

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 426**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/45** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/US2013/031992**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138704**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13713309 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2825192**

54 Título: **Proteína para inducir el crecimiento de vasos sanguíneos y usos de esta**

30 Prioridad:

**15.03.2012 US 201261611555 P**

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

**19.02.2020**

73 Titular/es:

**GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (25.0%)  
Office Of Legal Affairs 10 Park Place Suite 510  
Atlanta, GA 30302-3987, US;  
LIU, ZHI-REN (25.0%);  
LI, LIANGWEI (25.0%) y  
ZHANG, YINWEI (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LIU, ZHI-REN;  
LI, LIANGWEI y  
ZHANG, YINWEI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 743 426 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

Proteína para inducir el crecimiento de vasos sanguíneos y usos de esta

Declaración sobre la investigación o desarrollo federalmente patrocinado

5 Esta invención fue realizada con el apoyo del gobierno de EE.UU. bajo el Acuerdo CA118113 por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

### Antecedentes

La descripción se refiere a métodos para inducir la angiogénesis, incluyendo la vascularización de un sitio avascular o la extensión o mejora de la vasculatura existente. El documento WO 01/96535 describe un cribado que identificó a M2-PK como un compañero de unión para A-raf.

### 10 Compendio

La invención se refiere a una proteína para uso en un método terapéutico para estimular la angiogénesis o el crecimiento de vasos sanguíneos en un tejido de un sujeto que comprende poner en contacto el tejido con la proteína en la que la proteína es sustancialmente similar a la piruvato quinasa M2 y en la que la proteína está en forma dimérica.

15 En una realización, la invención se refiere a una proteína para uso de acuerdo con la invención, en la que la proteína es un mutante de piruvato quinasa tipo M2.

En otra realización, la invención se refiere a una proteína para uso de acuerdo con la invención, en la que la proteína tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2 o 3.

20 En una realización adicional, la invención se refiere a una proteína para uso de acuerdo con la invención, en la que la proteína es la piruvato quinasa M2 de un ser humano.

En otra realización más, la invención se refiere a una proteína para uso de acuerdo con la invención, en la que la proteína está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional, la invención se refiere a una proteína para uso de acuerdo con la invención, en donde la proteína está contenida en una crema.

25 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una proteína para uso en un método terapéutico para inducir la migración de células endoteliales en un tejido de un mamífero en el que la proteína es la piruvato quinasa tipo M2, en la que la proteína está en forma dimérica y el tejido se pone en contacto con una cantidad de la proteína que estimula la migración de células endoteliales.

30 En un tercer aspecto, la invención se refiere a una proteína para uso en un método de tratamiento de lesiones cutáneas en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una composición farmacéutica que comprende la proteína en la que la proteína es una piruvato quinasa tipo M2 (PKM2) y en donde la proteína está en forma dimérica.

35 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a una proteína para uso en un método terapéutico para facilitar el trasplante de tejidos y el trasplante de células que comprende los pasos de: poner en contacto un sitio de trasplante con la proteína en la que la proteína es sustancialmente similar a la piruvato quinasa M2 y en donde la proteína está en forma dimérica.

En una realización, el método puede comprender además la etapa de: proporcionar células mezcladas con la proteína, en donde las células son células madre.

40 En un quinto aspecto, la invención se refiere a una proteína para uso en un método terapéutico que afecte a la angiogénesis en un grupo de células u organismo, que comprende administrar una composición farmacéuticamente aceptable que contiene a la proteína, en donde la proteína es sustancialmente similar a la piruvato quinasa tipo M2 (PKM2) y en donde la proteína está en forma dimérica, al grupo de células u organismo, en donde la composición farmacéutica causa un cambio en el grupo de células o el organismo, y en donde el organismo tiene un trastorno relacionado con la angiogénesis como la degeneración macular, ulceración corneal, accidente cerebrovascular, cardiopatía isquémica, infertilidad, úlceras, esclerodermia, cicatrización de heridas, isquemia, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, miocarditis, angina de pecho, angina inestable, acción de andamiaje, transporte de la piel, ingeniería de tejidos.

### 45 Breve descripción de los dibujos

La descripción detallada se refiere particularmente a las figuras adjuntas en las que:

50 La Fig. 1A muestra gráficamente que las células HUVEC endoteliales tratadas con una piruvato quinasa M2 tuvieron

una mayor formación de tubos endoteliales, más puntos de ramificación y tubos más largos en comparación con las células tratadas con los controles;

5 La Fig. 1B muestra gráficamente que las células endoteliales tratadas con una piruvato quinasa M2 habían aumentado los puntos de ramificación en los ensayos de formación de tubos en comparación con las células tratadas con controles;

La Fig. 2 muestra que el área de heridas tratadas con una proteína de piruvato quinasa M2 se reduce más eficazmente y tuvo una formación de granulación más rápida en comparación con las heridas tratadas con los controles;

10 La Fig. 3A muestra gráficamente que la herida tratada con una proteína piruvato quinasa M2 se reduce más eficazmente en comparación con las heridas tratadas con los controles;

La Fig. 3B muestra gráficamente (desde el interior de la herida) que las áreas de la herida tratadas con una proteína piruvato quinasa M2 se reducen de manera más efectiva en comparación con las heridas tratadas con los controles.

La Fig. 4 muestra que las heridas tratadas con una proteína piruvato quinasa M2 tienen una mayor angiogénesis en comparación con las heridas tratadas con los controles.

15 La Fig. 5A muestra imágenes representativas de las placas de matriz-gel recuperadas.

La Fig. 5B muestra los contenidos de hemoglobina en las placas de matriz-gel que tienen gel PKM2 y gel rPKM1.

La Fig. 6 muestra que las heridas tratadas con proteína piruvato quinasa M2 muestran porcentajes de curación significativamente mayores que las tratadas con los controles.

#### Definiciones

20 Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos utilizados en esta memoria descriptiva.

25 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y no naturales, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos codificados naturalmente son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, solo a modo de ejemplo, un carbono alfa que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (a modo de ejemplo, norleucina) o pueden tener esqueletos de péptidos modificados, mientras que aún conservan la misma estructura química básica que el aminoácido natural. Ejemplos no limitativos de análogos de aminoácidos incluyen homoserina, norleucina, metionina sulfóxido, metionina metil sulfonio.

30

35 La expresión "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente de un agente o un compuesto que se administra que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando. El resultado puede ser la reducción y/o el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. A modo de ejemplo, un agente o un compuesto que se administra incluye, entre otros, polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos no modificados.

40 Las composiciones que contienen dichos polipéptidos de aminoácidos naturales, polipéptidos de aminoácidos no naturales, polipéptidos de aminoácidos naturales modificados o polipéptidos de aminoácidos no naturales modificados se pueden administrar para tratamientos profilácticos, potenciadores y/o terapéuticos.

Se puede determinar una cantidad "efectiva" apropiada en cualquier caso individual usando técnicas como los estudios de aumentos de la dosis.

45 La expresión "secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere al orden e identidad de los nucleótidos que comprenden un ácido nucleico.

50 A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o desoxi-inosina. La expresión "ácido nucleico" se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales y a los polímeros de aminoácidos no naturales.

5 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un material, que incluye entre otros, una sal, vehículo o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades del compuesto, y es relativamente no tóxico, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar efectos biológicos indeseables o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los componentes de la composición en la que está contenido.

10 La expresión "cantidad profilácticamente efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácidos no natural o al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales modificados que se aplica profilácticamente a un paciente que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de una enfermedad, afección o trastorno que se está tratando. En tales aplicaciones profilácticas, dichas cantidades pueden depender del estado de salud, peso del paciente, etc. Se considera óptimo  
15 dentro de la habilidad de la técnica que se determinen tales cantidades profilácticamente efectivas mediante experimentación de rutina, incluyendo, entre otros, los ensayos clínicos de aumentos de la dosis.

La frase "sustancialmente similar", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 75%, o al menos 85%, o al menos 90%, 95% o más o cualquiera valor integral entre los nucleótidos o la identidad del residuo de aminoácido, cuando se compara y alinea para una correspondencia máxima, medido usando un algoritmo de comparación de secuencias como los descritos a continuación, por ejemplo, o mediante inspección visual. Existe una identidad sustancial respecto a una región de las secuencias que tiene al menos aproximadamente 10, o aproximadamente 20, o aproximadamente 40-60 residuos de longitud o cualquier valor integral entre ellos, preferiblemente respecto a una región más larga que 60-80 residuos, más preferiblemente al menos aproximadamente 90-100 residuos y, lo más preferiblemente las secuencias son  
20 sustancialmente idénticas en toda la longitud de las secuencias que se comparan, tal como la región de codificación de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una composición que contiene al menos un polipéptido de aminoácidos no natural y/o al menos un polipéptido de aminoácidos no naturales modificados administrado a un paciente que ya padece un enfermedad, afección o trastorno, suficiente para curar o, al menos, detener parcialmente o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección que se está tratando. La efectividad de tales composiciones depende de afecciones que incluyen, entre otras, la gravedad y el curso de la enfermedad, trastorno o afección, terapia previa, estado de salud del paciente y respuesta a los fármacos, y el juicio del médico tratante. Solo a modo de ejemplo, las cantidades terapéuticamente efectivas pueden determinarse mediante experimentación de rutina, incluyendo entre otras, los ensayos clínicos de aumentos de la dosis. Una cantidad terapéuticamente efectiva de proteína quinasa M2 o una variante de la misma incluiría una cantidad que puede estimular la angiogénesis.  
30

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye mamíferos y seres humanos.

La expresión "cantidad efectiva" pretende incluir cualquier cantidad de piruvato quinasa M2 o una variante de ésta que sea suficiente para lograr un resultado terapéutico deseado, especialmente tras la administración a un sujeto animal o ser humano.  
40

El término "dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de piruvato quinasa M2 o una variante de la misma administrada a un animal o ser humano. Las unidades de dosificación adecuadas para usar en los métodos de la presente invención varían de mg/kg de peso corporal del receptor sujeto a mg/kg. El agente terapéutico puede administrarse al receptor como un bolo o mediante un suministro sostenido (continuo o intermitente).  
45

### Descripción detallada

La actividad angiogénica y/o el potencial de proliferación o migración de células endoteliales de una piruvato quinasa M2, o una proteína sustancialmente similar a la piruvato quinasa, se pueden evaluar mediante ensayos y metodología. La proteína piruvato quinasa puede ser cualquier piruvato quinasa de vertebrados o mamíferos, y puede ser una piruvato quinasa nativa, o una proteína recombinante u otra proteína sintética. La secuencia de aminoácidos para la piruvato quinasa humana es, por ejemplo, proporcionada por el número de entrada de GenBank MP0011193727 de piruvato quinasa. La identidad de secuencia de aminoácidos de la piruvato quinasa, por ejemplo, está altamente conservada entre especies con humanos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos del 98% con ratón, hámster y rata. La secuencia de aminoácidos para la piruvato quinasa humana se describe en el presente documento. La proteína de piruvato quinasa activa angiogénica es un dímero, es decir, el subtipo M2. Una amplia gama de proteínas sustancialmente similares a la piruvato quinasa M2 son útiles con realizaciones específicas.  
50

Un animal del que se purifica la proteína de piruvato quinasa nativa puede ser, por ejemplo, un miembro de la familia

de bovinos, ovinos, porcinos, equinos, caninos, felinos, primates, roedores u otros mamíferos. Al menos en algunas formas, la proteína piruvato quinasa será una proteína humana piruvato quinasa purificada de producción bacteriana.

5 Una proteína recombinante de piruvato quinasa puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la piruvato quinasa nativa o una o más diferencias de aminoácidos en comparación con la proteína nativa. Los cambios de aminoácidos pueden comprender la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más aminoácidos. La inversión de aminoácidos y otros cambios mutacionales que dan como resultado la modificación de la secuencia de la proteína de la piruvato quinasa nativa también están incluidos. Además, una proteína recombinante puede comprender un aminoácido o varios aminoácidos no codificados por el código genético.

10 La sustitución de un aminoácido puede ser una sustitución conservadora o no conservadora. La expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" debe tomarse en el sentido normalmente aceptado de reemplazar un residuo de aminoácido con otro aminoácido que tenga propiedades similares y sustancialmente no afecte negativamente a la actividad angiogénica y/o cicatrizante de la proteína piruvato quinasa. Por ejemplo, una sustitución conservadora de aminoácidos puede implicar la sustitución de un aminoácido básico como la arginina con otro aminoácido básico como la lisina. Asimismo, por ejemplo, un residuo de cisteína puede reemplazarse con serina, o un aminoácido no polar puede sustituirse con otro aminoácido no polar tal como la alanina. Los aminoácidos susceptibles de sustitución o delección en una secuencia de aminoácidos de la proteína de piruvato quinasa pueden ser determinados mediante la comparación de la secuencia con proteínas de piruvato quinasa estrechamente relacionadas para identificar aminoácidos no conservados y mediante ensayos de rutina y experimentación dentro de la habilidad del experto. Se puede proporcionar una proteína recombinante de piruvato quinasa modificada mediante la introducción de cambio(s) de nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína nativa de tal manera que se logren los cambios de los aminoácidos deseados tras la expresión del ácido nucleico en una célula huésped.

25 Una proteína recombinante u otra proteína sintética de piruvato quinasa útil en el método realizado por la invención tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos con la piruvato quinasa nativa de aproximadamente 60% o más, y más usualmente al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95 %, 98% o más, o 100%, y todas las homologías de secuencia e intervalos de las mismas dentro de los enumerados anteriormente están expresamente incluidos. La identidad de secuencia entre secuencias de aminoácidos se determina comparando los aminoácidos en cada posición de las secuencias cuando se alinean de manera óptima con el propósito de compararlas. Las secuencias se consideran idénticas en una posición si los aminoácidos en esa posición son los mismos. Un hueco, que es una posición en una alineación donde un residuo de aminoácido está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera una posición con residuos no idénticos. La alineación de secuencias puede realizarse usando cualquier programa o algoritmo adecuado. La alineación de secuencia asistida por computadora se puede realizar convenientemente utilizando programas de software estándar.

35 La proteína piruvato quinasa también se puede sintetizar químicamente. La provisión y uso de proteínas de fusión que incorporan una proteína piruvato quinasa como se describe en el presente documento también se describe. El ácido nucleico que codifica la proteína de fusión puede proporcionarse uniendo fragmentos de ADN separados que codifican la proteína piruvato quinasa y, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos lipofílica para mejorar las características lipofílicas de la proteína mediante el uso de terminales de extremos romos y conectores de oligonucleótidos, digestión para proporcionar terminales escalonados y ligadura de extremos cohesivos según se requiera.

45 Las células huésped que se pueden transfectar para la expresión de proteínas recombinantes de piruvato quinasa y proteínas de fusión como se describe en el presente documento incluyen bacterias tales como *E. coli*, cepas de *Bacillus* (por ejemplo, *B. subtilis*), cepas bacterianas *Streptomyces* y *Pseudomonas*, levaduras tales como *Sacchromyces* y *Pichia*, células de insectos, células de aves y células de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO), COS, HeLa, HaRas, W138, SW480 y NIH3T3. Las células huésped se cultivan en un medio de cultivo adecuado en condiciones para la expresión del ácido nucleico introducido (típicamente en un vector de expresión apropiado) antes de la purificación del producto expresado a partir de las células huésped, y/o sobrenadantes según se requiera usando técnicas de purificación estándar.

50 Las proteínas de la piruvato quinasa como se describen en el presente documento también pueden modificarse mediante el acoplamiento de uno o más restos proteicos o no proteicos a la proteína para mejorar la solubilidad, las características lipofílicas, la estabilidad, la vida media biológica o, por ejemplo, para actuar como un marcador para la detección posterior o similares. Las modificaciones también pueden ser el resultado de modificaciones posteriores a la traducción o la síntesis, como la unión de restos de carbohidratos, o reacciones químicas que resultan en modificaciones estructurales (por ejemplo, la alquilación o acetilación de uno o más residuos de aminoácidos u otros cambios que involucran la formación de enlaces químicos). Por ejemplo, la proteína piruvato quinasa puede tener una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en metilación, fosforilación, oxidación de residuos de tirosina y/o triptófano, glucosilación y unión covalente de S-metilcisteína.

60 La proteína piruvato quinasa puede ser de un tamaño con un rango de desviación de la proteína completa. Sin embargo, la piruvato quinasa debe tener una longitud suficiente para permitir la formación de un dímero.

Las extensiones C-terminal y N-terminal de las proteínas nativas de piruvato quinasa están involucradas en la estabilización de la estructura cuaternaria y la generación de agregados de la proteína. Por lo tanto, las piruvato quinastas, que carecen de tales extensiones C-terminal y N-terminal, forman pobres agregados. Las piruvato quinastas forman grandes agregados. Las interacciones electrostáticas entre las proteínas de piruvato quinasa también están involucradas en la formación de agregados de piruvato quinasa, y la ionización de residuos de histidina por debajo de un pH de 7 puede alterar los agregados. La proteína piruvato quinasa utilizada en un método realizado por la invención estará en forma dimérica.

Las formas intactas y truncadas de una proteína piruvato quinasa útil en las realizaciones de la invención pueden estar sujetas a modificaciones posteriores a la traducción, no limitadas a modificaciones de acetilación, metilación, etilación, fosforilación, oxidación y glicosilación en la proteína nativa piruvato quinasa. Las condiciones adecuadas para la actividad de fosfatasa alcalina incluyen tampones que contienen zinc, magnesio o calcio adecuados.

Las formas parcialmente hidrolizadas de proteínas de piruvato quinasa pueden purificarse para su uso en las realizaciones de la invención mediante cualquier técnica de purificación adecuada que incluya, por ejemplo, protocolos de filtración y cromatografía.

Los sitios de tejidos y las heridas que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen heridas agudas y crónicas, quemaduras que incluyen quemaduras derivadas de la exposición a radiación ionizante, heridas químicas, heridas quirúrgicas, heridas orales, traumatismos cutáneos y musculares, heridas de piel abierta, llagas diabéticas en la piel, incluyendo úlceras del pie diabético, úlceras del pie naturopático diabético, tejido isquémico incluyendo úlceras del pie naturopático isquémico, úlceras de estasis venosa, úlceras por presión y tejido hipóxico. Los ejemplos de tejidos isquémicos e hipóxicos incluyen el tejido isquémico del corazón y los tejidos hipóxicos asociados con el accidente cerebrovascular. Las condiciones en las que el proceso de cicatrización de heridas puede ser inducido por la administración de la proteína piruvato quinasa incluyen, en circunstancias de cicatrización tardía de heridas en las que la cicatrización se ve afectada o prevenida, por ejemplo, por hipoxia tisular, traumatismos repetidos o causas sistémicas como diabetes y enfermedades vasculares. Los ejemplos de tipos de células endoteliales que pueden ser inducidas a proliferar y/o migrar por las proteínas de piruvato quinasa de acuerdo con la invención incluyen células endoteliales de vena umbilical humana, células endoteliales microvasculares humanas y células endoteliales de aorta.

La proteína piruvato quinasa se puede administrar a un sujeto para estabilizar las células madre y los cultivos de tejidos dentro del sujeto. Al administrar la proteína, el cultivo o las células pueden sufrir angiogénesis.

En una realización específica, las células madre pueden tratarse con una proteína piruvato quinasa para facilitar el vaso sanguíneo a las células madre trasplantadas, para inducir la supervivencia de las células madre. La fuente de las células madre pueden ser células estromales adiposas, células madre embrionarias y/o células madre derivadas del aspirado de médula ósea. Las células madre pueden ser células madre de mamíferos y, en diversas realizaciones, son células madre humanas. Las células madre se pueden aplicar al sitio justo antes de la administración de la proteína piruvato quinasa, y se pueden mezclar con células madre para el trasplante conjunto.

En otra realización, el trasplante de tejido puede facilitarse mediante el tratamiento del tejido trasplantado con proteína sustancialmente similar a la piruvato quinasa o la propia piruvato quinasa. El tejido trasplantado puede tratarse con proteína piruvato quinasa. Se puede incluir un andamio para contener, soportar o retener la proteína piruvato quinasa, junto con otros materiales, en el sitio del defecto del tejido. En un ejemplo, un andamio puede contener o albergar células madre para permitir el crecimiento y/o la retención de las células madre en el sitio de implantación. Además, el andamio puede facilitar la migración de células endógenas al sitio de administración. El andamio puede implantarse o aplicarse en el sitio del defecto del tejido, seguido de la administración de la proteína piruvato quinasa. Un ejemplo incluye un método para facilitar el trasplante de tejidos y el trasplante de células en contacto con un sitio de trasplante con una proteína sustancialmente similar a la piruvato quinasa M2. En algunos ejemplos, las células a trasplantar pueden mezclarse con una proteína sustancialmente similar a la piruvato quinasa.

La proteína piruvato quinasa puede administrarse a un sujeto que necesita dicho tratamiento solo o administrarse conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, la proteína piruvato quinasa puede administrarse conjuntamente en combinación con agentes terapéuticos usados convencionalmente para inducir la angiogénesis y/o la cicatrización de heridas. Por "administrado conjuntamente" se entiende la administración simultánea en la misma formulación o en dos formulaciones diferentes por la misma o diferentes rutas, o administración secuencial por la misma o diferentes rutas, por lo que la proteína piruvato quinasa y otro(s) agente(s) terapéutico(s) muestran ventanas terapéuticas superpuestas. Por administración "secuencial" se quiere decir que uno se administra después del otro. Dichos agentes adicionales que pueden administrarse conjuntamente con la proteína piruvato quinasa incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor beta de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), factor de curación de heridas derivado de plaquetas, factor de crecimiento de insulina (IGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), agentes antiinflamatorios y agentes antimicrobianos. Otros ejemplos de otros agentes terapéuticos utilizados para inducir la angiogénesis y/o la cicatrización de heridas que pueden administrarse conjuntamente con la proteína piruvato quinasa incluyen indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), triptófano dioxigenasa (TDO), espingosina-1-fosfato (SIP), N-acetiletanolaminas, extracto de pomelo y otros fitoquímicos de plantas, como la asceína, las catequinas del té verde, la melatonina, la arginina y otros aminoácidos para favorecer

el crecimiento de los vasos.

5 La proteína piruvato quinasa generalmente se formulará en una composición farmacéutica que comprende la proteína y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen formulaciones tópicamente aceptables tales como cremas, lociones, ungüentos y geles, y gel o matriz biodegradable para aplicación interna o externa. Las composiciones tópicamente aceptables se pueden aplicar directamente al sitio de tratamiento, incluso por medio de apósitos y similares impregnados con la preparación. Los geles que comprenden un precipitado de proteína de piruvato quinasa son particularmente adecuados. Los geles y otras composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento también pueden incluir iones y/o sales de calcio. La presencia de calcio en la composición puede mejorar la cicatrización de heridas.

10 Una composición farmacéutica, como se describe en el presente documento, también puede incorporar uno o más conservantes tales como parabenos, clorobutanol y ácido sórbico, aglutinantes tales como almidón de maíz o gelatina, agentes espesantes, emulsionantes, tensioactivos, agentes gelificantes y otros componentes típicamente utilizados en tales composiciones. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquier solvente, medio de dispersión, preparaciones isotónicas y soluciones isotónicas, adecuados, conocidos convencional, tópica y fisiológicamente. El uso de tales ingredientes y medios para sustancias farmacéuticamente activas es bastante conocido. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la proteína piruvato quinasa, su uso está expresamente incluido.

15 Las composiciones farmacéuticas para usar en la invención incluyen composiciones terapéuticas para uso humano o veterinario. Típicamente, la composición farmacéutica tendrá un pH adecuado para la aplicación de la composición directamente a una herida. En general, el pH estará por encima de 5 y, por lo general, alrededor de 7 o más. Los geles precipitados de proteína de piruvato quinasa como se describe en el presente documento pueden precipitarse de una solución que contiene la proteína y un sistema tampón fisiológicamente aceptable de modo que el precipitado tenga el pH deseado. Alternativamente, el pH del gel se puede alterar al pH deseado mediante la adición de cualquier modificador de pH adecuado al gel.

25 Una composición farmacéutica para usar en la invención generalmente contendrá al menos aproximadamente el 0,001% en peso de la proteína piruvato quinasa hasta aproximadamente el 80% p/p de la composición. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede contener aproximadamente 0,05%, 0,01%, 0,1%, 1%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% en peso de la proteína piruvato quinasa o proteína sustancialmente similar. La cantidad de proteína en la composición será tal que se administrará una dosis efectiva adecuada al sujeto teniendo en cuenta el modo de administración propuesto.

30 La dosificación de la proteína piruvato quinasa administrada de acuerdo con una realización de la invención dependerá de una serie de factores que incluyen si la proteína se administrará para uso profiláctico o terapéutico, la enfermedad o afección para la cual se pretende administrar la proteína, la gravedad de la afección, el sexo y la edad del sujeto y los factores relacionados, incluido el peso y la salud general del sujeto, y pueden determinarse de acuerdo con los principios médicos aceptados. Por ejemplo, se puede administrar inicialmente una dosis baja que se incremente posteriormente en cada administración después de la evaluación de la respuesta del sujeto. De manera similar, la frecuencia de administración puede determinarse de la misma manera monitoreando continuamente la respuesta del sujeto entre cada dosis y, si es deseable, aumentando la frecuencia de administración o, alternativamente, reduciendo la frecuencia de administración.

35 Típicamente, la proteína piruvato quinasa se administrará de acuerdo con un método realizado por esta descripción. Para la aplicación tópica, la proteína piruvato quinasa se administrará a un sitio de tejido o herida cubriendo el sitio con la composición farmacéutica que contiene 0,5% -0,01% en peso de PKM2.

40 Las vías de administración incluyen, entre otras, la vía tópica, respiratoria, intravenosa, oral, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, rectal, tópica y por implante. Con respecto a las rutas intravenosas, las rutas particularmente adecuadas son mediante inyección en los vasos sanguíneos que suministran el tejido objetivo a tratar. La proteína piruvato quinasa también puede administrarse en cavidades como, por ejemplo, la cavidad pleural o peritoneal, craneal o inyectarse directamente en los tejidos a tratar. Para la administración oral, la proteína piruvato quinasa puede encapsularse o proporcionarse de otro modo en una forma entérica para pasar a través del estómago y liberarse en el intestino delgado. Se puede utilizar cualquier formulación o recubrimiento entérico adecuado.

45 Además, las proteínas de piruvato quinasa también pueden recubrirse sobre la superficie de un stent o globo de un catéter tal como un catéter de angioplastia u otro instrumento quirúrgico para aplicar a la pared interior de un vaso sanguíneo durante la angioplastia u otro procedimiento quirúrgico. La piruvato quinasa se puede aplicar, por ejemplo, a la pared del vaso sanguíneo, de esta manera, en forma de gel o cualquier otra formulación apropiada para inducir la cicatrización de heridas y/o la angiogénesis o la migración de células epiteliales al sitio de tratamiento.

50 Los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados útiles en las composiciones incorporadas por la invención se pueden encontrar, por ejemplo, en manuales y textos.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

La siguiente es una secuencia ejemplar de la piruvato quinasa M2.

Núm. de entrada de PKM2 NP 002645

5  
 1 mskphseagt afigtqqlha amadtflehm crldidsppi tarntgiict igpasrsvet  
 61 lkemiksgmn varlnfshgt heyhaetikn vrtatesfas dpilyrpvav aldtkgpeir  
 121 tglksgsgta evelkkgatl kitldnayme kcdenilwld yknickvvev gskiyvddgl  
 181 islqvkkqga dflvteveng gslgskkgvn lpgaavdlpa vsekdiqdlk fgveqdvdmv  
 241 fasfirkasd vhevrkvlge kgknikiisk ienhegvrrf deileasdgi mvargdlgie  
 301 ipaekvflaq kmmigr-cnra gkpvicatqm lesmikkprp traegsdvan avldgadcim  
 361 lsgetakgdy pleavrmqhl iareaeaaay hlqlfeelrr lapitsdpte atavgaveas  
 421 fkccsgaiiv ltksgrsahq varyrprapi iavtrnpqta rqahlyrgif pvlckdpvqe  
 481 awaedvdlrv nfamvngkar gffkkgdvvi vltgwrpgsg ftntmrvvvp p

Ejemplo 2

10 Las pruebas in vitro respaldaron que PKM2 inducía la angiogénesis. PKM2 expresado como PKM2 recombinante (ref como rPKM2) y su isoenzima PKM1 (ref como rPKM1) como control. El rPKM2, el rPKM2 + fructosa bisfosfato (FBP), el rPKM1 y una solución tamponada sola se agregaron al medio de cultivo de las células. Se analizó la formación de los tubos endoteliales. Como se muestra en la FIG. 1A y la FIG. 1B, rPKM2 inducía fuertemente la formación de tubos endoteliales tanto en densidad de tubos como en los brotes de los tubos formados. El tiempo requerido para la formación de los tubos también se acortó sustancialmente, y los tubos formados se mantuvieron mucho más tiempo. El rPKM2 + FBP tuvo menos efectos en comparación con el rPKM2. El rPKM1 solo tuvo efectos marginales, mientras que la solución salina tamponada no tuvo efectos.

15 Ejemplo 3

20 Las pruebas in vivo respaldaron que PKM2 inducía la cicatrización de heridas al facilitar la angiogénesis. Se indujo una herida en ratones. Se les administró una crema sin PKM2 en la herida a una muestra de los ratones, y se administró una crema con PKM2 en la herida a otra muestra de los ratones. Las heridas fueron cubiertas y vendadas. Las aplicaciones tópicas de los agentes se aplicaron nuevamente tres días y seis días después de las inducciones de la herida. Los experimentos se detuvieron a los nueve días. Después de 3 días, hubo una diferencia en la cicatrización y cierre de heridas. Las figs. 2 a 4 muestran estos datos.

Ejemplo 4

Las siguientes son las secuencias de aminoácidos de las proteínas de piruvato quinasa modificadas en las que al menos la arginina ha sido sustituida con un glutamato.

25 Mutante R399E; SEQ ID NO: 2

1 mskphseagt afigtqqlha amadtflehm crldidsppi tarntgiict igpasrsvet  
 61 lkemiksgmn varlnfshgt heyhaetikn vrtatesfas dpilyrpvav aldtkgpeir  
 121 tglksgsgta evelkkgatl kitldnayme kcdenilwld yknickvvev gskiyvddgl  
 181 islqvkkqga dflvteveng gslgskkgvn lpgaavdlpa vsekdiqdlk fgveqdvdmv  
 241 fasfirkasd vhevrkvlge kgknikiisk ienhegvrrf deileasdgi mvargdlgie  
 301 ipaekvflaq kmmigr-cnra gkpvicatqm lesmikkprp traegsdvan avldgadcim  
 361 lsgetakgdy pleavrmqhl iareaeaaay hlqlfeelr lapitsdpte atavgaveas  
 421 fkccsgaiiv ltksgrsahq varyrprapi iavtrnpqta rqahlyrgif pvlckdpvqe  
 481 awaedvdlrv nfamvngkar gffkkgdvvi vltgwrpgsg ftntmrvvvp p

Mutante Y105E; SEQ ID NO: 3

1 mskphseagt afigtqqqlha amadtfflehm crldidsppi tarntgiict igpasrsvet  
 61 lkemiksgmn varlnfshgt heyhaetikn vrtatesfas dpil@rpvav aldtkgpeir  
 121 tglksgsgta evelkkgatl kitldnayme kcdenilwld yknickvvev gskiyvddgl  
 181 islqvkkqga dflvteveng gslgskkgvn lpgaavdlpa vsekdiqdlk fgveqdvdmv  
 241 fasfirkasd vhevrvklge kgknikiisk ienhegvrrf deileasdgi mvargdlgie  
 301 ipaekvflaq kmmigr-cnra gkpvicatqm lesmikkprp traegsdvan avldgadcim  
 361 lsgetakgdy pleavrmqhl iareaeaiy hlqlfeelrr lapitsdpte atavgaveas  
 421 fkccsgaiiv ltksgrasahq varyrprapi iavtrnpqta rqahlyrgif pvlckdpvqe  
 481 awaedvdlrv nfamnv-gkar gffkkkgdvvi vltgwrp-gsg ftntmr-vvpv p

Ejemplo 5

5 Se implantó un ensayo de placa de gel, un gel matriz que tenía rPKM2 (3 mM) o rPKM1 (3 mM), respectivamente, en el costado derecho de ratones Balb/c. El gel matriz se mezcló previamente con otros materiales sugeridos por el proveedor antes de la adición de los geles rPKM1 y rPKM2. Después de siete días, las plagas de gel de matriz se recuperaron del ratón. La Fig. 5A muestra imágenes representativas de las placas de matriz-gel recuperadas. La Fig. 5B muestra que el contenido de hemoglobina en las placas de gel de matriz que tienen gel PKM2 fue mayor en relación con el contenido de hemoglobina en las placas de gel de matriz que tienen gel rPKM1. El ensayo indica la actividad de rPKM2 en la inducción de la angiogénesis.

10 Ejemplo 6

15 Las pruebas in vivo respaldaron que PKM2 inducía la cicatrización de heridas al facilitar la angiogénesis con ratones diabéticos db/db. Se indujo una herida en ratones. Se administró una crema sin PKM2 sobre la herida a un grupo de ratones, y se administró una crema con PKM2 sobre la herida a otra muestra de los ratones. Las heridas fueron cubiertas y vendadas. La Fig. 6 muestra una herida que se indujo en ratones diabéticos db/db (13 semanas de edad, seis ratones por grupo). Una crema sin PKM2 se administró por vía tópica sobre la herida, y una crema con PKM2/Tampón (0,004% p/p) se administró tópicamente sobre la herida, y una crema con PKM1 (0,004% p/p) (Azul) se administró tópicamente en la herida. El grado o porcentaje de curación fue claramente mayor en ratones donde se aplicaba PKM2 a los mismos. El porcentaje (%) de curación se determinó midiendo las áreas de la herida inicial y luego restando las áreas de la herida medidas en áreas de la herida de un día dado/inicial. Las barras de error son  
 20 las desviaciones estándar entre los cinco ratones.

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína para uso en un método terapéutico para estimular la angiogénesis o el crecimiento de vasos sanguíneos en el tejido de un sujeto que comprende poner en contacto el tejido con la proteína, en la que la proteína es sustancialmente similar a la piruvato quinasa M2 y en la que la proteína está en forma dimérica.
- 5 2. La proteína para uso según la reivindicación 1, en la que la proteína es un mutante de piruvato quinasa tipo M2.
3. La proteína para uso según la reivindicación 2, en la que la proteína tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2 o 3.
4. La proteína para uso según la reivindicación 1, en la que la proteína es la piruvato quinasa M2 de un ser humano.
- 10 5. La proteína para uso según las reivindicaciones 2 o 4, en la que la proteína está en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. La proteína para uso según la reivindicación 1, en la que la proteína está contenida en una crema.
7. La proteína para uso en un método terapéutico para inducir la migración de células endoteliales en un tejido de un mamífero, en el que la proteína es la piruvato quinasa tipo M2, en la que la proteína está en forma dimérica y el tejido se pone en contacto con una cantidad estimulante de la migración de células endoteliales de la proteína.
- 15 8. La proteína para uso en un método de tratamiento de lesiones cutáneas en un sujeto que lo necesita mediante la administración al sujeto de una composición farmacéutica que comprende la proteína, en la que la proteína es una piruvato quinasa tipo M2 (PKM2) y en la que la proteína está en forma dimérica.
9. La proteína para uso en un método terapéutico para facilitar el trasplante de tejidos y el trasplante de células que comprende los pasos de:
  - 20 - poner en contacto un sitio de trasplante con la proteína, en donde la proteína es sustancialmente similar a la piruvato quinasa M2 y en donde la proteína está en forma dimérica.
  10. La proteína para uso según la reivindicación 9, que comprende además la etapa de proporcionar células mezcladas con la proteína, en donde las células son células madre.
  - 25 11. La proteína para uso en un método terapéutico que afecta a la angiogénesis en un grupo de células u organismo, que comprende administrar una composición farmacéuticamente aceptable que comprende la proteína, en donde la proteína es sustancialmente similar a la piruvato quinasa tipo M2 (PKM2) y en donde la proteína está en forma dimérica, al grupo de células u organismo, en el que la composición farmacéutica provoca un cambio en el grupo de células o el organismo, y en el que el organismo tiene un trastorno relacionado con la angiogénesis, como degeneración macular, ulceración corneal, accidente cerebrovascular, cardiopatía isquémica, infertilidad, úlceras, esclerodermia, cicatrización de heridas, isquemia, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, miocarditis, angina de pecho, angina inestable, acción de andamiaje, transporte de la piel, ingeniería de tejidos.
  - 30

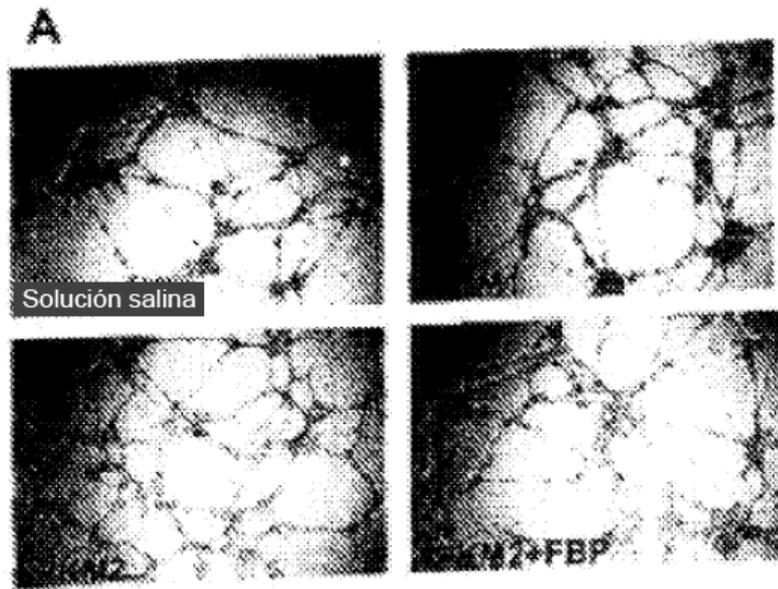


FIG. 1A

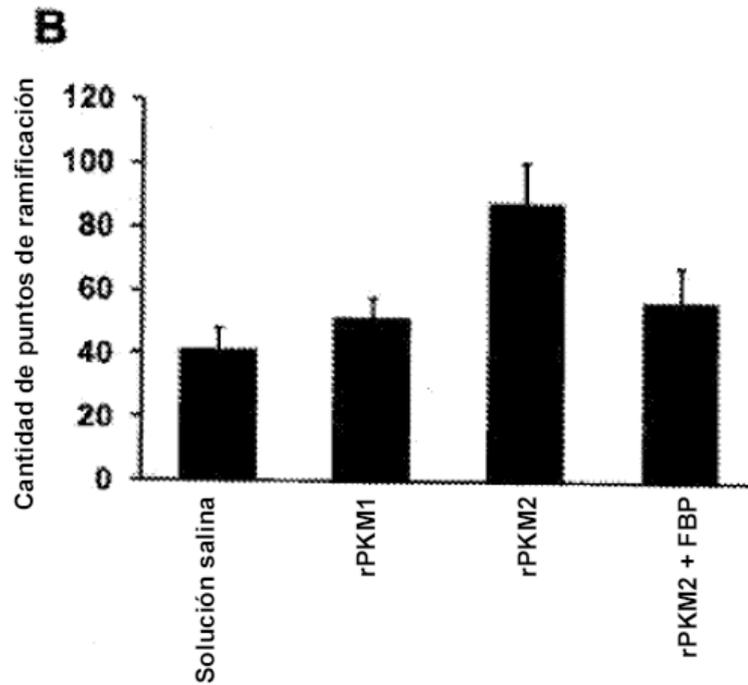


FIG. 1B

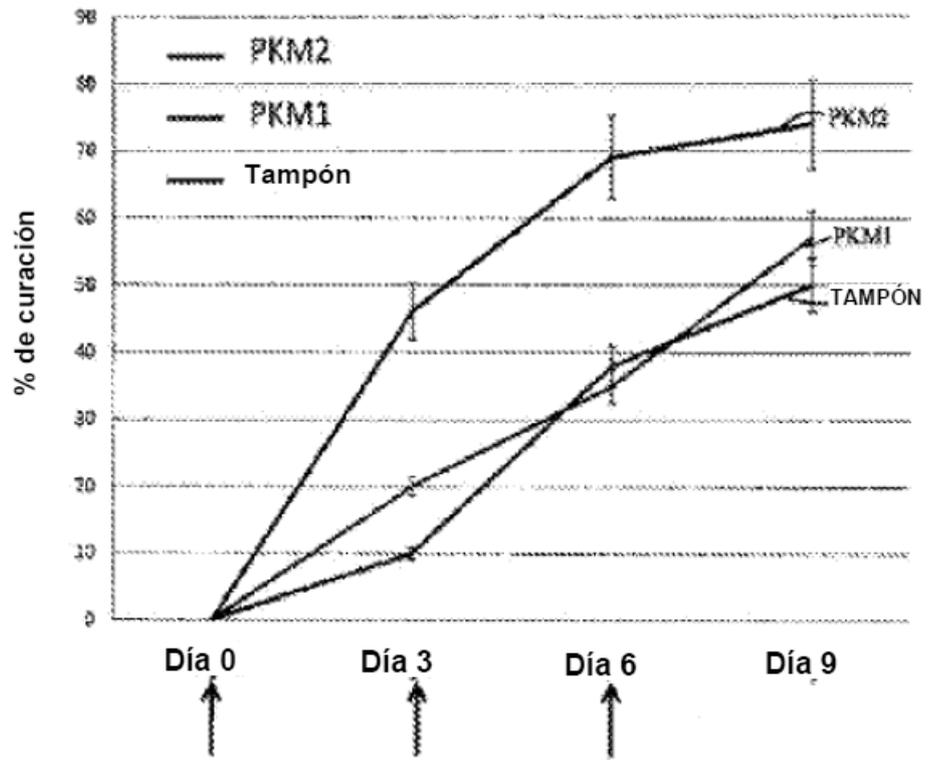


Fig. 2

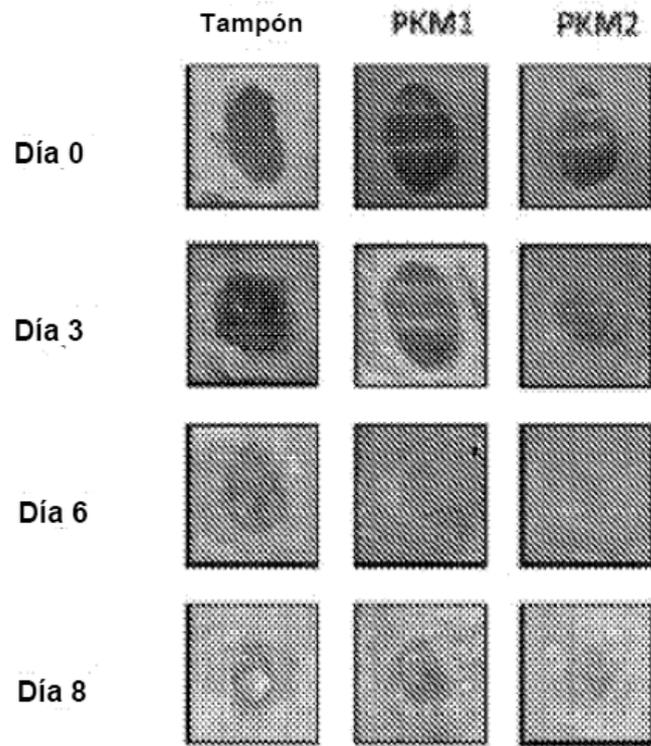


Fig. 3A

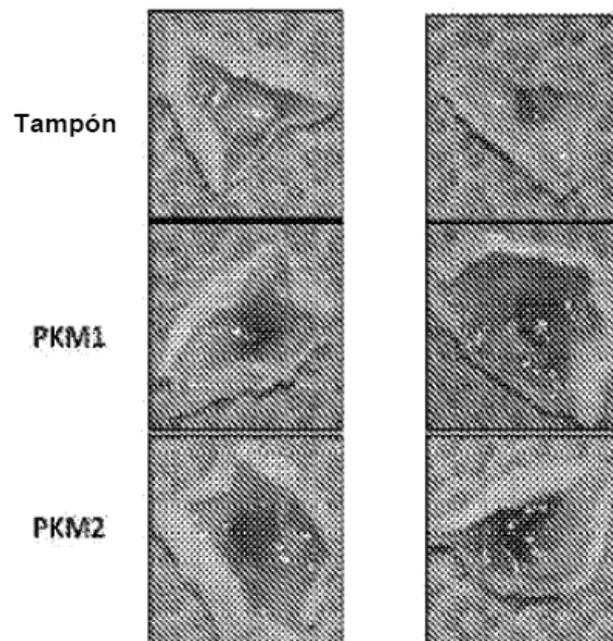
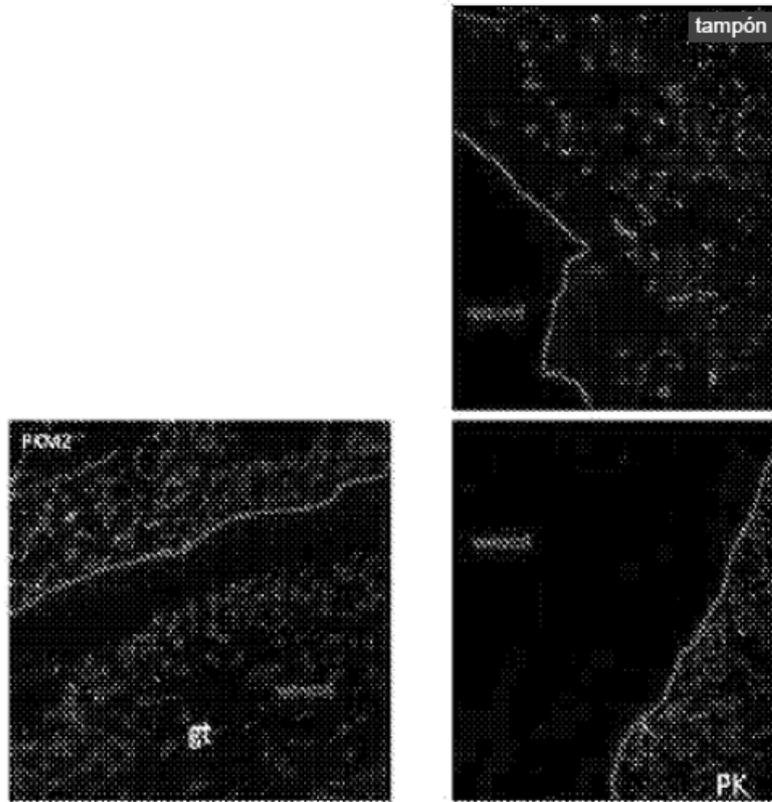


Fig. 3B

FIG. 4



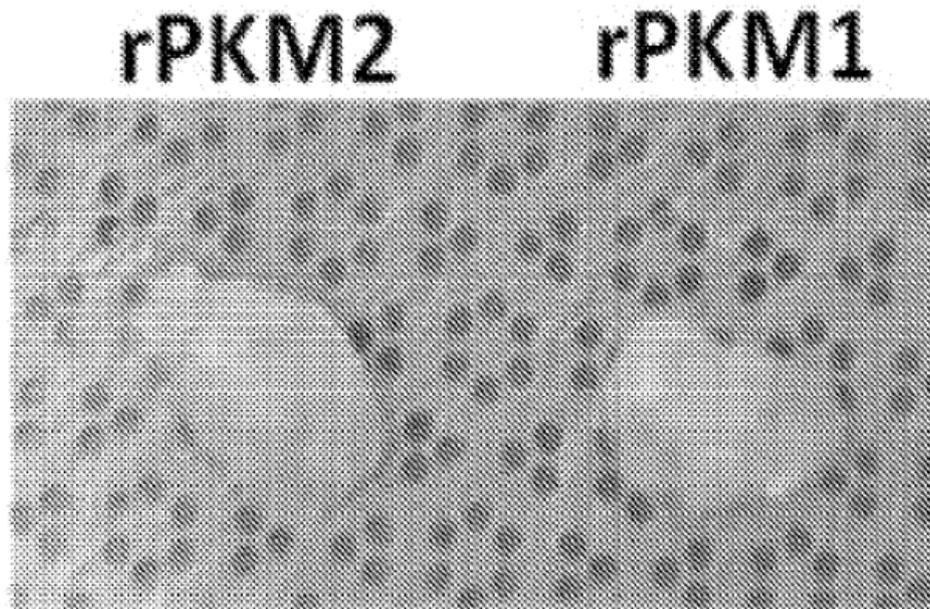


FIG. 5A

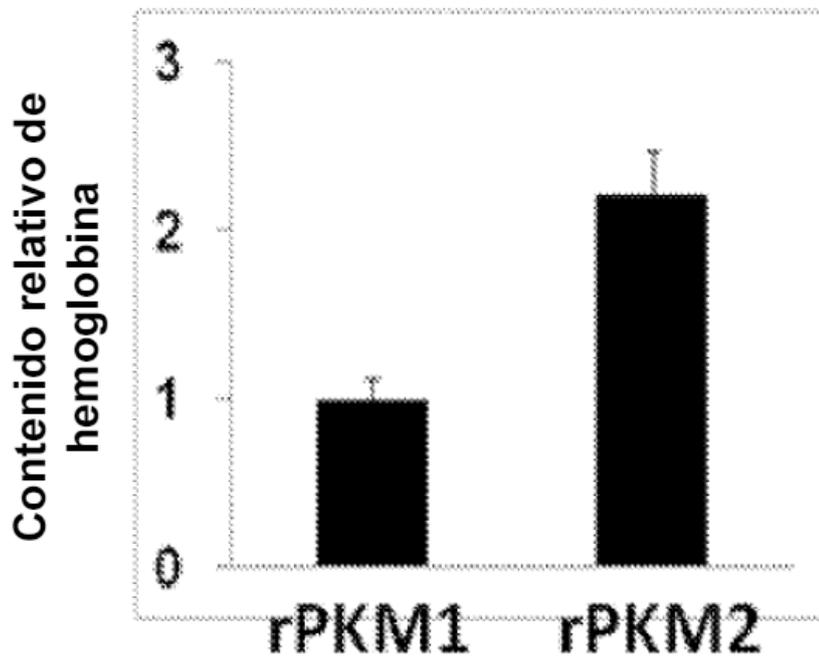


FIG. 5B

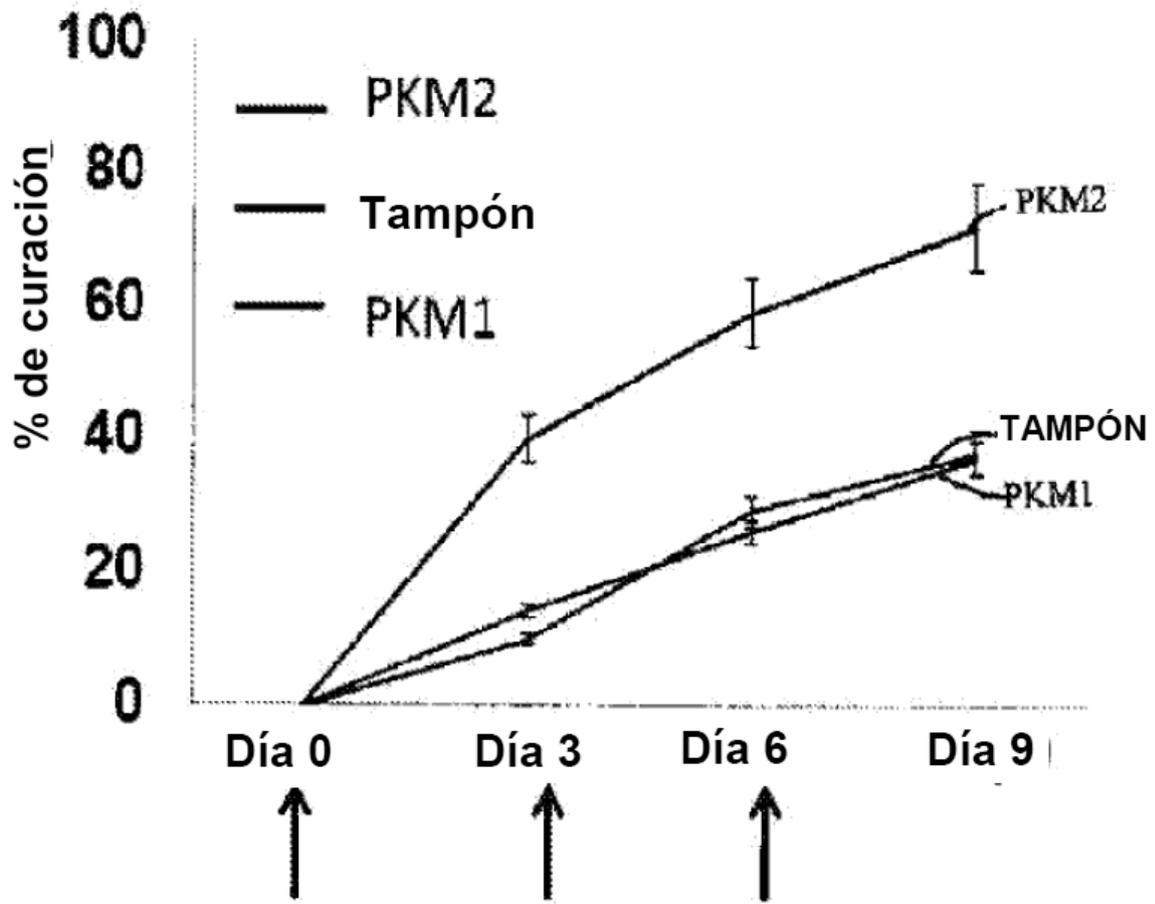


FIG. 6