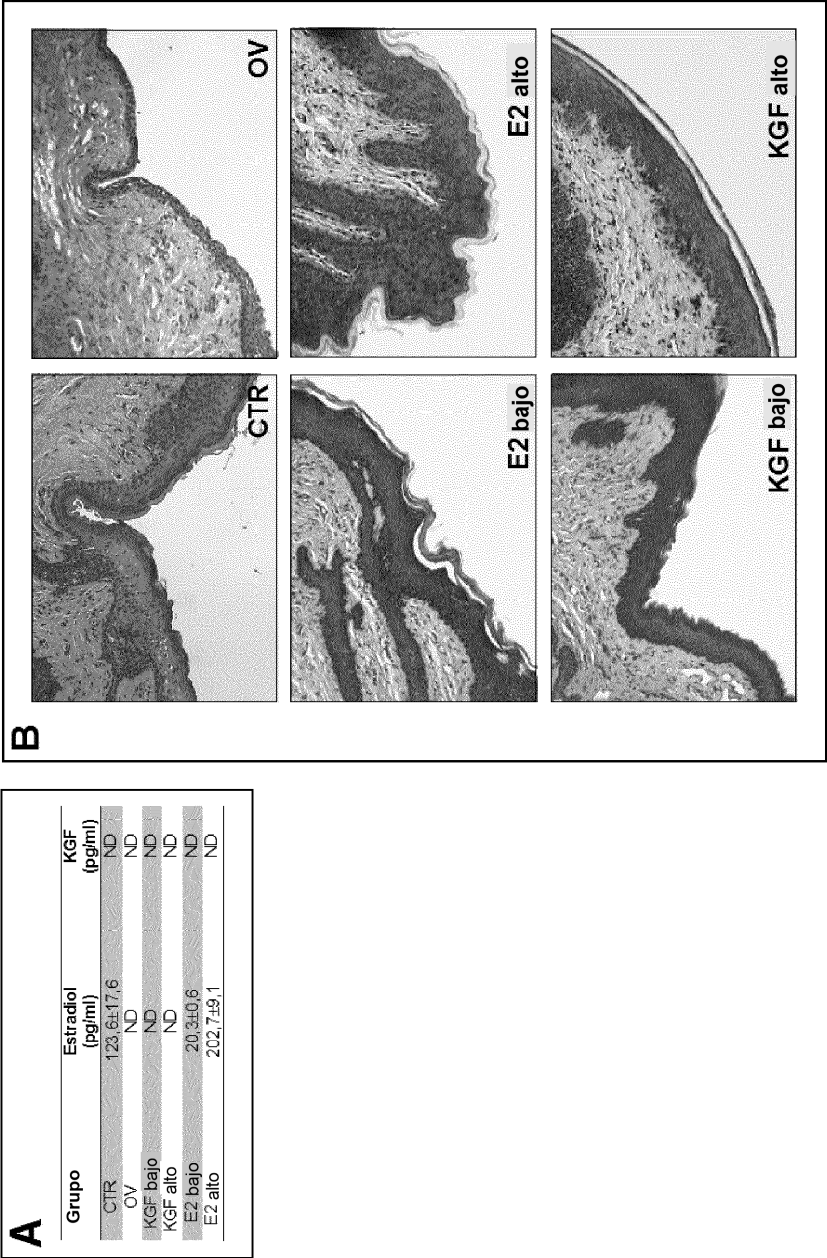


Fig. 7

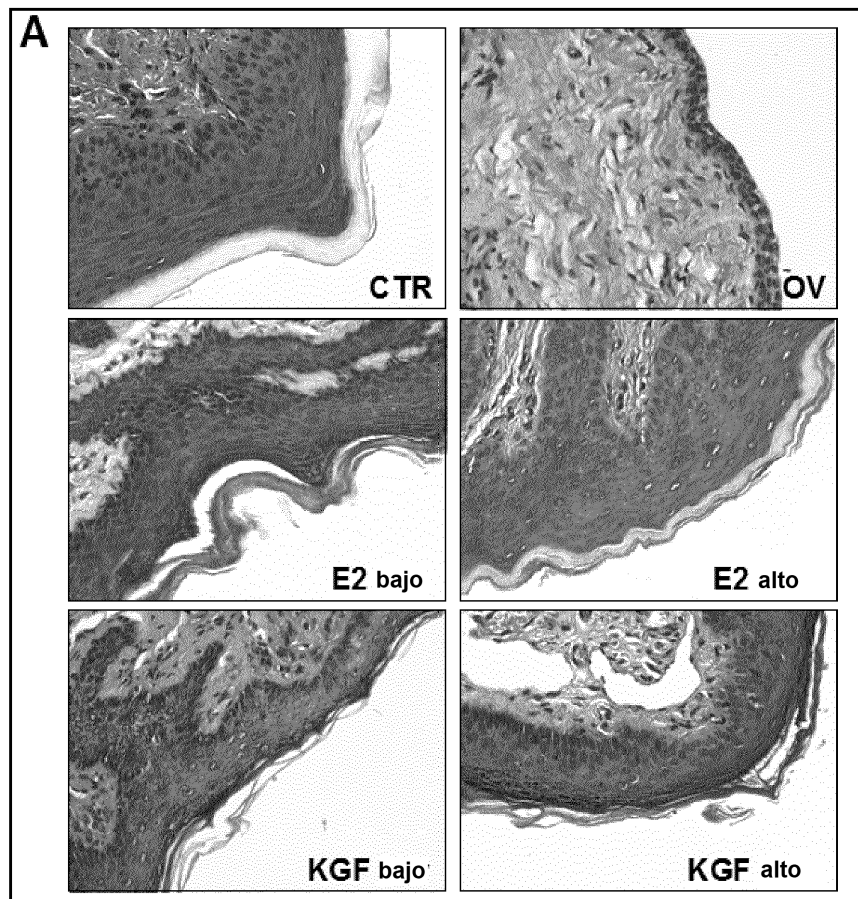


Fig. 8 (1/2)

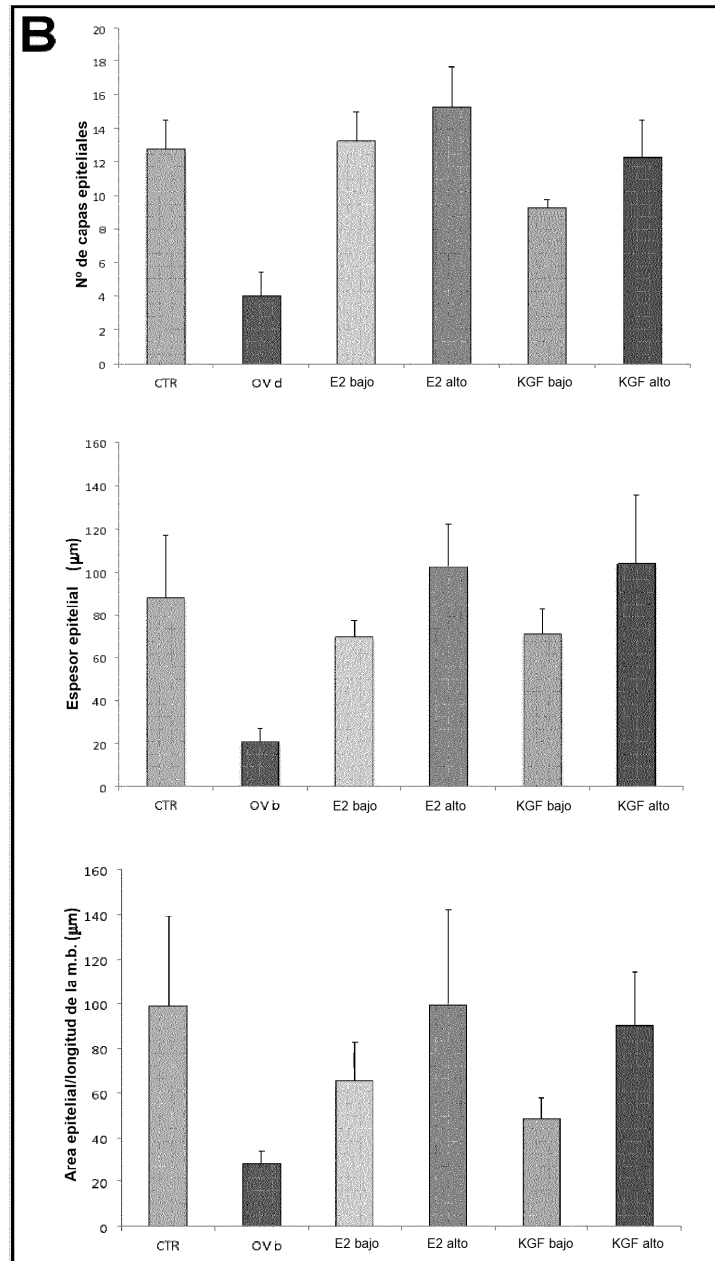


Fig. 8 (2/2)

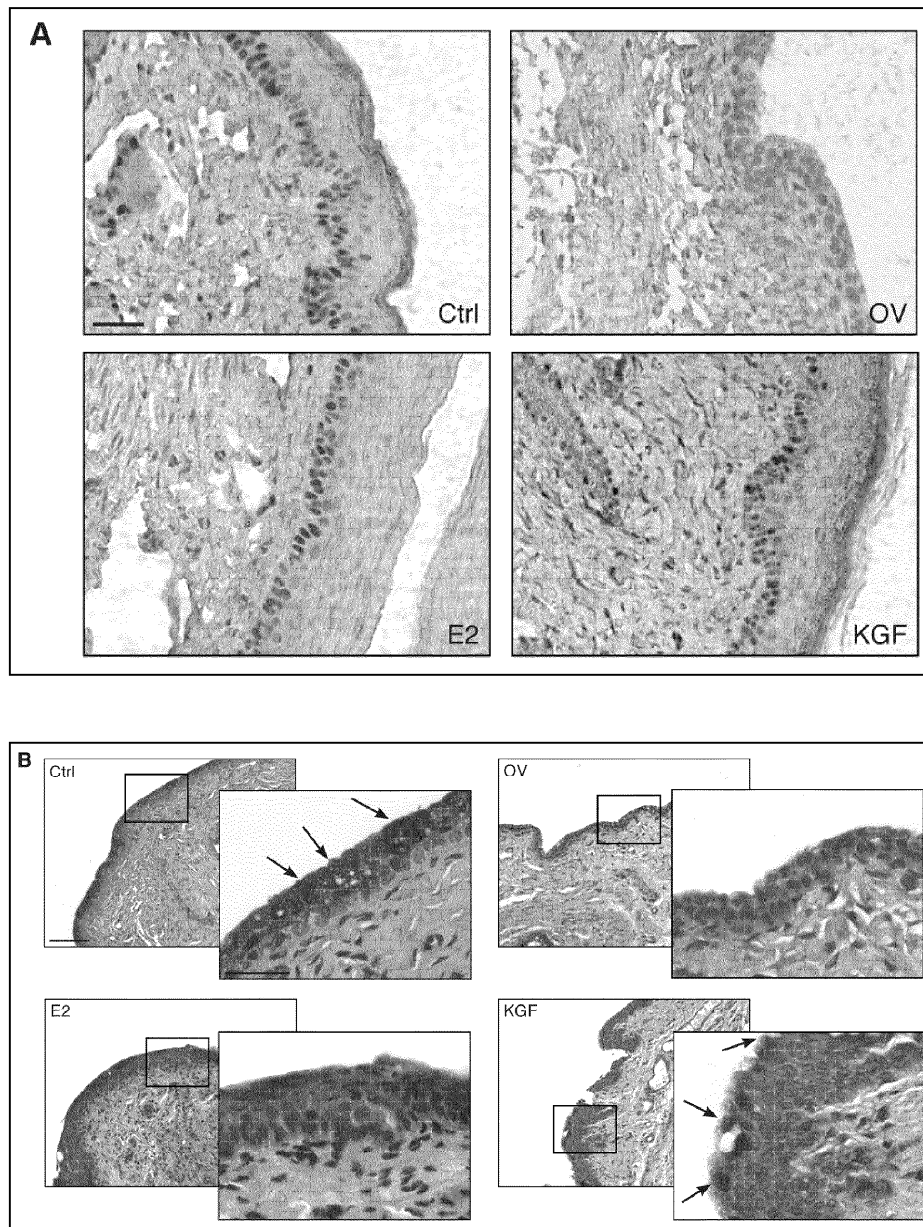


Fig. 9