

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 388**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/65** (2006.01)  
**C07K 14/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04708282 .1**  
96 Fecha de presentación: **05.02.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1594895**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **COMPLEJOS DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y MODULACIÓN DE MIGRACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR.**

30 Prioridad:  
**05.02.2003 AU 2003900481**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.01.2012**

73 Titular/es:  
**QUEENSLAND UNIVERSITY OF TECHNOLOGY  
GARDENS POINT CAMPUS, 2 GEORGE STREET  
BRISBANE, QUEENSLAND 4000, AU**

72 Inventor/es:  
**UPTON, Zee y  
TOWNE, Christopher, Luke**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

**ES 2 372 388 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

Complejos de factores de crecimiento y modulación de migración y crecimiento celular

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a complejos de proteínas que tienen dominios respectivos que permiten la unión a y la activación tanto del receptor del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 como de un receptor integrina para vitronectina. En particular, esta invención se refiere a proteínas quiméricas que comprenden factor de crecimiento insulínico-I y un dominio de unión al receptor integrina de vitronectina. Más en particular, esta invención se refiere a complejos de proteínas que estimulan la migración celular y a composiciones, usos médicos y métodos *in vitro* que fomentan o inducen la migración y/o proliferación celular. Estas composiciones, usos y métodos pueden tener uso en cicatrización, ingeniería de tejidos, tratamientos cosméticos y terapéuticos tales como reemplazo de piel y regeneración de piel y tratamiento de quemaduras donde se requiere migración y/o proliferación de células epiteliales. Las proteínas quiméricas de la invención también pueden ser útiles para la producción de agonistas y antagonistas de las acciones biológicas de complejos de proteínas que comprenden factores de crecimiento de tipo insulínico, vitronectina y proteínas de unión a factores de crecimiento de tipo insulínico.

20 **Antecedentes de la invención**

Los factores de crecimiento de tipo insulínico (IGF), IGF-I e IGF-II, son factores de crecimiento peptídicos mitogénicos implicados en un amplio espectro de procesos celulares que incluyen hiperplasia, síntesis de ADN, diferenciación, progresión del ciclo celular e inhibición de apoptosis (Keiss *et al.*, 1994, *Hormone Research* **41** 66; Wood & Yee, 2000, *J. Mammary Gland Biology and Neoplasia* **5** 1; Jones & Clemmons, 1995, *Endocrine Rev.* **16** 3). Estos efectos están mediados a través de la unión a su receptor tirosina quinasa unido a la superficie celular, el receptor de IGF de tipo I (IGF-IR). Los IGF también están estrechamente regulados por una familia de proteínas de unión específica, denominadas IGFBP, cuyo papel principal es unirse a los IGF libres y de esta manera moderar su semivida, especificidad y actividad (Clemmons, 1998, *Mol. Cell. Endocrinol.* **140** 19).

Recientemente se ha mostrado que la vitronectina (VN) se une directamente a IGF-II (Upton *et al.*, 1999, *Endocrinology* **140** 2928-31) mientras que IGF-I se puede unir a VN en presencia de ciertas IGFBP, como se describe en la publicación internacional WO 02/24219. El descubrimiento de que VN, una molécula de organización y adhesión de la MEC, se une a IGF-II con una afinidad que es similar a la de IGF-II por IGF-IR (Upton *et al.*, 1999, anteriormente), su receptor biológicamente relevante, revela una unión física específica entre la acción de IGF y VN en la MEC. Además, IGF-II unido a VN puede estimular respuestas funcionales sinérgicas en queratinocitos humanos *in vitro* (publicación internacional WO 02/24219).

VN es una glicoproteína que es muy abundante en la sangre y en la MEC. Sintetizada principalmente en el hígado, pero expresada en muchos otros tipos celulares, VN circula en la sangre en una conformación cerrada y se deposita en la MEC en una conformación abierta o extendida (Schvartz *et al.*, 1999, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **31** 531-44). Se cree que ambas conformaciones se unen a IGF-II (Upton *et al.*, 1999, anteriormente; publicación internacional WO 02/24219; McMurty *et al.*, 1996, *Endocrinology* **150**:149-60) y también se une a otros múltiples ligandos incluyendo colágeno (Morris *et al.*, 1994, *Journal of Biological Chemistry* **269** 23845-52), glicosaminoglicanos (Francois *et al.*, 1999, *Journal of Biological Chemistry* **274**: 37611-19), otras muchas proteínas de la MEC y una amplia variedad de integrinas, particularmente las integrinas  $\alpha_v$ . En efecto, el principal papel de vitronectina es como una molécula de organización de la MEC que proporciona uniones adhesivas a estos receptores integrinas de superficie celular a través de un motivo de unión RGD. Se ha mostrado que los receptores de VN (integrinas  $\alpha_v$ ) regulan la reorganización del citoesqueleto de actina requerida para el crecimiento e invasión, por tanto, la unión de VN coordina adhesión y movimiento celular (DePasquale, 1998, *Histochemistry and Cell Biology* **110**: 485-94; Huang, 2000, *Oncogene* **19** 1915-23).

Sin embargo, las contribuciones relativas respectivas de los IGF y VN presentes en los complejos de proteínas, en términos de estimular respuestas biológicas tales como migración y/o proliferación celular, ha permanecido elusiva, como lo ha hecho el sitio de interacción proteína-proteína entre los IGF/IGFBP y VN.

55 **Compendio de la invención**

Los presentes inventores han descubierto que complejos de proteínas que comprenden IGF-II y VN o IGF-I e IGFBP y VN estimulan la migración y/o proliferación celular mediante unión y coactivación sinérgica del receptor de IGF-I (IGF-IR) y receptores integrinas que se unen a VN.

Además, se ha identificado un dominio polianiónico de VN como un sitio de unión propuesto de cualquiera de los IGF o las IGFBP.

Por tanto, en el presente documento se divulgan complejos de proteínas aislados que comprenden un dominio de unión al receptor de un dominio del factor de crecimiento y un dominio de vitronectina o fibronectina que es capaz de

unirse a un receptor integrina, en donde el complejo de proteínas aislado puede coactivar el receptor del factor de crecimiento y la integrina para provocar de esta manera una respuesta biológica.

Se divulga un complejo de proteínas aislado que comprende:

- 5
- (i) un factor de crecimiento, o al menos un dominio de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor afín del factor de crecimiento; y
  - (ii) vitronectina (VN) o fibronectina (FN), o al menos un dominio de unión a integrinas de VN o FN.

10 También se divulga un complejo de proteínas aislado en forma de una proteína quimérica sintética que comprende una secuencia de aminoácidos de:

- (i) un factor de crecimiento, o al menos un dominio de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor afín del factor de crecimiento; y
- 15 (ii) vitronectina (VN) o fibronectina (FN), o al menos un dominio de unión a integrinas de VN o FN.

Preferiblemente, según las divulgaciones anteriormente mencionadas el factor de crecimiento es IGF-I o IGF-II.

Más preferiblemente el factor de crecimiento es IGF-I.

20 En divulgaciones donde el factor de crecimiento es IGF-I, de forma adecuada dicho al menos un dominio de IGF-I incluye el residuo 24 de IGF-I.

25 En divulgaciones donde el factor de crecimiento es IGF-II, de forma adecuada dicho al menos un dominio de IGF-II incluye el residuo 27 de IGF-II.

En divulgaciones alternativas, el factor de crecimiento es VEGF o PDGF.

30 La presente invención proporciona en un aspecto, una proteína quimérica sintética capaz de fomentar la migración y/o proliferación celular, que comprende una secuencia de aminoácidos de:

- (i) el factor de crecimiento insulínico de tipo I (IGF-I) que comprende la SEQ ID NO: 3; y
- (ii) al menos un dominio de unión a integrinas de vitronectina (VN) que comprende los residuos de aminoácidos 1 a 52 de la vitronectina madura (SEQ ID NO: 2);

35 en donde la proteína quimérica sintética no incluye un dominio de unión a heparina (HBD) de VN que corresponde a los residuos 347-459 de la VN madura (SEQ ID NO: 2) y en donde la proteína quimérica sintética no comprende una secuencia de aminoácidos de IGFBP.

40 Preferiblemente, el receptor integrina es una integrina  $\alpha_v$ .

Más preferiblemente, el receptor integrina es una integrina  $\alpha_v\beta_3$  o una integrina  $\alpha_v\beta_5$ .

45 Este aspecto de la invención también incluye en su ámbito delecciones, adiciones, sustituciones y/o mutaciones de secuencias de aminoácidos que corresponden a los aspectos (i) y (ii) anteriores.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica la proteína quimérica sintética del aspecto anterior.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona una construcción genética que comprende el ácido nucleico aislado del aspecto anterior operativamente unido a una o más secuencias reguladoras en un vector de expresión.

Preferiblemente, la construcción genética es una construcción de expresión.

55 En un aspecto más, la invención proporciona una célula huésped que comprende la construcción genética del aspecto anterior.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína sintética del aspecto anterior y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

60 Este aspecto de la invención también contempla una composición farmacéutica que comprende la célula huésped del aspecto anterior, célula que expresa dicha(s) proteína(s) sintética(s).

También se divulga un anticuerpo específico para la proteína sintética del aspecto anterior.

65

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método *in vitro* de fomentar la migración celular que incluye el paso de usar una proteína sintética como se define en la reivindicación 1 para unirse tanto a un receptor del factor de crecimiento como a un receptor integrina.

5 Preferiblemente, el receptor del factor de crecimiento es IGF-IR.

Preferiblemente, el receptor integrina es una integrina  $\alpha_v$ .

Más preferiblemente, el receptor integrina es una integrina  $\alpha_v\beta_3$  o una integrina  $\alpha_v\beta_5$ .

10 La invención también proporciona el uso de la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de un medicamento que fomenta la cicatrización, reparación de la piel, curación de quemaduras o úlceras o terapia de reemplazo de piel, en donde la proteína quimérica sintética en el medicamento se une tanto a un receptor del factor de crecimiento como a un receptor integrina expresado por una célula y de esta manera induce, aumenta o fomenta de otra manera la migración y/o proliferación de dicha célula.

15 La cicatrización es preferiblemente en mamíferos, preferiblemente en seres humanos.

20 También se divulga un método de prevenir la migración y/o proliferación celular, que incluye el paso de prevenir, inhibir o reducir de otra manera la unión tanto del receptor del factor de crecimiento como del receptor integrina a un complejo que comprende un factor de crecimiento y vitronectina o fibronectina.

Preferiblemente, el receptor del factor de crecimiento es IGF-IR.

25 Preferiblemente, el receptor integrina es una integrina  $\alpha_v$ .

Más preferiblemente, el receptor integrina es una integrina  $\alpha_v\beta_3$  o una integrina  $\alpha_v\beta_5$ .

30 Esto preferiblemente se relaciona con la prevención o inhibición de migración y/o proliferación de células cancerosas metastásicas en mamíferos, preferiblemente seres humanos.

Un ejemplo particular contemplado es la prevención o inhibición de metástasis de cáncer de mama.

35 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de la proteína sintética como se define en la reivindicación 1 para producir una molécula que:

- (i) es un agonista de complejos de proteínas que comprenden un factor de crecimiento y vitronectina; o
- (ii) es un antagonista de complejos de proteínas que comprenden un factor de crecimiento y vitronectina.

40 En una forma de realización preferida, la invención proporciona el uso de la proteína sintética como se define en la reivindicación 1 para producir una molécula que es un agonista de un complejo proteico que comprende IGF-I, una IGFBP y vitronectina, o para producir un antagonista de un complejo proteico que comprende IGF-I, una IGFBP y vitronectina.

45 Los agonistas y/o antagonistas producidos según este aspecto de la invención pueden tener eficacia particular en fomentar la cicatrización, ingeniería de tejidos, regeneración de la piel y/o prevención de metástasis de células cancerosas o trastornos hiperproliferativos de la piel tales como cicatrización patológica y psoriasis.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona un implante quirúrgico, prótesis, soporte, vendaje para herida o quemadura o similares adecuadamente impregnados, recubiertos o que comprenden de otra manera una proteína sintética como se define en la reivindicación 1.

#### Breve descripción de las figuras y tablas

55 Figura 1. Migración de queratinocitos de piel humana HaCAT sembrados en la cámara superior de Transwells™ de 12  $\mu\text{m}$  de poro hacia la superficie inferior, en respuesta al recubrimiento de la cámara inferior con IGF-II preunido a VN (barras negras), o IGF-II "unido" a las placas en ausencia de VN (barras grises). Cada barra representa el número medio de células en la membrana inferior después de 5 horas de incubación y se obtienen a partir de tres experimentos repetidos en los que se analizaron los tratamientos en pocillos triplicados.

60 Figura 2. Migración de células de cáncer de mama humano MCF-7 sembradas en la cámara superior de Transwells™ de 12  $\mu\text{m}$  de poro hacia la superficie inferior, en respuesta al recubrimiento de la cámara inferior con IGF-II preunido a VN (barras a rayas), o IGF-II "unido" a las placas en ausencia de VN (barras blancas). Cada barra representa el número medio de células en la membrana inferior después de 5 horas de incubación y se obtienen a partir de tres experimentos repetidos en los que se analizaron los tratamientos en pocillos triplicados. Los puntos de los datos donde el efecto del complejo es significativamente diferente al de VN sola se indican por un asterisco.

Figura 3. Migración de células de cáncer de mama humano MCF-7 sembradas en la cámara superior de Transwells™ de 12 µm de poro hacia la superficie inferior que se había recubierto con VN, IGF-II nativo unido a VN (barras a rayas), o L<sup>27</sup>-IGF-II unido a VN (barras negras). Cada punto de los datos se empareja con un control sin VN (barras blancas) que contiene la misma cantidad de IGF-II en ausencia de VN. Cada barra representa el número medio de células en la membrana inferior después de 5 horas de incubación obtenido a partir de dos experimentos repetidos en los que se analizaron los tratamientos en pocillos triplicados.

Figura 4. Migración de células de cáncer de mama humano MCF-7 sembradas en la cámara superior de Transwells™ de 12 µm de poro hacia la superficie inferior que se había preunido con VN sola, IGF-II nativo unido a VN (barras a rayas), o Des(1-6)IGF-II unido a VN (barras negras). Cada punto de los datos se empareja con un control sin VN (barras blancas) que contiene la misma cantidad de IGF-II en ausencia de VN. Cada barra representa el número medio de células en la membrana inferior después de 5 horas de incubación obtenido a partir de dos experimentos repetidos en los que se analizaron los tratamientos en pocillos triplicados.

Figura 5. Migración de células de cáncer de mama humano MCF-7 a través de Transwells™ en respuesta a IGF-II en presencia del Acm 2021Z, un anticuerpo que bloquea la función de α<sub>v</sub>. Se sembraron células MCF-7 que se habían tratado con el Ac que bloquea la función de α<sub>v</sub> en Transwells™ que se habían recubierto con VN +/- IGF-II y se dejaron migrar a través de la membrana porosa durante cinco horas. Se determinó después el número de células que atraviesa la membrana extrayendo el colorante de las células fijadas y leyendo la densidad óptica. Los tratamientos se expresaron después como un porcentaje de células que migra sobre VN sola en presencia o ausencia del Ac. Se juntaron los datos de tratamientos cuadruplicados de un único experimento. *Barras*, EEM. El *asterisco* indica diferencias significativas entre tratamientos de las células sin tratar o tratadas con el Ac (P<0,1).

Figura 6. Migración de células de cáncer de mama humano MCF-7 sembradas en la cámara superior de Transwells™ de 12 µm de poro hacia la superficie inferior que se había recubierto con VN (barra blanca), VN + IGFBP-5 (barra gris); IGF-I nativo + VN (barra sólida más clara) o IGF-I nativo + IGFBP-5 + VN (barra sólida más oscura); L<sup>24</sup>-IGF-I + VN (barra de rayas a la izquierda) o L<sup>24</sup>-IGF-I + IGFBP-5 + VN (barra de rayas a la derecha). Cada barra representa el número medio de células en la membrana inferior después de 5 horas de incubación obtenido a partir de dos experimentos repetidos en los que se analizaron los tratamientos en pocillos triplicados.

Figura 7. La secuencia de aminoácidos de vitronectina (SEQ ID NO: 1), incluyendo referencias de residuos para varios dominios dentro de vitronectina, así como los sitios de modificación de residuos, sitios de unión a ligandos y sitios de reconocimiento de proteasas.

Figura 8. La relación estructural de (a) VN de longitud completa (75 kDa) y (b) VN de yema (54 kDa) que muestra los sitios de unión a ligandos. Tanto la VN de suero de mamífero como aviar tienen la misma estructura de dominios, sin embargo, hay diferencias en la secuencia de aminoácidos. La VN de yema (54 kDa) es una forma truncada de estas proteínas. Las abreviaciones usadas son: Som B, somatomedina B; Unión, dominio de unión, Hemopexina, repetición similar a hemopexina; HBD, dominio de unión a heparina; PAI-1, inhibidor 1 del activador de plasminógeno; uPAR receptor de activador de plasminógeno de tipo uroquinasa; TAT, complejo trombina-antitrombina III; uPA, activador de plasminógeno de tipo uroquinasa; - - - , región polianiónica (región básica); + + + , región policitiónica (región ácida).

Figura 9. Purificación de la VN de yema de 54 kDa a partir de yema de huevo de gallina. Análisis de SDS-PAGE de muestras de proteína cargadas en una matriz de Q-Sepharosa (carril L) y el producto purificado eluido (carril E). El carril M indica los marcadores de peso molecular (marcadores de bajo peso molecular de BioRad) (BioRad, Richmond, CA, EE UU). Para analizar las proteínas se usaron geles en gradiente de poli(acrilamida) del 4-20%, prefabricados (Gradipore, Frenchs Forest, NSW, Australia).

Figura 10. Ensayo de unión a placa sólida que evalúa la capacidad de [<sup>125</sup>I]-IGF-I/IGFBP-3 de unirse a las VN purificadas. El ensayo de unión a placa sólida se llevó a cabo como han descrito previamente Kricker, *et al.*, 2003 *Endocrinology* **144** 2807-2815. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos Immulon con las VN purificadas a 4°C durante la noche. Se añadieron después complejos IGF-I/IGFBP-3 radiomarcados y se dejaron unir a la VN durante la noche después de lo cual se eliminó el material no unido. Se determinó la unión de [<sup>125</sup>I]-IGF-I/IGFBP-3 a VN unido a los pocillos en un contador y (n = 18). VN humana: VN purificada de suero humano; VN de yema 75: VN de yema purificada de 75 kDa; VN de yema 54: VN de yema purificada de 54 kDa.

Figura 11. Ensayo de crecimiento celular (MTT) (48 horas): crecimiento de células HaCAT en respuesta a complejos IGF:VN. Se prerrecubrieron pocillos con los complejos IGF:VN, se sembraron con células HaCAT y se dejaron crecer durante 48 horas. Después de este tiempo se evaluó el crecimiento celular mediante actividad metabólica usando el método MTT (Denizot & Lang, 1986 *The Journal of Immunological Methods* **89** 271-277) (n=3). VN humana: VN purificada de suero humano; VN de yema 75: VN de yema purificada de 75 kDa; VN de yema 54: VN de yema purificada de 54 kDa; IGF-I/IGFBP-3: factor de crecimiento insulínico de tipo I y proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 3.

Figura 12. Ensayo de migración de Transwell™ (5 horas): Migración de HaCAT en respuesta a complejos IGF:VN. Las células HaCAT se sembraron en un Transwell™ recubierto con complejos IGF-I:IGFBP-3:VN y se dejaron migrar durante 5 horas como se ha descrito previamente (Krickler, *et al.*, 2003, anteriormente). Las células que habían migrado se tiñeron con violeta cristal y la densidad óptica se leyó a 595 nm. Cada tratamiento se completó en duplicado (n = 2). VN humana: VN purificada de suero humano; VN de yema 75: VN de yema purificada de 75 kDa; VN de yema 54: VN de yema purificada de 54 kDa; IGF-I/IGFBP-3: factor de crecimiento insulínico de tipo I y proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 3.

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de (A) la proteína vitronectina madura (SEQ ID NO: 2), (B) IGF-I (SEQ ID NO: 3) y (C) secuencias enlazadoras preferidas (SEQ ID NO: 4-8).

Figura 14. De (A) a (N) Secuencias de aminoácidos de formas de realización de proteínas quiméricas que contienen IGF-I y VN (SEQ ID NO: 9-22).

Figura 15. Secuencias de aminoácidos de formas de realización de (A) proteína quimérica que contiene PDGF y VN (SEQ ID NO: 23) y (B) proteína quimérica que contiene VEGF y VN (SEQ ID NO: 24).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención ha surgido a partir del descubrimiento de que complejos proteicos que comprenden IGF-II y VN o IGF-I e IGFBP y VN se unen y ejercen su efecto biológico sobre migración celular a través del receptor IGF-IR y del receptor integrina que se une a VN expresados por células que responden. Más en particular, este hecho de unión dual estimula de forma sinérgica la migración y/o proliferación celular, como han mostrado los presentes inventores tanto en un modelo de queratinocitos como en un modelo de células de cáncer de mama.

Además, sorprendentemente se ha descubierto que el dominio de VN que parece interactuar o unirse con IGF-II y las IGFBP es una región polianiónica que corresponde a los aminoácidos 53-64 de VN madura.

Este descubrimiento ha llevado a los presentes inventores a divulgar un complejo proteico aislado que comprende al menos el dominio o región mínima de IGF-I o IGF-II capaz de unirse a IGF-IR en combinación con el dominio de unión a integrinas de VN. Incluso más en particular, se puede producir una única proteína contigua que comprende estos dominios.

Se espera que tales complejos proteicos, comprendan múltiples proteínas o en forma de una única proteína sintética, se unan o coliguen de forma coordinada a IGF-IR y el receptor integrina que se une a VN y de esta manera sea un agente útil para el fomento de la migración y/o proliferación celular y la cicatrización. De forma análoga, los presentes inventores proponen que se podría usar la prevención de la coligación de IGF-IR y el receptor integrina que se une a VN para prevenir metástasis de células cancerosas. También se propone que este descubrimiento se pueda extender a complejos proteicos que comprendan otros factores de crecimiento tales como PDGF y VEGF, aunque sin limitación a los mismos, y a otras proteínas de unión a integrinas tal como fibronectina (FN).

A lo largo de esta especificación, a menos que se indique de otra manera, “comprenden”, “comprende” y “que comprende” se usan de forma inclusiva más que exclusiva, de modo que un integrante o grupo de integrantes indicado(s) puede incluir uno o más de otros integrantes o grupos de integrantes no indicados.

En el contexto particular de dominios de unión a receptores de factores de crecimiento y dominios de unión a integrinas, tal dominio comprenderá una secuencia de aminoácidos del dominio, junto con otros aminoácidos adicionales según se desee.

Se entenderá también que tal dominio puede “consistir esencialmente en” la secuencia de aminoácidos del dominio, junto con no más de diez, preferiblemente no más de cinco o incluso más preferiblemente no más de cuatro, tres, dos o uno aminoácidos adicionales.

Se entenderá también que tal dominio puede “consistir en” la secuencia de aminoácidos del dominio, en ausencia de cualquier aminoácido adicional.

Para los fines de esta invención, mediante “aislado” se quiere decir material que se ha eliminado de su estado natural o se ha sometido de otra manera a manipulación humana. El material aislado puede estar sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural, o puede estar manipulado de modo que esté en un estado artificial junto con componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. El material aislado puede estar en forma nativa, química sintética o recombinante.

Como se usa en el presente documento, mediante “sintético” se quiere decir que no es natural sino hecho a través de la intervención técnica humana. En el contexto de proteínas y ácidos nucleicos sintéticos, esto abarca moléculas producidas mediante técnicas recombinantes, químicas sintéticas o combinatorias como se entiende bien en la técnica.

Mediante “*proteína*” se quiere decir un polímero de aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales o no naturales, D- o L- aminoácidos como se entiende bien en la técnica. El término “*proteína*” también incluye y abarca tales términos como “*glicoproteína*”, “*lipoproteína*” y similares, como se usan comúnmente en la técnica.

Un “*péptido*” es una proteína que tiene menos de cincuenta (50) aminoácidos.

Un “*polipéptido*” es una proteína que tiene cincuenta (50) o más aminoácidos.

Como se ha descrito aquí anteriormente, en el presente documento se divulga un complejo proteico aislado que comprende:

- (i) un factor de crecimiento o al menos un dominio de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor afín del factor de crecimiento; y
- (ii) al menos un dominio de unión a integrinas de vitronectina o fibronectina.

Como se usa en el presente documento, un “*factor de crecimiento*” es una proteína biológicamente activa que es capaz de regular crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración celular *in vitro* y/o *in vivo*.

Preferiblemente, el factor de crecimiento se selecciona del grupo que consiste en IGF-I, IGF-II, VEGF y PDGF.

Más preferiblemente, el factor de crecimiento se selecciona de IGF-I e IGF-II.

Otras proteínas biológicamente activas que regulan el crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración celular incluyen factor de crecimiento epidérmico (EGF; Heldin *et al.*, 1981, Science **4** 1122-1123), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; Nurcombe *et al.*, 2000, J. Biol. Chem. **275** 30009-30018), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Taraboletti *et al.*, 1997, Cell Growth. Differ. **8** 471-479), osteopontina (Nam *et al.*, 2000, Endocrinol. **141** 1100), trombospondina-1 (Nam *et al.*, 2000, anteriormente), tenascina-C (Arai *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. **271** 6099), PAI-1 (Nam *et al.*, 1997, Endocrinol. **138** 2972), plasminógeno (Campbell *et al.*, 1998, Am. J. Physiol. **275** E321), fibrinógeno (Campbell *et al.*, 1999, J. Biol. Chem. **274** 30215), fibrina (Campbell *et al.*, 1999, anteriormente) o transferrina (Weinzimer *et al.*, 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab. **86** 1806).

Los complejos proteicos aislados divulgados en el presente documento comprenden un factor de crecimiento o al menos un dominio de un factor de crecimiento de un factor de crecimiento que es capaz de unirse al receptor afín del factor de crecimiento.

En este contexto, mediante “*dominio*” se quiere decir al menos esa parte o región de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor afín del factor de crecimiento. Típicamente, aunque no exclusivamente, el receptor afín del factor de crecimiento se expresa por una célula y la unión o ligación de dicho receptor afín del factor de crecimiento por dicho al menos un dominio de un factor de crecimiento provoca una respuesta celular tal como crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración celular.

Con consideración particular a IGF-I, dicho dominio adecuadamente comprende el residuo de aminoácido 24, que no es un residuo de leucina.

Típicamente, dicho residuo es tirosina.

Con consideración particular a IGF-II, dicho dominio adecuadamente comprende el residuo de aminoácido 27, que no es un residuo de leucina.

Típicamente, dicho residuo es tirosina.

Con consideración particular a IGF-I, en una forma de realización dicho dominio consiste en los residuos 1 a 70 de IGF-I.

Dicho dominio puede consistir en los residuos 4 a 70 de IGF-I.

También se entenderá que otro componente de los complejos proteicos aislados divulgados en el presente documento es al menos un dominio de unión a integrinas de vitronectina o fibronectina.

Esto incluye y abarca cualquier dominio de VN o FN que sea capaz de unirse a una integrina  $\alpha_v$ .

Más preferiblemente, el receptor integrina es una integrina  $\alpha_v\beta_3$  o una integrina  $\alpha_v\beta_5$ .

Como se describirá en más detalle posteriormente en el presente documento, los presentes inventores muestran que el HBD de VN (y de forma análoga de FN) no se requiere para la actividad biológica completa de los complejos proteicos aislados.

5 Se apreciará fácilmente a partir de lo anterior que los complejos proteicos aislados divulgados en el presente documento pueden estar en forma de complejos de oligoproteínas asociados de forma no covalente, complejos de oligoproteínas que se han entrecruzado de forma covalente (reversible o irreversiblemente) o en forma de proteínas quiméricas sintéticas.

10 Según esto, en un aspecto particular la invención proporciona una proteína quimérica sintética, capaz de fomentar la migración y/o proliferación celular, que comprende una secuencia de aminoácidos de:

- (i) el factor de crecimiento insulínico de tipo I (IGF-I) que comprende SEQ ID NO: 3; y
- (ii) al menos un dominio de unión a integrinas de vitronectina (VN) que comprende los residuos de aminoácidos 1 a 52 de vitronectina madura (SEQ ID NO: 2);

15 en donde la proteína quimérica sintética no incluye un dominio de unión a heparina (HBD) de VN que corresponde a los residuos 347-459 de VN madura (SEQ ID NO: 2) y en donde la proteína quimérica sintética no comprende una secuencia de aminoácidos de IGFBP.

20 Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica", comprende una secuencia contigua de aminoácidos derivada de un dominio de unión al receptor integrina de VN o FN y un factor de crecimiento o al menos un dominio de unión al receptor de un factor de crecimiento.

25 Aunque sin querer estar unido a ninguna teoría particular, se propone que las proteínas quiméricas sintéticas puedan ser capaces de coligar y coactivar un receptor afín para dicho factor de crecimiento y un receptor integrina para VN o FN para de esta manera estimular, inducir, aumentar o fomentar de otra manera la migración celular.

30 Una ventaja de las proteínas quiméricas según la invención es que se producen fácilmente por medios químicos sintéticos o recombinantes y se espera que sean más estables *in vivo*, ya que no se basan en el mantenimiento de las interacciones proteína-proteína que se requieren en complejos oligoproteicos no covalentes.

35 A este respecto, aunque los complejos proteicos aislados que comprenden dominios de unión al receptor de IGF-I también comprenderían una IGFBP, se propone que según el modo de acción anteriormente mencionado, no esté presente una IGFBP en una quimera sintética IGF-I/VN según la invención.

40 También con respecto a VN, como se describirá con más detalle posteriormente en el presente documento, los presentes inventores muestran que lo más probablemente la región polianiónica de VN (y de forma análoga de FN) sea la que se requiere para la interacción con IGF-II o complejos IGF-I/IGFBP.

Respecto a la figura 7 y la figura 8, la región polianiónica es los residuos 53-64 de la secuencia de VN madura (SEQ ID NO: 2).

45 A la luz de lo anterior, la presente invención proporciona proteínas quiméricas sintéticas que no incluyen el HBD de VN. La región polianiónica de VN también puede no estar incluida.

50 Con respecto a las proteínas VN y secuencias de aminoácidos de las mismas que no incluyen el HBD y/o la región polianiónica, estas pueden ser proteínas naturales tales como la VN de yema de pollo de 54 kDa (que carece del HBD) o pueden estar manipuladas mediante delección, mutación o truncación de una proteína o secuencia de aminoácidos de VN de modo que el HBD y/o la región polianiónica estén ausentes o al menos sean sustancialmente no funcionales.

55 Para este fin se pueden utilizar métodos tales como digestión proteolítica o mutagénesis dirigida, como se entiende bien en la técnica.

En formas de realización particulares, dicho al menos un dominio de unión a integrina de VN tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) residuos de aminoácidos 1 a 459 de VN;
- (ii) residuos de aminoácidos 1 a 379 de VN;
- (iii) residuos de aminoácidos 1 a 130 de VN; y
- (iv) residuos de aminoácidos 1 a 52 de VN.

65 Secuencias adicionales de aminoácidos que también se pueden incluir se seleccionan del grupo que consiste en:

- (v) residuos de aminoácidos 65 a 459 de VN;



- (vi) residuos de aminoácidos 347 a 459 de VN; y
- (vii) residuos de aminoácidos 347 a 379 de VN.

5 Las secuencias mencionadas anteriormente se pueden usar en combinación, por ejemplo, residuos de aminoácidos 1 a 130 de VN y residuos de aminoácidos 347 a 459 de VN o residuos de aminoácidos 1 a 52 de VN.

En la figura 14 se muestran ejemplos particulares no limitantes de proteínas quiméricas que comprenden IGF-I y VN.

10 Además, en la figura 15 se muestran ejemplos particulares no limitantes de proteínas quiméricas que comprenden VEGF y VN o PDGF y VN.

Preferiblemente, las proteínas quiméricas comprenden además una "secuencia enlazadora" localizada entre y contigua a una secuencia de un factor de crecimiento y a una secuencia de aminoácidos de VN o FN.

15 En una forma de realización, dicha secuencia enlazadora comprende uno o más residuos de glicina y uno o más residuos de serina. Se pueden seleccionar ejemplos particulares de secuencias enlazadoras de: Gly<sub>4</sub> Ser (SEQ ID NO: 4); Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 5) y (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 6) aunque sin limitación a las mismas.

20 En otra forma de realización, la secuencia enlazadora incluye un sitio de reconocimiento de corte por plasmina, tal como según la secuencia:

Leu Ile Lys Met Lys Pro (SEQ ID NO: 7)

25 En aún otra forma de realización, la secuencia enlazadora incluye un sitio de reconocimiento de corte por colagenasa-3, tal como según la secuencia:

Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (SEQ ID NO: 8)

30 También se divulga el uso de fragmentos biológicamente activos de las proteínas quiméricas sintéticas de la invención y/o el uso de fragmentos biológicamente activos de los dominios de unión a receptores de factores de crecimiento y dominios de unión a integrinas particulares ejemplificados en el presente documento.

35 En una forma de realización, dicho "fragmento biológicamente activo" tiene no menos del 10%, preferiblemente no menos del 25%, más preferiblemente no menos del 50% e incluso más preferiblemente no menos del 75, 80, 85, 90 o 95% de una actividad biológica de una proteína de la deriva.

40 En otra forma de realización, dicho "fragmento biológicamente activo" tiene no menos del 10%, preferiblemente no menos del 25%, más preferiblemente no menos del 50% e incluso más preferiblemente no menos del 75, 80, 85, 90 o 95% de una secuencia contigua de aminoácidos de una proteína de la que deriva.

Ejemplos específicos de fragmentos biológicamente activos de VN, por ejemplo que carecen de un HBD y/o el dominio polianiónico, se proporcionan en el presente documento en la figura 14.

45 También se contemplan complejos proteicos variantes de la invención.

Típicamente, y respecto a proteínas, una proteína "variante" tiene uno o más aminoácidos que se han sustituido por aminoácidos diferentes. Se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos se pueden cambiar a otros con propiedades muy similares sin cambiar la naturaleza de la actividad de la proteína (sustituciones conservadoras).

50 Se apreciará que uno o más residuos de aminoácidos de una secuencia de referencia, tal como un factor de crecimiento, dominio de unión al receptor de un factor de crecimiento, un dominio de unión a integrina de VN, las IGFBP o uno o más residuos correspondientes a presentes en una proteína quimérica sintética, se pueden modificar o deletar, o añadir secuencias adicionales, sin cambiar sustancialmente la actividad biológica del complejo proteico aislado de la invención.

55 Mutaciones específicas en VN madura (SEQ ID NO: 2) que contempla la presente invención incluyen: (i) T50A; (ii) T57A; (iii) T50E; (iv) T57E; (v) S378E; (vi) S378A; y (v) S362E.

60 En una forma de realización, una variante de proteína comparte al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80% y más preferiblemente al menos el 90%, el 95%, el 98% o el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia.

65 Preferiblemente, la identidad de secuencia se mide sobre al menos el 60%, más preferiblemente sobre al menos el 75%, más preferiblemente sobre al menos el 90% o más preferiblemente sobre al menos el 95%, el 98% o sustancialmente la longitud completa de la secuencia de referencia.

- Para determinar el porcentaje de identidad de secuencia, se pueden realizar alineamientos óptimos de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (Program Geneworks por Intelligentics; GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de genética de Wisconsin versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE UU, incorporado en el presente documento mediante referencia) o mediante inspección y el mejor alineamiento (es decir, que produce el porcentaje más alto de homología sobre la ventana de comparación) generado por cualquiera de los varios métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia BLAST de programas como por ejemplo, divulgan Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. **25** 3389, que se incorpora en el presente documento mediante referencia.
- En otro ejemplo, se puede entender que "identidad de secuencia" significa el "porcentaje de concordancia" calculado por el programa informático DNASIS (versión 2.5 para Windows; disponible de Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, EE UU).
- Se puede encontrar una discusión detallada de análisis de secuencia en la unidad 19.3 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999).
- También se divulgan derivados de un dominio de unión a un receptor de un factor de crecimiento, un dominio de unión a integrinas de VN o FN, o un complejo proteico aislado que comprende los mismos.
- Como se usa en el presente documento, las proteínas "*derivadas*" de la invención se han alterado, por ejemplo, mediante adición, conjugación o formación de complejos con otros grupos químicos o mediante técnicas de modificación postraduccionales como se entiende bien en la técnica.
- "Adiciones" de aminoácidos puede incluir fusión de polipéptidos o variantes de los mismos con otros polipéptidos o proteínas. La otra proteína puede, a modo de ejemplo, ayudar en la purificación de una proteína. Por ejemplo, estas incluyen una etiqueta de polihistidina, proteína de unión a maltosa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína A o glutatión S-transferasa (GST).
- Otros derivados contemplados por la invención incluyen, pero no están limitados a, modificación de las cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas y el uso de entrecruzadores y otros métodos que imponen restricciones conformacionales en los polipéptidos, fragmentos y variantes de la invención. Ejemplos de modificaciones de cadenas laterales contempladas por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tal como mediante acilación con anhídrido acético; acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidrofáltico; amidinación con metilacetimidato; carbamoilación de grupos amino cianato; piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por reducción con NaBH<sub>4</sub>; alquilación reductora mediante reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH<sub>4</sub>; y trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS).
- El grupo carboxilo se puede modificar mediante activación con carbodiimida a través de la formación O-acilisourea seguida por derivación posterior, a modo de ejemplo, a una amida correspondiente.
- El grupo guanidino de los residuos de arginina se puede modificar mediante formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y gloxal.
- Los grupos sulfhidrilo se pueden modificar por métodos tales como oxidación con ácido perbórico a ácido cisteico; formación de derivados de mercurio usando ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, benzoato de 4-cloromercurio; 2-cloromercurio-4-nitrofenol, cloruro de fenilmercurio y otros mercuriales; la formación de un disulfuro mezcla con otros compuestos tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; y carbamoilación con cianato a pH alcalino.
- Los residuos de triptófano se pueden modificar, por ejemplo, mediante alquilación del anillo de indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfonilo o mediante oxidación con N-bromosuccinimida.
- Los residuos de tirosina se pueden modificar mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado 3-nitrotirosina.
- El anillo de imidazol de un residuo de histidina se puede modificar mediante N-carboxilación con dietilpirocarbonato o mediante alquilación con derivados de ácido yodoacético.
- Ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de péptidos incluyen, pero no están limitados al, uso de ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, t-butilglicina, norleucina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, 2-tienil alanina y/o isómeros D de aminoácidos.
- Se proporciona un ejemplo de métodos adecuados para la derivación química de proteínas en el capítulo 5 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., John Wiley & Sons NY (1995-2001).

Los complejos proteicos aislados, y los componentes proteicos individuales de los mismos, (incluyendo fragmentos, variantes, derivados y homólogos) se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado que conocen los expertos en la materia.

En una forma de realización, las proteínas de la invención se producen por síntesis química. Las técnicas de síntesis química se conocen bien en la técnica, aunque el experto en la materia se puede referir al capítulo 18 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons NY (1995-2001) para ejemplos de metodología adecuada.

En otra forma de realización, las proteínas se pueden preparar como una proteína recombinante.

La producción de proteínas recombinantes se conoce bien en la técnica, el experto en la materia se puede referir a protocolos estándar como por ejemplo los descritos en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), incorporado en el presente documento mediante referencia, en particular las secciones 16 y 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), incorporada en el presente documento mediante referencia, en particular los capítulos 10 y 16; y CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999) que se incorpora mediante referencia en el presente documento, en particular los capítulos 1, 5 y 6.

En una forma de realización, se produce una proteína recombinante mediante un método que incluye los pasos de:

- (i) preparar una construcción de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica dicha proteína, operativamente unido a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un vector de expresión;
- (ii) transfectar o transformar una célula huésped con la construcción de expresión; y
- (iii) expresar la proteína recombinante en dicha célula huésped.

Un “vector de expresión” puede ser un vector extracromosómico que se autorreplica tal como un plásmido o un vector que se integra en el genoma de un huésped.

Mediante “operativamente unido” u “operativamente conectado” se quiere decir que dicha(s) secuencia(s) de nucleótidos reguladora(s) se coloca(n) relativa(s) al ácido nucleico recombinante de la invención para iniciar, regular o controlar de otra manera la transcripción del ácido nucleico, o traducción de una proteína codificada por el ácido nucleico.

Las secuencias de nucleótidos reguladoras en general serán apropiadas para la célula huésped usada para la expresión. En la técnica se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células huésped.

Típicamente, dicha una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no están limitadas a, secuencias promotoras, secuencias líder o señal, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, secuencias donantes/ceptoras de ajuste y secuencias potenciadoras o activadoras.

Los promotores constitutivos (tales como los promotores de CMV, RSV, adenovirus, SV40 y factor de elongación humano) y los promotores inducibles/represibles (tales como los promotores represibles tet e inducibles por IPTG, metalotioneína o ecdisoma) se conocen bien en la técnica y se contemplan por la invención. También se apreciará que los promotores pueden ser promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor.

La construcción de expresión también puede incluir un compañero de fusión (típicamente proporcionado por el vector de expresión) de modo que la proteína recombinante de la invención se expresa como un polipéptido de fusión con dicho compañero de fusión. La ventaja principal de los compañeros de fusión es que ayudan a la identificación y/o purificación de dicha proteína de fusión.

Ejemplos bien conocidos de compañeros de fusión incluyen, pero no están limitados a, glutatión S-transferasa (GST), la parte Fc de la IgG humana, proteína de unión a maltosa (MBP) y hexahistidina (HIS<sub>6</sub>), que son particularmente útiles para el aislamiento de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para los fines de purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad, las matrices relevantes para cromatografía de afinidad son resinas conjugadas a glutatión, amilosa y níquel o cobalto, respectivamente. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de “kit”, tal como el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con compañeros de fusión de (HIS<sub>6</sub>) y el sistema de purificación de GST de Pharmacia.

En algunos casos, los compañeros de fusión también tienen sitios de corte de proteasas, tales como factor X<sub>a</sub> o trombina, lo que permite a la proteasa relevante digerir parcialmente la proteína de fusión de la invención y de esta manera liberar el polipéptido recombinante de la invención de la misma. La proteína liberada se puede aislar después del compañero de fusión mediante separación cromatográfica posterior.

Los compañeros de fusión según la invención también incluyen dentro de su ámbito “*etiquetas epítomos*”, que habitualmente son secuencias cortas de péptidos para las que está disponible un anticuerpo específico. Ejemplos bien conocidos de etiquetas epítomos para las que están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales incluyen etiquetas c-myc, hemaglutinina y FLAG.

Las células huésped adecuadas para la expresión pueden ser procariotas o eucariotas, tales como *Escherichia coli* (DH5α, por ejemplo), células de levadura, células Sf9 utilizadas con un sistema de expresión de baculovirus, células CHO, células COS, CV-1, NIH 3T3 y 293, aunque sin limitación a las mismas.

Las construcciones de expresión también pueden incluir una o más secuencias de nucleótidos de marcadores de selección que confieren a la célula huésped transformada resistencia a un agente de selección. Los marcadores de selección útiles para los fines de selección de bacterias transformadas incluyen *bla*, *kanR* y *tetR* mientras que las células eucariotas transformadas se pueden seleccionar mediante marcadores tales como higromicina, G418 y puromicina, aunque sin limitación a los mismos.

Con respecto a la introducción de material genético en las células huésped, los términos “*transformar*” y “*transfectar*” se usan en general para describir la introducción de material genético en una célula huésped. Hay muchos métodos bien conocidos para introducir material genético exógeno en una célula huésped incluyendo, pero no limitado a, precipitación con fosfato de calcio, electroporación, distribución por lipofectamina, lipofectina y otros agentes lipofílicos, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, bombardeo con micropartículas, microinyección y fusión de protoplastos.

#### Ácidos nucleicos aislados

La invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una proteína quimérica sintética de la invención, incluyendo variantes y homólogos de la misma.

El término “*ácido nucleico*” como se usa en el presente documento designa ARNm, ARN, ARNc, ARNi y ADN, incluyendo ADNc y ADN genómico, mono o bicatenarios e híbridos ADN-ARN.

Un “*polinucleótido*” es un ácido nucleico que tiene ochenta (80) o más nucleótidos contiguos, mientras que un “*oligonucleótido*” tiene menos de ochenta (80) nucleótidos contiguos.

Una “*sonda*” puede ser un oligonucleótido mono o bicatenario, adecuadamente marcado para el fin de detectar secuencias complementarias en transferencias tipo Northern o Southern, por ejemplo.

Un “*cebador*” habitualmente es un oligonucleótido monocatenario, que tiene preferiblemente de 15-50 nucleótidos contiguos, que es capaz de hibridar con un “*molde*” de ácido nucleico complementario y extenderse de una manera dependiente del molde mediante la acción de una ADN polimerasa tal como Taq polimerasa, ADN polimerasa dependiente de ARN o Sequenase™.

Los ácidos nucleicos sintéticos de la invención se pueden producir mediante planteamientos sintéticos químicos o por métodos recombinantes que utilizan técnicas de amplificación de la secuencia de ácido nucleico, o una combinación de los mismos, como se sabe bien en la técnica.

Los cebadores y oligonucleótidos químicamente sintetizados, sintetizadores y tecnologías asociadas útiles según la presente invención típicamente están disponibles en la mayoría de los laboratorios o se pueden adquirir de fuentes comerciales.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos adecuadas las conoce bien el experto en la materia, e incluyen, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacción en cadena de la ligasa (LCR) como por ejemplo se describe en el capítulo 15 de Ausubel et al., anteriormente; amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) como se describe, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 5.422.252; replicación en círculo rodante (RCR) como se describe, por ejemplo, en Liu et al., 1996, J. Am. Chem. Soc. **118** 1587, solicitud internacional WO 92/01813 y solicitud internacional WO 97/19193; amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) como describen, por ejemplo, Sooknanan et al., 1994, Biotechniques **17** 1077; y amplificación con replicasa Q-β como describen, por ejemplo Tyagi et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93** 5395, aunque sin limitación a las mismas.

Una técnica de amplificación de la secuencia de ácido nucleico preferida es PCR.

Como se usa en el presente documento, un “*producto de amplificación*” se refiere a un producto de ácido nucleico generado mediante una técnica de amplificación de ácido nucleico.

También se apreciará que al producir y expresar los ácidos nucleicos de la invención se puede sacar partido respecto a la redundancia de secuencias de codones, de modo que los ácidos nucleicos ejemplificados en el

presente documento se pueden modificar fácilmente sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificada por los mismos.

5 En formas de realización particulares, los ácidos nucleicos se pueden optimizar según un “*uso de codones*” preferido de una célula huésped que se va a usar para la expresión recombinante, como se sabe bien en la técnica. Esto puede “*adaptar*” eficazmente un ácido nucleico para la expresión óptima en un organismo particular, o células del mismo, donde el uso de codones preferentes afecta la expresión de la proteína.

10 Por tanto, la invención incluye ácidos nucleicos sintéticos que son homólogos a los ácidos nucleicos ejemplificados en el presente documento.

15 En una forma de realización, los homólogos de ácido nucleico comparten al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90% e incluso más preferiblemente al menos el 95% de identidad de secuencia con un ácido nucleico que codifica cualquiera de las construcciones de la proteína quimérica sintética descritas en el presente documento.

20 Preferiblemente, la identidad de secuencia se mide sobre al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, el 95% o de forma ventajosa sobre sustancialmente la longitud total del ácido nucleico codificante de la invención.

En otra forma de realización, los homólogos del ácido nucleico hibridan con un ácido nucleico que codifica cualquiera de las construcciones de la proteína quimérica sintética descrita en el presente documento en condiciones muy rigurosas.

25 “*Hibridar e hibridación*” se usan en el presente documento para indicar el apareamiento de secuencias de nucleótidos al menos parcialmente complementarias para producir dúplex ADN-ADN, ARN-ARN o ADN-ARN. Las secuencias hibridadas se producen mediante el apareamiento de bases entre purinas y pirimidinas complementarias como se sabe bien en la técnica.

30 A este respecto, se apreciará que las purinas modificadas (por ejemplo, inosina, metilinosina y metiladenosina) y las pirimidinas modificadas (tiouridina y metilcitosina) también se pueden comprometer en el apareamiento de bases.

35 “*Rigurosidad*” como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de temperatura y fuerza iónica, y presencia o ausencia de ciertos solventes orgánicos y/o detergentes durante la hibridación. Cuanto mayor sea la rigurosidad, mayor será el nivel de complementariedad requerido entre las secuencias de nucleótidos que hibridan.

“*Condiciones rigurosas*” designa esas condiciones en las que solo hibridarán ácidos nucleicos que tienen una alta frecuencia de complementariedad.

40 La referencia en el presente documento a condiciones muy rigurosas incluye y abarca:

- (i) desde al menos aproximadamente el 31% v/v hasta al menos aproximadamente el 50% v/v de formamida y desde al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M de sal para la hibridación a 42°C, y al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M de sal para los lavados a 42°C;
- 45 (ii) BSA al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para la hibridación a 65°C, y (a) SSC 0,1 x, SDS al 0,1%; o (b) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,2), SDS al 1% para los lavados a una temperatura que supere los 65°C durante aproximadamente una hora; y
- 50 (iii) SSC 0,2 x, SDS al 0,1% para lavar a o por encima de 68°C durante aproximadamente 20 minutos.

En general, el lavado se lleva a cabo a  $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C)\% - 12^\circ\text{C}$ . En general la  $T_m$  de un ADN bicatenario disminuye en alrededor de 1°C con un aumento del 1% en el número de bases mal apareadas.

55 A pesar de lo anterior, las condiciones rigurosas se conocen bien en la técnica, tal como se describe en los capítulos 2.9 y 2.10 de Ausubel *et al.*, anteriormente y en particular en las páginas 2.9.1 a 2.9.20.

### Anticuerpos

60 También se divulgan anticuerpos contra una proteína quimérica sintética incluidas proteínas quiméricas, o fragmentos, variantes y/o derivados de las mismas. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se pueden encontrar protocolos bien conocidos aplicables a la producción, purificación y uso de anticuerpos, por ejemplo, en el capítulo 2 de Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons NY, 1991-1994) y Harlow, E. & Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, que se incorporan ambos al presente documento mediante referencia.

65

Los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Los expertos en la materia conocen bien métodos para la producción de anticuerpos policlonales. Se describen protocolos ejemplares que se pueden usar, por ejemplo, en Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, anteriormente, y en Harlow & Lane, 1988, anteriormente.

En lugar de los antisueros policlonales obtenidos en la especie de producción, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando el método estándar como se describe, por ejemplo, en un artículo por Köhler & Milstein, 1975, Nature **256**, 495, que se incorpora en el presente documento mediante referencia, o por modificaciones más recientes del mismo, como por ejemplo, se describe en Coligan *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, anteriormente, mediante inmortalización de células del bazo u otras células productoras de anticuerpos derivadas de una especie de producción que se ha inoculado con uno o más de los polipéptidos, fragmentos, variantes o derivados de la invención.

También se divulgan anticuerpos que comprenden fragmentos Fc o Fab de los anticuerpos policlonales o monoclonales referidos anteriormente. De forma alternativa, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) contra las proteínas BIXP de la invención. Tales scFv se pueden preparar, por ejemplo, según los métodos descritos respectivamente en la patente en EE UU No. 5.091.513, patente europea No. 239.400 o el artículo de Winter & Milstein, 1991, Nature **349** 293, que se incorporan en el presente documento mediante referencia.

Se pueden asociar marcadores con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El marcador se puede seleccionar de un grupo que incluye un cromógeno, un catalizador, una enzima, un fluoróforo, una molécula quimioluminiscente, un ión lantánido tal como europio (Eu<sup>34</sup>), un radioisótopo y un marcador visual directo. En el caso de un marcador visual directo, se puede hacer uso de una partícula coloidal metálica o no metálica, una partícula colorante, una enzima o un sustrato, un polímero orgánico, una partícula de látex, un liposoma, u otra vesícula que contiene una sustancia que produce una señal y similares.

Se divulgan un gran número de enzimas útiles como marcadores en las especificaciones de patente en los Estados Unidos U.S. 4.366.241, U.S. 4.843.000 y U.S. 4.849.338, todas las cuales se incorporan en el presente documento mediante referencia. Los marcadores enzimáticos útiles en la presente invención incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, luciferasa, b-galactosidasa, glucosa oxidasa, lisozima, malato deshidrogenasa y similares. El marcador enzimático se puede usar solo o en combinación con una segunda enzima en solución.

A modo de ejemplo, el fluoróforo puede ser isotiocianato de fluoresceína (FITC), verde oregón, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITL), alofocianina (APC) y R-ficoeritrina (RPE), aunque sin limitación a los mismos.

### **Composiciones farmacéuticas**

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas quiméricas sintéticas de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para fomentar o facilitar de otra manera la migración celular, regeneración tisular y cicatrización. De forma alternativa, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar para prevenir la metástasis tumoral mediante la prevención o inhibición de la migración de células tumorales a un sitio secundario.

La composición se puede usar en tratamientos terapéuticos o profilácticos según se requiera. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden aplicar en forma de preparaciones terapéuticas o cosméticas para reparación de la piel, cicatrización, curación de quemaduras y otros tratamientos dermatológicos.

A este respecto, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar junto con, o como un componente de, un biomaterial, biopolímero, material inorgánico tal como hidroxiapatita o derivados de la misma, implantes quirúrgicos, prótesis, vendaje de heridas o quemaduras, compresa, vendas o similares adecuadamente impregnadas, recubiertas o que comprenden de otra manera la composición farmacéutica.

De forma adecuada, la composición farmacéutica comprende un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, el soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración a mamíferos, y más preferiblemente, a seres humanos.

Mediante "soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia de encapsulación que se puede usar de forma segura en la administración sistémica. Dependiendo de la vía de administración particular, se pueden usar una variedad de soportes bien conocidos en la técnica. Estos soportes se pueden seleccionar de un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus

derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido algínico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y sales tales como sales de ácidos minerales incluyendo, clorhidratos, bromuros y sulfatos, ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos y malonatos y agua sin pirógenos.

5 Una referencia útil que describe soportes, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. EE UU, 1991) que se incorpora al presente documento mediante referencia.

10 Se puede emplear cualquier vía de administración segura para proporcionar a un paciente la composición de la invención. Por ejemplo, se puede emplear oral, rectal, parenteral, sublingual, yugal, intravenosa, intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, por inhalación, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica y similares.

15 Las formas farmacéuticas incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, pastillas, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas farmacéuticas también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este fin u otras formas de implantes modificados para actuar además de esta manera. La liberación controlada del agente terapéutico se puede realizar mediante recubrimiento del mismo, por ejemplo, con polímeros hidrofóbicos incluyendo resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico y ciertos derivados de celulosa tal como hidroxipropilmetilcelulosa. Además, la liberación controlada se puede realizar mediante el uso de otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

20 Las composiciones anteriores se pueden administrar de una manera compatible con la formulación farmacéutica, y en tal cantidad que sea farmacéuticamente eficaz. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para llevar a cabo una respuesta beneficiosa en un paciente durante un periodo de tiempo apropiado. La cantidad de agente(s) que se va a administrar puede depender del sujeto que se va a tratar incluyendo la edad, sexo, peso y estado general de salud del mismo, factores que dependerán del juicio del médico.

25 Con respecto a las composiciones farmacéuticas para la cicatrización, se hace referencia particular a la patente en EE UU 5.936.064 y la publicación internacional WO 99/62536 que se incorporan al presente documento mediante referencia.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir vectores de expresión tales como vectores víricos tales como vaccinia y vectores víricos útiles en terapia génica. Los últimos incluyen adenovirus y virus adenoasociados (AAV) tal como se describe en Braun-Falco *et al.*, 1999, Gene Ther. **6** 432, vectores retrovíricos y lentivíricos tal como se describen en Buchshacher *et al.*, 2000, Blood **95** 2499 y vectores derivados del virus del herpes simple y citomegalovirus. Se proporciona una visión de conjunto general de los vectores víricos útiles en terapia génica endocrina en Stone *et al.*, 2000, J. Endocrinol. **164** 103.

35 La presente invención también puede utilizar vectores de expresión específicos que se dirigen a la expresión génica a células epidérmicas, tal como se describen en la patente en los Estados Unidos 5.958.764 y para aplicaciones de cicatrización *in vivo*, tal como se describe en la patente en los Estados Unidos 5.962.427.

#### 45 **Usos terapéuticos**

La invención proporciona usos terapéuticos de las proteínas quiméricas sintéticas de la invención. Estos usos se dirigen particularmente al tratamiento terapéutico y/o profiláctico de mamíferos, y más particularmente, de seres humanos.

50 Sin embargo, los usos terapéuticos según la invención también pueden ser aplicables a mamíferos tales como animales domésticos y de compañía, animales de competición tales como caballos, camellos y galgos, ganado, animales de laboratorio y animales usados como fuentes de células, órganos y tejidos para xenotrasplantes.

55 También se divulgan métodos de tratamiento cosmético donde se administran complejos proteicos aislados incluidos de las proteínas quiméricas sintéticas de la invención para mejorar o aumentar la calidad de la piel o el aspecto de la piel.

60 Tales tratamientos pueden incluir prevención o remedio de trastornos de la piel tales como psoriasis y cicatrización hipertrófica que resultan de la proliferación anormal de células de la piel.

65 De forma alternativa, se divulgan métodos de tratamiento mediante los cuales se previene o inhibe la metástasis tumoral bloqueando la migración de las células del tumor a un sitio secundario. Además, también se contemplan métodos de tratamiento del cáncer bloqueando la proliferación celular.

En formas de realización particulares, los usos terapéuticos y/o profilácticos pueden utilizar proteínas quiméricas sintéticas de la invención, junto con, o como un componente de, un biomaterial, biopolímero, material inorgánico tal como fluorohidroxiapatita, implantes quirúrgicos, prótesis, vendajes de heridas o quemaduras, compresas, vendas o similares adecuadamente impregnadas, recubiertas o que comprenden de otra manera el complejo proteico aislado.

Tales métodos incluyen la administración de composiciones farmacéuticas como se han definido en el presente documento anteriormente, y puede ser por vía de inyección con microaguja en sitios específicos de tejido, tal como se describe en la patente en EE UU 6.090.790, cremas tópicas, lociones o vendajes protectores aplicados a las heridas, quemaduras o úlceras, tal como se describe en la patente en EE UU 6.054.122 o implantes que liberan la composición tal como se describe en la publicación internacional WO99/47070.

La terapia génica también es aplicable a este respecto, tal como según los métodos expuestos en la patente en los Estados Unidos 5.962.427.

También existen métodos por los cuales se pueden modificar genéticamente células de piel para los fines de crear sustitutos de piel, tal como manipulando genéticamente la expresión del factor de crecimiento deseado (Supp *et al.*, 2000, J. Invest. Dermatol. **114** 5). Se proporciona un ejemplo de una revisión de este campo en Bevan *et al.*, Biotechnol. Gent. Eng. Rev. **16** 231.

También se contempla "sembrar" un receptor con células transfectadas o transformadas, tal como se describe en la publicación internacional WO99/11789.

Estos usos se pueden usar para estimular la migración celular y de esta manera facilitar o progresar la cicatrización de heridas y quemaduras, reparación de lesiones de piel tal como úlceras, reemplazo e injerto de tejido tal como mediante cultivo *in vitro* de piel autóloga, reepitelización de órganos internos tales como riñón y pulmón y reparación de tejido nervioso dañado.

La terapia de reemplazo de piel se ha vuelto bien conocida en la técnica, y puede emplear el uso de líneas de células epiteliales/queratinocitos cocultivadas, por ejemplo como se describe en Kehe *et al.*, 1999, Arch. Dermatol. Res. **291** 600 o cultivo *in vitro* de células primarias (habitualmente autólogas) epidérmicas, dérmicas y/o queratinocitos. Estas técnicas también pueden utilizar biomateriales manipulados y "soportes" poliméricos sintéticos.

Se proporcionan ejemplos de revisiones de este campo en general en Terskikh & Vasiliev, 1999, Int. Rev. Cytol. **188** 41 y Eaglestein & Falanga, 1998, Cutis **62** 1.

Más en particular, se describe la producción de sustituto de la mucosa bucal útil en cirugía craneofacial en Izumi *et al.*, 2000, J. Dent. Res. **79** 798. Se pueden expandir queratinocitos fetales y fibroblastos dérmicos *in vitro* para producir piel para injertos para tratar lesiones en la piel, tal como se describe en Fauza *et al.*, J. Pediatr. Surg. **33** 357, mientras que se ha mostrado que los sustitutos de piel de elementos dérmicos y epidérmicos de la piel cultivados *in vitro* sobre biomateriales derivados de ácido hialurónico son potencialmente útiles en el tratamiento de quemaduras (Zacchi *et al.*, 1998, J. Biomed. Mater. Res. **40** 187).

También se contemplan soportes poliméricos para el fin de facilitar la ingeniería de sustitutos de piel, como por ejemplo, se describe en Sheridan *et al.*, 2000, J. Control Release **14** 91 y Fauza *et al.*, 1998, anteriormente, como son microesferas como agentes para la distribución de células de piel a heridas y quemaduras (LaFrance & Armstrong, 1999, Tissue Eng. **5** 153).

### Producción de agonistas y antagonistas

La invención contempla el uso de proteínas quiméricas sintéticas de la invención para identificar, cribar, diseñar o producir de otra manera agonistas o antagonistas de complejos que comprenden un factor de crecimiento y vitronectina, tales como complejos IGF-I:IGFBP:VN. Tales agentes pueden ser un "mimético". El término "mimético" se usa en el presente documento para referirse a moléculas que se diseñan para parecerse a regiones funcionales particulares de proteínas o péptidos, e incluye dentro de su ámbito los términos "agonista", "análogo" y "antagonista" como se entienden bien en la técnica.

En una forma de realización, se producen agonistas que mimetizan la unión de los receptores IGF-IR y de VN por los complejos IGF-I:IGFBP:VN. Tales moléculas pueden tener utilidad como estimulantes de la migración celular tal como se requiere para la cicatrización, regeneración de piel y similares.

En otra forma de realización, se producen antagonistas que previenen o inhiben la unión de los receptores IGF-IR y de VN por los complejos IGF-I:IGFBP:VN. Tales moléculas pueden tener utilidad como inhibidores de la migración celular y/o proliferación celular y de esta manera constituyen agentes antitumorales útiles y también en tratamientos de trastornos de piel tales como psoriasis y cicatrización hipertrófica que resultan de proliferación celular anormal.



Los miméticos, agonistas, antagonistas y análogos anteriormente mencionados pueden ser péptidos, polipéptidos u otras moléculas orgánicas, preferiblemente moléculas orgánicas pequeñas, con una actividad biológica y semivida deseada.

5 La búsqueda en bases de datos estructurales asistida por ordenador se utiliza cada vez más como un procedimiento para identificar miméticos. Los métodos de búsqueda en bases de datos que, en principio, pueden ser adecuados para identificar miméticos, se pueden encontrar en la publicación internacional WO 94/18232 (dirigida a la producción de miméticos de antígenos de VIH), patente en los Estados Unidos No. 5.752.019 y publicación internacional WO 97/41526 (dirigida a la identificación de miméticos de EPO), cada una de las cuales se incorpora en el presente documento mediante referencia.

15 Otros métodos incluyen una variedad de técnicas biofísicas que identifican interacciones moleculares. Estas permiten el cribado de moléculas candidatas según si dicha molécula candidata afecta a la formación de complejos IGF-IGFBP-VN, por ejemplo. Los métodos aplicables a técnicas potencialmente útiles tales como ensayos competitivos de unión de radioligandos (véase, Upton *et al.*, anteriormente, para un método relevante), ultracentrifugación analítica, microcalorimetría, resonancia de plasmón de superficie y métodos ópticos basados en biosensores se proporcionan en el capítulo 20 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan *et al.*, (John Wiley & Sons, 1997) que se incorpora al presente documento mediante referencia.

20 Para que la presente invención se pueda entender y poner en efecto práctico más fácilmente, se refiere al experto en la materia a los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### 25 Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

##### Cultivo de células

30 La línea de células de carcinoma de mama humano MCF-7 (ATCC# HTB-22) se cultivó en medio DMEM/F12 de Hams (DMEM/F12) (1:1) (Life Technologies, Mulgrave, VIC, Australia) que contenía SFT al 10%. El medio se cambió a diario y las células se pasaron al 80% de confluencia usando solución de tripsina al 0,25%/ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) 0,5 mM (Oxoid, Hampsire, Inglaterra).

35 La línea celular de queratinocitos de piel humana HaCAT se obtuvo del profesor Norbert Fusenig (Centro Alemán de Investigación del Cáncer (DKFZ) Im Neuenheimer Feld, Heidelberg). La línea de células HaCAT se cultivó en medio DMEM (Life Technologies) que contenía SFT al 10%. El medio se cambió a diario y las células se pasaron al 80% de confluencia usando solución de tripsina al 0,25%/EDTA 0,5 mM (Oxoid).

##### 40 Preunión de los IGF a VN y las IGFBP

45 La mayoría de los ensayos *in vitro* que examinan la función celular añaden factores exógenos en solución, por tanto las células se bañan en la solución que contiene la sustancia durante todo el ensayo. Este no es el entorno que las células encuentran *in vivo*. Más bien, las células en los tejidos están apoyadas y rodeadas por una MEC sintetizada por las células, en la que se localizan hormonas y otras sustancias. En este estudio, que específicamente aborda la unión de un factor de crecimiento a una molécula de la MEC, se empleó una estrategia de unir previamente VN, IGF e IGFBP al plástico de las placas de cultivo en placas de 24 pocillos y a la cámara inferior y superficie de membrana de Transwells™ de Costar de 12,0 µl de poro (Costar, Nueva York, NY, EE UU) en un intento de reflejar de forma más exacta el entorno *in vivo*.

50 Se añadieron trescientos microlitros de medio DMEM o DMEM/F12 que contenían de 300-1000 ng de VN (Promega, Annandale, NSW, Australia) a placas de cultivo de células de 24 pocillos o la cámara inferior de un Transwell™ y se incubó a 37°C durante 2 horas. Se eliminó el medio que contenía VN sin unir y los pocillos se lavaron con 1 ml de tampón de unión Hepes (HBB) que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5% (grado RIA) (Sigma-Aldrich). Se añadieron después trescientos µl de HBB que contenía BSA al 1,0% a los pocillos y se incubó a 37°C durante 30 minutos para bloquear los sitios de unión no específicos en las placas de cultivo de tejido. Después se lavaron los pocillos de nuevo con 1 ml de HBB que contenía BSA al 0,5%. Se añadieron luego trescientos µl de HBB que contenía BSA al 0,5% y IGF-II o IGF-I + IGFBP (GroPep, Adelaida, SA, Australia) y las placas se incubaron de nuevo durante 2 horas. La solución que contenía los IGF y las IGFBP sin unir se eliminó y los pocillos se lavaron con HBB y se secaron al aire en campanas de flujo laminar.

##### Ensayos de migración

65 Los ensayos de migración se realizaron esencialmente como se describe en Leavesley *et al.*, 1993, Journal of Cell Biology **121**:163-70. Se sembraron cincuenta mil células que se habían ayunado de suero mediante incubación en

medio sin suero durante 4 horas en la cámara superior de un Transwell™ de Costar de 12,0 µm de poro (formato de placa de 12 pocillos). Las células que habían migrado en la superficie inferior de la membrana porosa después de 5 horas de incubación a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%, se fijaron, después se tiñeron con violeta cristal en tampón borato 0,1 mM (pH 9). Se estimó el número de células unidas mediante extracción del violeta cristal en ácido acético al 10% y determinación de la absorbancia de estos extractos mediante espectrofotometría.

#### *Análisis estadístico*

Los datos se analizaron expresando primero todos los datos como un porcentaje del control negativo (-VN, -IGF, -IGFBP). Se probaron después las respuestas para significancia frente a controles de VN sola y controles de IGF solo usando una prueba de la t de Student bilateral homocedástica. Los valores de p menores de 0,05 indican respuestas que eran significativamente diferentes.

### **Resultados**

#### *Migración*

La migración celular es un proceso clave en la cicatrización y tanto VN como los IGF tienen papeles establecidos en la mediación de la migración celular. Para diseccionar la capacidad de IGF-II unido a VN de alterar la función de los queratinocitos HaCAT se midió la migración de células a través de Transwells™.

La figura 1 muestra que en presencia de VN hay migración aumentada de queratinocitos humanos HaCAT inducida por IGF-II a través de Transwells™, en especial a las concentraciones menores. Cada barra representa datos de 3 experimentos repetidos, con cada tratamiento probado en triplicado.

También se probó la migración de la línea de células de cáncer de mama MCF-7. Cuando se preunió 1 µg de VN al pocillo inferior de Transwells™ de 12,0 µm se observó un aumento de cinco veces en la migración a la cámara inferior. La "preunión" de 1-100 ng de IGF-II a los pocillos en ausencia de VN estimuló un aumento de dos veces en migración. Sin embargo, cuando se preunieron de 1-100 ng de IGF-II a 1 µg de VN en la cámara inferior, se observaron aumentos de ocho a diez veces en la migración celular (figura 2). Estas respuestas eran significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) que los efectos de IGF-II solo y VN sola.

[L<sup>27</sup>]-IGF-II es un análogo de IGF-II que no se une a IGF-IR, el receptor a través del que piensa que se transmite la migración mediada por IGF. Por tanto, se realizaron ensayos que examinan la capacidad de [L<sup>27</sup>]-IGF-II preunido a VN para estimular la migración de células MCF-7 a través de Transwells™. Estos revelaron que los complejos VN-[L<sup>27</sup>]-IGF-II no aumentaron la migración de MCF-7 más allá del nivel obtenido con VN sola y que el nivel de migración era significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que el observado en respuesta a IGF-II unido a VN (figura 3). Estos resultados indican que la migración aumentada que surge de IGF-II unido a VN implica la interacción de IGF-II con el IGF-IR.

Las IGFBP son reguladores clave de la exposición de IGF a células. Para determinar si las IGFBP están implicadas en las respuestas migratorias a los complejos VN:IGF-II observadas aquí, se realizaron ensayos de migración en células MCF-7 usando un análogo de IGF-II que se une poco a las IGFBP, pero que aún retiene afinidad por el IGF-IR. Los ensayos usando este análogo de IGF-II, des(1-6)-IGF-II, no revelaron diferencias en las respuestas migratorias comparadas con IGF-II nativo, lo que sugiere que los complejos IGF-II:VN actúan independientemente de las IGFBP para aumentar la migración celular (figura 4).

En la figura 5, los datos muestran que un anticuerpo bloqueante de integrina  $\alpha_v$  redujo sustancialmente la migración de células MCF-7 en respuesta a complejos de VN e IGF-II. Estos datos indican que la ligación y activación del receptor integrina  $\alpha_v$  para VN parecen ser necesarias para una migración celular óptima en respuesta a los complejos IGF-II:VN.

Respecto a la figura 6, en que se examinó el análogo de IGF-I L<sup>24</sup>-IGF-I que se une poco al IGF-IR en ensayos de migración de células MCF-7, los datos demuestran que:

- (1) L<sup>24</sup>-IGF-I e IGF-I tienen el mismo efecto en presencia de VN pero no de IGFBP-5; y
- (2) la presencia de IGFBP-5 aumenta la migración de células cuando IGF-I y VN están presentes, pero no cuando L<sup>24</sup>-IGF-I y VN están presentes.

Los datos anteriores sugieren que se requiere la activación del IGF-IR para la migración celular observada en respuesta a complejos IGF-I:IGFBP:VN y, además, que se requiere la coligación de un receptor integrina para VN.

Los resultados de este estudio revelan por primera vez que los complejos IGF-II:VN e IGF-I:IGFBP:VN estimulan significativamente la migración celular. En conjunto estos datos indican que el complejo VN:IGF es funcionalmente relevante para la cicatrización y puede ser en efecto un factor significativo en el desarrollo y progresión de cáncer de mama. Además, la migración aumentada implica activación tanto del IGF-IR como de los receptores integrina que se

unen a VN. Si en efecto, los complejos VN:IGF fomentan la migración y por tanto la metástasis de células de cáncer de mama, los fármacos dirigidos a inhibir la formación de complejos VN:IGF o la coactivación de los receptores del factor de crecimiento e integrina pueden demostrar que son agentes terapéuticos eficaces.

## 5 Ejemplo 2

### Materiales y métodos

#### *Purificación de vitronectina de yema*

10 La vitronectina (VN) de yema se purificó usando una modificación del método descrito en Nagano *et al.*, 1992, The Journal of Biological Chemistry **267**: 24863-24870. Todas las soluciones usadas en este procedimiento estaban a pH 7,4. Se resuspendieron yemas de huevo obtenidas de huevos de gallina (Farmland, Coles-Myer, Toowong, QLD, Australia) en un volumen igual de solución salina tamponada en fosfato (PBS) fría (NaCl 0,16 M, fosfato de sodio 10 mM) que contenía fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 2 mM y se centrifugó a 18.000g a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante (plasma de yema) se dializó durante la noche a 4°C contra fosfato de sodio 1 mM que contenía 2-β-mercaptoetanol 5 mM y se centrifugó a 20.000g a 4°C durante 20 minutos. La fase sólida superior (fracción de lipoproteína de baja densidad (LDL)) se recuperó y resuspendió en 15 ml de PBS.

20 Se purificó la VN de yema a partir de la fracción LDL usando tres técnicas cromatográficas: filtración en gel, Sepharosa CL-6B (Amersham Biosciences, Upsala, Suecia); hidroxipatita HTP (Bio-Rad, Richmond, CA, EE UU), e intercambio iónico, Q Sepharosa de flujo rápido (Amersham Biosciences).

25 La columna de Sepharosa CL-6B (10 ml de volumen de lecho, tamaño de columna: 2,5 cm de diámetro interno (DI) x 30 cm) se equilibró en dos pasos usando (i) tampón PE (EDTA 5 mM, fosfato de sodio 10 mM) que contenía NaCl 2 M y (ii) tampón PE con NaCl 0,13 M. Se diluyeron cincuenta mililitros de la fracción LDL 1:1 con tampón PE y se aplicaron a la columna de Sepharosa CL-6B, de la que se recogió la fracción sin unir y después se aplicó por lotes a una matriz de hidroxipatita, preequilibrada con fosfato de sodio 10 mM que contenía NaCl 0,5 M. La hidroxipatita se lavó con el tampón de equilibrio seguido por 20 ml de fosfato de sodio 10 mM. La matriz se empaquetó después en una columna (1,5 cm de DI x 8 cm) y las proteínas se eluyeron con fosfato de sodio 200 mM recogiéndose 10 fracciones de 5 ml. Se analizó la presencia de yVN en las fracciones eluidas usando geles en gradiente de poliacrilamida del 4-20% prefabricados (Gradipore, Frenchs Forest, NSW, Australia), SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y tinción con azul brillante de Coomassie (G-250, Bio-Rad). Se usaron marcadores de bajo peso molecular de Bio-Rad para determinar el peso molecular de las proteínas.

35 Se juntaron las fracciones correspondientes al peso molecular esperado de yVN (54 kDa) y se dializaron durante la noche a 4°C contra fosfato de sodio 10 mM y después se aplicaron a una matriz de Q Sepharosa de flujo rápido (5 ml de volumen de lecho, tamaño de columna: 1 cm de DI x 10 cm) preequilibrada con fosfato de sodio 10 mM. La columna se lavó con NaCl 0,15 M en fosfato de sodio 10 mM y la yVN se eluyó con NaCl 0,25 M en fosfato de sodio 40 10 mM. Se evaluó de nuevo el peso molecular de las fracciones como anteriormente.

#### *Preparación de complejos IGF:VN*

45 Los complejos IGF:VN se preunieron a las placas de 96 pocillos y a los Transwell™ como se ha descrito previamente (Kricker *et al.*, 2003, anteriormente).

### Resultados

50 La figura 8 muestra la similitud entre las VN de suero de longitud completa (75 kDa) (a) y la VN de yema truncada (54 kDa) (b). Las similitudes principales que se advierten es que ambas proteínas tienen el sitio RGD de unión a células y la región polianiónica (el sitio propuesto de unión a IGF). La diferencia principal que se advierte es que la VN de yema carece del dominio de unión a heparina.

55 La figura 9 indica que la proteína predominante presente en la fracción de elución (carril E) es del tamaño esperado de la VN de yema (54 kDa). También es importante advertir que esta proteína se usó en los ensayos posteriores.

60 La figura 10 demuestra la capacidad de las VN de unirse a IGF-I radiomarcado en presencia de IGFBP-3. Por tanto, esta figura muestra que la VN de yema de 54 kDa tiene la capacidad de unirse a IGF-I/IGFBP-3 al mismo nivel que la VN de yema de longitud completa. Esto sugiere que el sitio de unión a IGF no está localizado en el dominio de unión a heparina (que falta en la VN de yema (54 kDa)) y consolida el sitio polianiónico como el sitio propuesto de unión de IGF.

65 La figura 11 muestra la capacidad de VN (de suero o yema) cuando está en complejo con IGF-I/IGFBP-3 de aumentar la proliferación celular (medida mediante la técnica MMT, que evalúa la actividad deshidrogenasa mitocondrial) por encima de los controles de sin tratamiento, IGF-I/IGFBP-3 y VN sola. Esto también indica que la

VN de yema truncada (54 kDa) cuando está en complejo con IGF-I/IGFBP-3 puede estimular la proliferación celular al mismo grado que las VN de longitud completa.

La figura 12 demuestra la capacidad de VN (suero o yema) cuando está en complejo con IGF-I/IGFBP-3 que puede aumentar la migración celular (a través del ensayo de migración en Transwell™) sobre los controles de sin tratamiento, IGF-I/IGFBP-3 y VN sola. Por tanto, se pueden sacar las mismas conclusiones de esta figura que para la figura 4, que la VN de yema truncada (54 kDa) cuando está en complejo con IGF-I/IGFBP-3 puede estimular la proliferación celular al mismo grado que las VN de longitud total. En conjunto estas figuras sugieren que la VN de yema truncada (54 kDa) cuando está en complejo con IGF-I/IGFBP-3 puede estimular tanto la migración como la proliferación celular a niveles similares a los observados para la VN de longitud completa (75 kDa).

### Ejemplo 3

En el presente documento se proporcionan ejemplos propuestos de proteínas quiméricas sintéticas de la invención, en forma de proteínas quiméricas VN:IGF-I.

Las proteínas quiméricas sintéticas propuestas mostradas de diversos modos en la figura 14 incluyen cualquier forma de VN de longitud completa o truncada fusionada con IGF-I, con o sin modificaciones de residuos de aminoácidos. Además los inventores proponen fusionar VN e IGF-I con o sin varios enlazadores peptídicos.

Además, los presentes inventores contemplan proteínas quiméricas que comprenden VN y factores de crecimiento tales como VEGF y PDGF, formas de realización particulares de las cuales se muestran en la figura 15.

Las secuencias peptídicas completas para VN madura (SEQ ID NO: 2) e IGF-I (SEQ ID NO: 3) usadas en el presente documento y mostradas en la figura 13 se obtuvieron del NCBI (números de acceso NP\_0000629 y 1BQT, respectivamente). La anotación de los números de residuo dados para VN son los de la proteína madura y excluyen el péptido señal.

Con respecto a la estructura de dominios de vitronectina y sitios de unión de ligandos de vitronectina, estos se describen respectivamente en las figuras 7 y 8.

#### *Formas de VN de longitud completa y truncada*

Un ejemplo de una proteína quimérica sintética capaz de modular la migración celular contiene proteínas VN madura de longitud completa e IGF-I.

A) VN(1...459):IGF-I(1...70)

Otro ejemplo capaz de modular la migración celular contiene la proteína VN madura con una delección de los residuos 380 a 459 (80 aminoácidos C-terminales)

B) VN(1...379):IGF-I(1...70)

La VN monomérica en suero existe en dos formas: un polipéptido de única cadena de 75 kDa o una forma de dos cadenas endógenamente cortada de VN que consiste en un fragmento grande de 65 kDa unido por un puente disulfuro a un fragmento menor de 10 kDa. Estudios recientes han mostrado que no hay diferencia funcional entre estas formas lo que sugiere que los 80 aminoácidos C-terminales en VN no confieren una diferencia funcional (Gibson y Peterson, 2001, *Biochim Biophys Acta* **1545** 289-304). Esto está apoyado por el descubrimiento de que la VN porcina ha perdido su región C-terminal mientras que retiene su actividad funcional (Yoneda *et al.*, 1996, *J Biochem (Tokyo)* **120**: 954-60). Por tanto se propone una molécula quimérica más compacta que contenga una VN truncada en los 80 aminoácidos C-terminales que aún confiera todas las propiedades funcionales de VN.

Aún otra quimera contiene solo el dominio de somatomedina B de VN unido a IGF-I. Esta región contiene los sitios de unión al activador de plasminógeno 1 (PAI-1), receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (uPAR) e integrinas (Schvartz *et al.*, 1999, *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 539-44).

Esta quimera no interaccionaría con componentes en la MEC tales como colágeno y glicosaminoglicanos. Esta incorpora una delección de los residuos 53 a 459 en VN (región de unión, dominio central de hélice enrollada (beta-propeller) y dominio de unión a heparina)

C) VN(1...52):IGF-I(1...70)

Se ha especulado que la región de unión de VN desempaña papeles en la unión al complejo trombina-antitrombina así como al componente de la MEC colágeno. La quimera propuesta aquí contiene el dominio de somatomedina B de VN así como la región de unión creada mediante delección de los residuos 131 a 459 en VN (dominio central de hélice enrollada y dominio de unión a heparina).

## D) VN(1...130):IGF-I(1...70)

5 En un ejemplo adicional el dominio central en VN es el mayor, pero el dominio menos caracterizado de la proteína en términos de función. Sin embargo, se especula que la estructura de hélice enrollada observada en este dominio pueda ser responsable para la multimerización de VN (Xu et al., 2001, *Proteins* **44**: 312-20).

10 Se propone la delección de este dominio para producir una quimera más pequeña que retiene las regiones de unión a ligandos con el dominio de somatomedina B, región de unión polianiónica y dominio de unión a heparina policatiónico (HBD) de VN que sería, sin embargo, incapaz de autoasociarse. Esto implica la delección de los residuos 131 a 346 en VN (dominio central de hélice enrollada)

## E) VN(1...130,347-459):IGF-I(1...70)

15 Aún otra quimera consiste en la forma más compacta de VN que se cree capaz de unirse a sus ligandos extracelulares. En la proteína se han eliminado tanto el dominio central como los 80 aminoácidos C-terminales de VN. Esto requiere una delección de los residuos 131 a 346 y 380 a 459 en VN (dominio central de hélice enrollada y 80 aminoácidos C-terminales, respectivamente)

## 20 F) VN(1...130, 347-379):IGF-I(1...70)

25 Un ejemplo adicional de una quimera contiene una VN truncada en el C-terminal sin el dominio de unión a heparina. Por tanto la proteína contiene el dominio de somatomedina B, la región de unión y el dominio central de hélice enrollada de VN. Aunque se han propuesto sitios de unión a heparina secundarios putativos para VN en el dominio central de hélice enrollada, Gibson y otros (Gibson *et al.*, 1999, *J Biol Chem* **274** 6432-42) demostraron que estos no son funcionales y que el dominio de unión a heparina es responsable para la actividad total de unión glicosaminoglicanos. Por tanto la quimera no interaccionaría con heparina y sulfatos de heparano. Esta quimera tiene una delección de los residuos 347 a 459 en VN (dominio de unión a heparina).

## 30 G) VN(1...346):IGF-I(1...70)

*Modificaciones de residuos en VN e IGF-I*

35 VN puede ser fosforilada por caseína quinasa II (CK2) en los residuos T<sup>50</sup> y T<sup>57</sup> para fomentar la adhesión celular y propagación. Mientras que los análogos de VN tanto fosforilados por CK2 como los no fosforilados por CK2 (simulados por mutantes de VN (T50E,T57E) y (T50A,T57A), respectivamente) se unen a las integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta5$  para activar la ruta de señalización de ERK, solo el análogo de VN fosforilado por CK2 que se une específicamente a la integrina  $\alpha\beta3$  activó la ruta de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3-K) (Seger *et al.*, 1998, *J Biol Chem* **273**: 24805-13; Seger *et al.*, 2001, *J Biol Chem* **276**: 16998-7006).

40 Es esta activación de la ruta de la PI3-K la que presumiblemente produce adhesión y propagación celular aumentadas. Por tanto se proponen quimeras con mutaciones que o bien fomentarían o inhibirían la activación de la ruta de la PI3-K después de la unión a la integrina  $\alpha\beta3$ . Por tanto una molécula quimérica con las sustituciones T50A y T57A en VN sería análoga a la VN no fosforilada por CK2 y estaría restringida a señalización a través de la ruta de ERK (H), mientras que construcciones sintéticas con las sustituciones T50E y T57E en VN mimetizarían la VN fosforilada por CK2 y sería capaz de activar tanto la ruta de ERK como la de PI3-K produciendo una señalización intracelular alterada (I).

## 50 H) VN(T50A,T57A):IGF-I

## I) VN(T50E,T57E):IGF-I

55 Hay un sitio de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) en el residuo S<sup>378</sup> en VN. Se ha demostrado con los análogos de VN fosforilado por PKA y no fosforilado por PKA (simulados por los mutantes de VN S378E y S378A, respectivamente) que la fosforilación de este sitio reduce la unión de PAI-1 a VN y por tanto modula el papel de VN en el sistema de la uroquinasa (Schvartz *et al.*, 2002, *Arch Biochem Biophys* **397**: 246-52).

60 Por tanto se proponen quimeras que contienen tanto la mutación S378E en VN para inhibir la unión a PAI-1 por la quimera (J) como la mutación S378A en VN para fomentar la unión a PAI-1 y la estabilización en la proteína quimérica (K). Además, una mutación S378A puede aumentar la migración celular ya que se ha mostrado que la unión de PAI-1 a VN inhibe la migración celular mediada por integrinas (Kjoller *et al.*, 1997, *Exp Cell Res* **232**: 420-9) y la adhesión celular a VN mediada por uPAR e integrinas (Deng *et al.*, 2001, *J Cell Physiol* **189** 23-33. De forma interesante estos descubrimientos se observaron independientemente de la función de PAI-1 como inhibidor de la activación de plasminógeno.

## 65 J) VN(S378E):IGF-I

K) VN(S378A):IGF-I

5 Gechtman y Shaltiel, 1997, Eur J Biochem **243** 493-501, han mostrado que la proteína quinasa C puede fosforilar VN en el residuo S<sup>362</sup>. Esta fosforilación atenúa el corte por plasmina de VN, que se produce en el dominio de unión a heparina de VN. Por tanto el corte por plasmina en este sitio modula la afinidad de VN por sus ligandos que se unen en esta región y también modula la semivida de VN. Por tanto se propone introducir una sustitución S362E para mimetizar la serina fosforilada y para inhibir consecuentemente el corte de la quimera por plasmina.

10 L) VN(S362E):IGF-I

Se ha mostrado que las IGFBP requieren los 3 residuos N-terminales en IGF-I para unirse a este factor de crecimiento con alta afinidad (Tomas *et al.*, 1991, J Endocrinol **128**: 97-105.

15 Por tanto parece improbable que IGF-I unida a VN a través de su secuencia N-terminal se pudiera unir a las IGFBP. A pesar de esto, se propone además una quimera VN:IGF-I que contiene un IGF-I truncado en el N-terminal para eliminar toda probabilidad de que se pudieran unir las IGFBP a IGF-I y por consiguiente inhibir la actividad biológica de la proteína quimérica VN:IGF-I. Esta construcción incluye una deleción de los residuos 1 a 3 en IGF-I (región de unión a IGFBP).

20 M) VN:IGF-I(4...70)

Se ha sugerido que la región polianiónica de VN es responsable para la unión a IGF-II y las IGFBP. Por tanto, se propone aún otra quimera VN:IGF-I en la que se ha eliminado la región polianiónica de VN. Esta quimera por tanto puede ser incapaz de unirse a IGF-II o las IGFBP.

N) VN(1...52, 65...459):IGF-I(1...70)

*Fusión de VN a IGF-I*

30 Se propone que los ADNc de VN e IGF-I se pueden fusionar antes de la expresión con o sin la inserción de una secuencia enlazadora peptídica. Se han usado con éxito varias secuencias enlazadoras para fusionar proteínas, que habitualmente consisten en combinaciones de residuos de glicina y serina y/o sitios de corte de proteasas tales como para trombina, colagenasa o plasmina.

35 Ejemplos no limitantes de secuencias enlazadoras son:

- (i) Gly<sub>4</sub> Ser (SEQ ID NO: 4);
- (ii) Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 5);
- (iii) (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 6);
- (iv) Leu Ile Lys Met Lys Pro (SEQ ID NO: 7); y
- (v) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (SEQ ID NO: 8).

*Fusión de VN a otros factores de crecimiento peptídicos*

45 Además de fusionar la proteína de matriz extracelular, VN, con el factor de crecimiento, IGF-I, se propone la fusión de VN con otros factores de crecimiento peptídicos. Específicamente, se propone el desarrollo de las siguientes proteínas quiméricas (figura 16).

50 A) VN:PDGF $\alpha$ (1...210) (número de acceso del NCBI P04085)

B) VN:VEGF(1...102) (número de acceso del NCBI 2VPFE)

55 Se propone que los respectivos receptores de la superficie celular interaccionan con integrinas, y en particular, el receptor de VN, la integrina  $\alpha\beta$ 3. Específicamente, se ha mostrado que el receptor de PDGF coimmunoprecipita con la integrina  $\alpha\beta$ 3 después de la estimulación con PDGF (Schneller *et al.*, EMBO J **16**: 5600-7.

También se ha demostrado que el receptor de VEGF de tipo 2 coimmunoprecipita con el receptor de VN después de la estimulación con su factor de crecimiento (Soldi *et al.*, EMBO J **18**: 882-92).

60 Los descubrimientos de que los receptores para estos factores de crecimiento interaccionan con la integrina  $\alpha\beta$ 3 sugiere que hay un papel importante para esta interacción en la modulación/potenciación de las rutas intracelulares de señalización de estos receptores de la superficie celular. Por tanto, la coactivación y asociación de estos receptores iniciada por las proteínas quiméricas anteriores puede inducir profundas respuestas biológicas relevantes para aplicaciones terapéuticas.

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína quimérica sintética capaz de fomentar la migración y/o proliferación celular que comprende una secuencia de aminoácidos de:
- (i) el factor de crecimiento insulínico de tipo I (IGF-I) que comprende SEQ ID NO: 3; y
- (ii) al menos un dominio de unión a integrinas de vitronectina (VN) que comprende los residuos de aminoácidos del 1 al 52 de la vitronectina madura (SEQ ID NO: 2);
- 10 en donde la proteína quimérica sintética no incluye un dominio de unión a heparina (HBD) de VN correspondiente a los residuos 347-459 de VN madura (SEQ ID NO: 2) y en donde la proteína quimérica sintética no comprende una secuencia de aminoácidos de IGFBP.
- 15 2. La proteína quimérica sintética de la reivindicación 1, en donde el dominio de unión a integrinas es un dominio de unión a integrinas  $\alpha_v$  seleccionado de un dominio de unión a integrina  $\alpha_v\beta_3$  y un dominio de unión a integrina  $\alpha_v\beta_5$ .
- 20 3. La proteína quimérica sintética de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho al menos un dominio de unión a integrinas de VN no comprende una secuencia de aminoácidos polianiónica correspondiente a los residuos 53-64 de una proteína VN madura.
4. La proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además al menos una secuencia enlazadora.
- 25 5. La proteína quimérica sintética de la reivindicación 4, en donde la secuencia enlazadora comprende un sitio de corte de una proteasa.
6. La proteína quimérica sintética de la reivindicación 4, en donde la secuencia enlazadora se selecciona del grupo que consiste en:
- 30 (i) Gly<sub>4</sub> Ser (SEQ ID NO: 4);
- (ii) Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 5);
- (iii) (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 6);
- (iv) Leu Ile Lys Met Lys Pro (SEQ ID NO: 7); y
- 35 (v) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (SEQ ID NO: 8).
7. La proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende una o más mutaciones en VN.
- 40 8. La proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 15.
9. Un ácido nucleico aislado que codifica la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 45 10. Una construcción genética que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 9 operativamente unido a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un vector.
- 50 11. La construcción genética de la reivindicación 10, que es una construcción de expresión en donde el ácido nucleico aislado está operativamente unido a un promotor.
12. Una célula huésped que comprende la construcción genética de la reivindicación 10 o la reivindicación 11.
- 55 13. Una composición farmacéutica que comprende la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un soporte, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición farmacéutica como se reivindica en la reivindicación 13 para su uso en cicatrización, reparación de la piel, curación de quemaduras o úlceras o terapia de reemplazo de piel.
- 60 15. Un implante quirúrgico, soporte o prótesis impregnada, recubierta o que comprende de otra manera la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 65 16. Un vendaje de herida o quemadura que comprende la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

- 5
17. Un método *in vitro* de fomentar la migración y/o proliferación celular que incluye el paso de usar la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para unirse tanto a un receptor del factor de crecimiento como a un receptor integrina expresados por una célula para de esta manera inducir, aumentar o fomentar de otra manera la migración y/o proliferación de dicha célula.
- 10
18. La proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en fomentar la cicatrización, reparación de la piel, curación de quemaduras o úlceras o terapia de reemplazo de piel, en donde la proteína quimérica sintética se une tanto a un receptor del factor de crecimiento como a un receptor integrina expresados por una célula para de esta manera inducir, aumentar o fomentar de otra manera la migración y/o proliferación de dicha célula.
- 15
19. La proteína quimérica sintética de la reivindicación 18, en donde dicha proteína quimérica sintética es para administración a un animal para fomentar la migración y/o proliferación celular *in situ*.
- 20
20. La proteína quimérica sintética de la reivindicación 19, en donde dicha proteína quimérica sintética es para uso profiláctico o terapéutico para inducir, aumentar o fomentar de otra manera la migración y/o proliferación de células epiteliales para facilitar de esta manera la cicatrización *in situ*.
- 25
21. La proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en donde el animal es un ser humano.
22. Uso de la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para diseñar, identificar o producir una molécula que es un agonista o antagonista de un complejo proteico que comprende un factor de crecimiento y vitronectina.
- 30
23. Uso según la reivindicación 22, para producir un agonista de un complejo proteico que comprende IGF-I, una IGFBP y vitronectina, o para producir un antagonista de un complejo proteico que comprende IGF-I, una IGFBP y vitronectina.
24. Uso de la proteína quimérica sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de un medicamento para fomentar la cicatrización, reparación de la piel, curación de quemaduras o úlceras o terapia de reemplazo de piel, en donde la proteína quimérica sintética en el medicamento se une tanto a un receptor del factor de crecimiento como a un receptor integrina expresados por una célula para de esta manera inducir, aumentar o fomentar de otra manera la migración y/o proliferación de dicha célula.



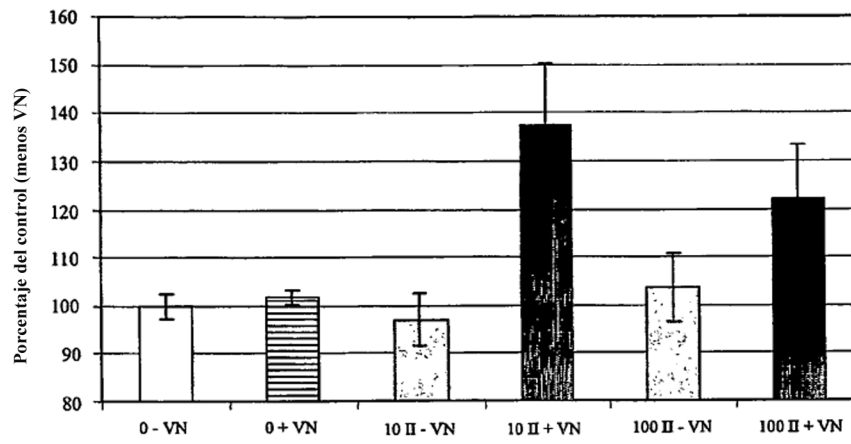


FIGURA 1

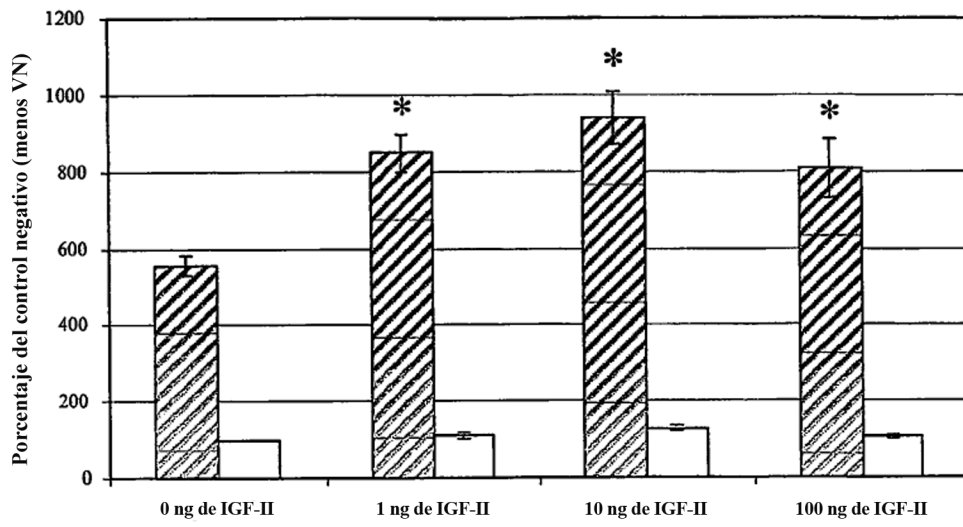


FIGURA 2

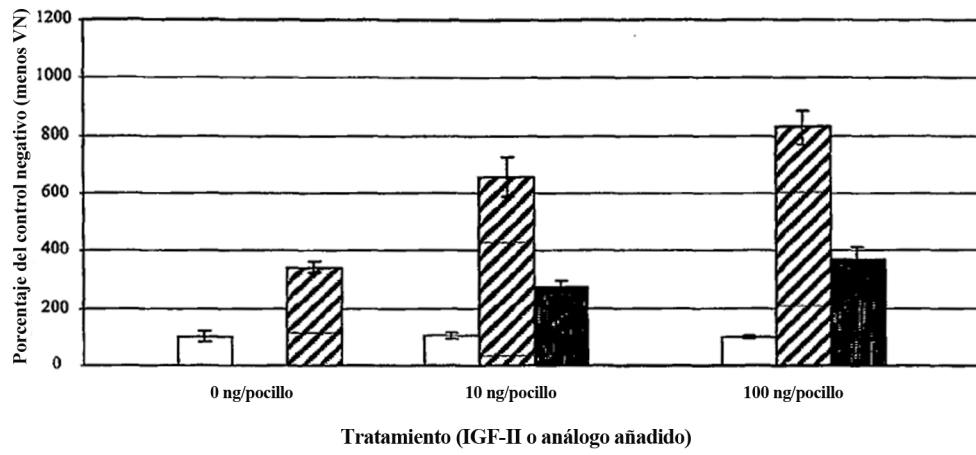


FIGURA 3

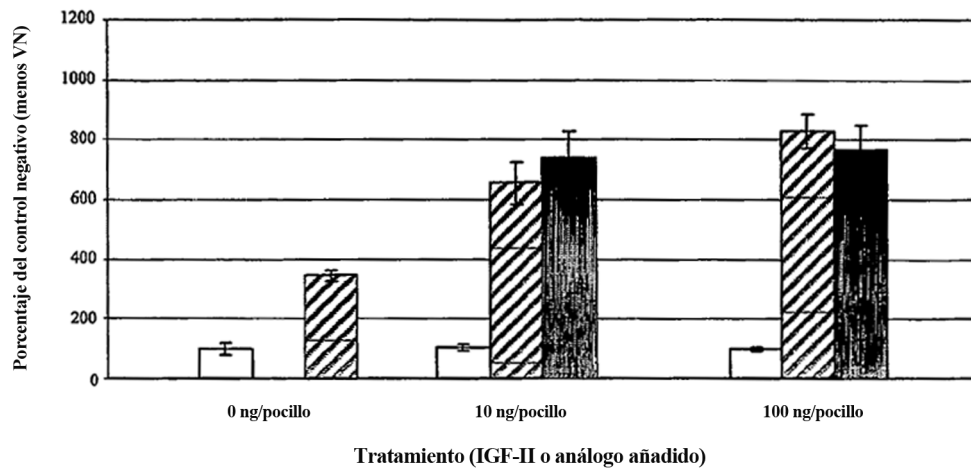


FIGURA 4

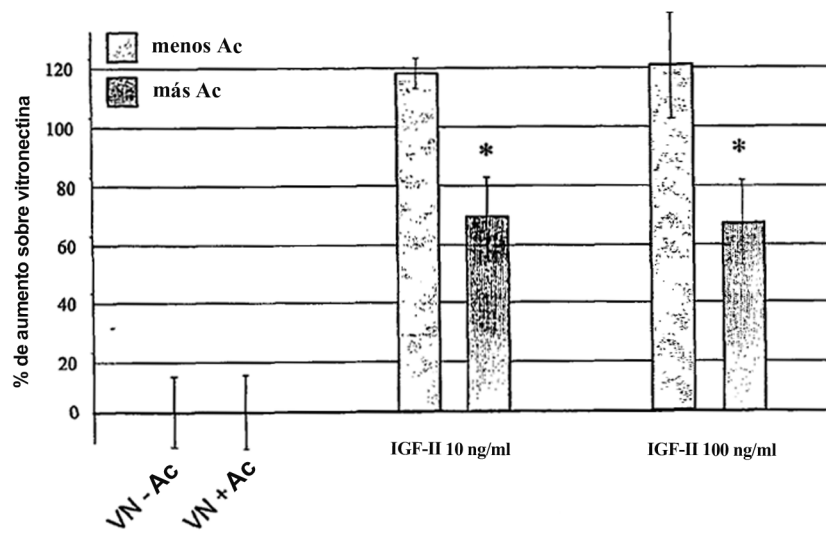


FIGURA 5

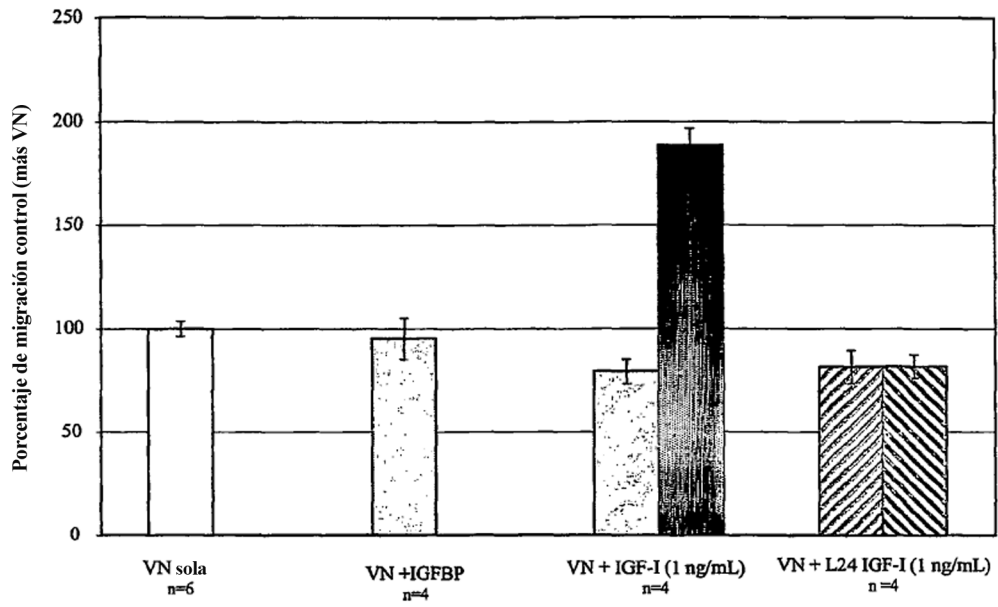


FIGURA 6

<b>Secuencia de aminoácidos de vitronectina de longitud total (incluyendo péptido señal)</b>						
1	maplrplllil	allawvalad	gesckgrcte	gfnvdkkcqc	delcsyyqsc	ctdytaeckp
61	qvtrgdvftm	pedeytvydd	geeknnatvh	eqvggpslts	dlqaqskgnp	eqtpvlkpee
121	eapapevgas	kpegidsrpe	tlhpgrppqp	aeelcsgkp	fdaftdlkng	slfafrgqyc
181	yeldekavrp	gypklirdvw	giegpidaaf	trincqgkty	lfkgsqywrp	edgvlápdyp
241	rnisdgfdgi	pónvdaalal	pahsysgrer	vyffkqkqyw	eyqfghqpsq	eecegsslsa
301	vfehfaammqr	dswedifell	fwgrtsagtr	qpqfisrdwh	gvpgqvdaam	agriyisgma
361	prpslakkqr	frhrnrkgyr	sqrghsrgrn	qnsrrpsram	wslfssees	nlgannyddy
421	rmdwlvpatc	epiqsvfffs	gdkyrvnlr	trrvdtvdpp	yprsiaqywl	gcpagghl

<b>Estructura de dominios</b>	<b>Residuos<sup>†</sup></b>	<b>Residuos<sup>‡</sup></b>
Péptido señal		1-19
Dominio de somatomedina B	1-44	20-63
Motivo RGD	45-47	64-66
Región polianiónica (ácida)	53-64	72-83
Repeticiones similares a hemopexina (x2)	131-459	150-478
- Dominio central de hélice enrollada de 4 aspás	131-342	150-361
- Dominio C-terminal de unión a heparina	347-459	366-478
Región policatiónica (básica)	348-379	367-398

<b>Sitios de modificación de residuos</b>	<b>Residuos<sup>†</sup></b>	<b>Residuos<sup>‡</sup></b>
Sitio de fosforilación por la PK dependiente de AMPc	378	397
Residuos de tirosina sulfatados (x2)	56, 59	75, 78
Sitio de fosforilación por PKC	362	381
Sitio de fosforilación por caseína quinasa (x2)	50, 57	69, 76

<b>Sitios de reconocimiento de proteasas</b>	<b>Residuos<sup>†</sup></b>	<b>Residuos<sup>‡</sup></b>
Sitio de corte endógeno (proteasa sin identificar)	379-380	398-399
Sitio de corte de trombina	305-306	324-325
Sitio de corte de trombina	370-371	389-390
Sitio de corte de elastasa	330-331	349-350
Sitio de corte de elastasa	383-384	402-403
Sitio de corte de plasmina	361-362	380-381

<b>Sitios de unión a sustratos</b>	<b>Residuos<sup>†</sup></b>	<b>Residuos<sup>‡</sup></b>
PAI-1	12-30	
PAI-1	348-370	
uPAR	Región SomB	
Integrina	45-47	
Colágeno	Región policatiónica	
Colágeno	Región polianiónica	
Complejo trombina antitrombina III	Región policatiónica	
Plasminógeno	332-348	
Glicosaminoglicano	348-361	

<sup>†</sup> Residuos numerados según su posición en la proteína madura

<sup>‡</sup> Residuos numerados según su posición en la pro-proteína (con péptido señal)

**FIGURA 7**

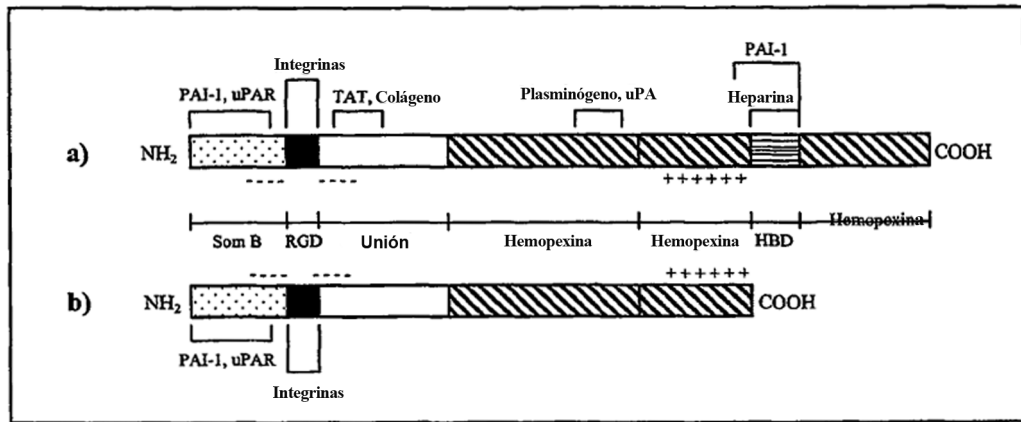


FIGURA 8



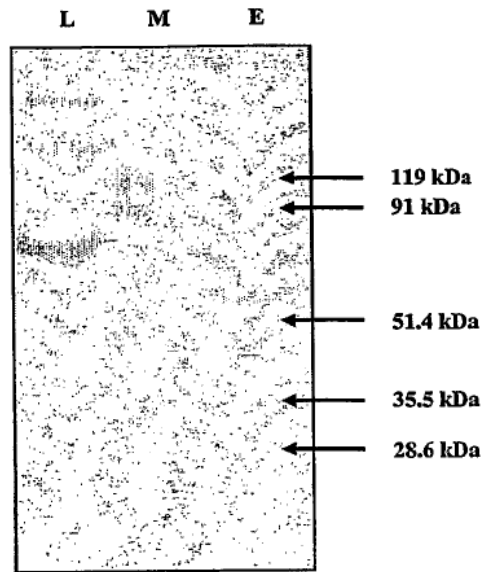


FIGURA 9

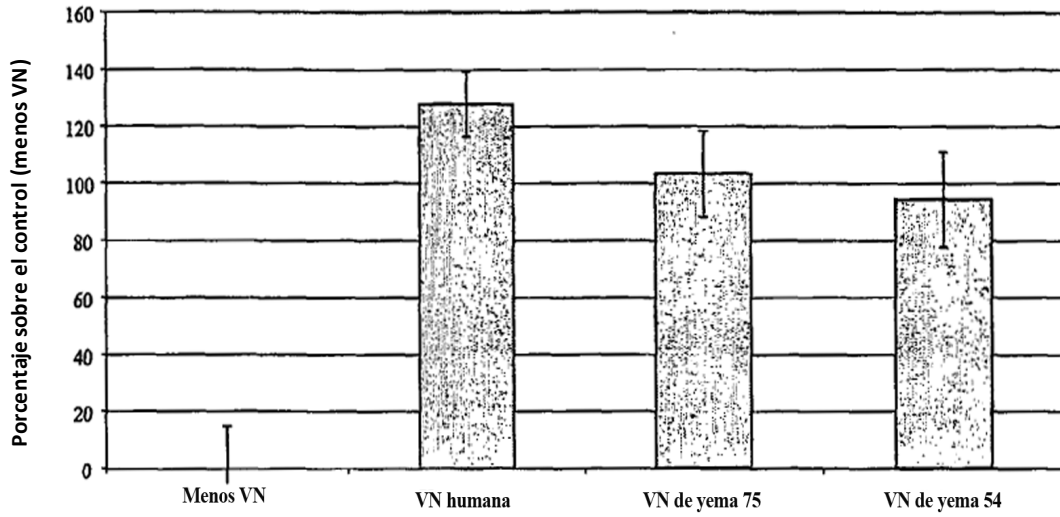


FIGURA 10

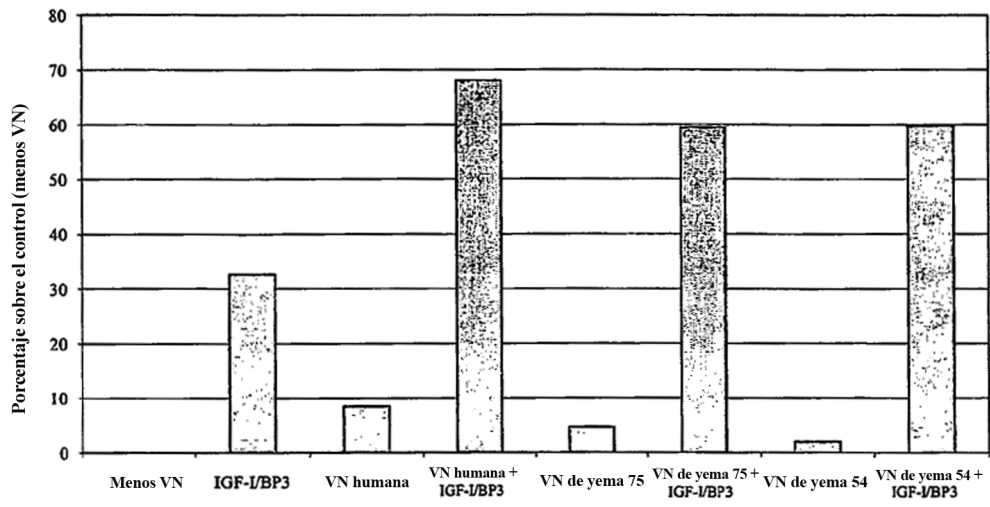


FIGURA 11

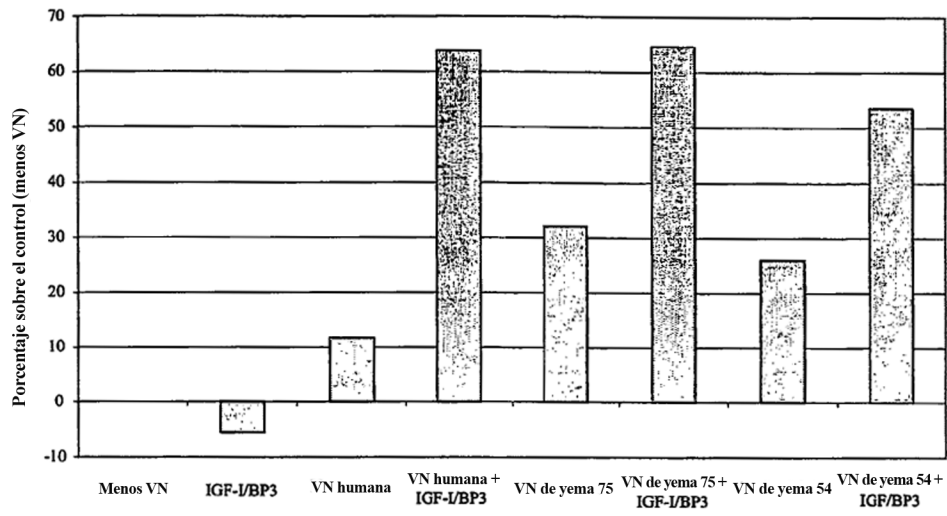


FIGURA 12

**A) Secuencia de AA de VN**

dqesckgrct egfnvdkkcg cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd  
dgeeknatv heqvggpslt sdlqagskn pegtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp  
etlhpgrpqp paeelcsgk pfdaftdlkn gelfafrgqy cyeldekavr pgypklirdv  
wgiegpidaa ftrincqgkt ylfkgsqywr fedgvlqpy prnisdgfdg ipdnvdaala  
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps geecegssls avfehfaamq rdswedifel  
lfwgrtsagt rqpqfisdw hgvpgqvdaa magriyism aprpslakkq rfrhrnrkgy  
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff  
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl

**B) Secuencia de AA de IGF-I**

gpetlqgael vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy  
caplkpaks

**C) Secuencias enlazadoras**

- 1) Gly<sub>4</sub> Ser
- 2) Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub>
- 3) (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub>
- 4) Leu Ile Lys Met Lys Pro Sitio de reconocimiento de corte por plasmina  
Ref: FASEB (2001) 15: 1300-2
- 5) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys Sitio de reconocimiento de corte por colagenasa-3  
Ref: Biomacromolecules (2003) 4: 1214-23

**FIGURA 13**

**A) VN (1...459) IGF-I (1...70)**

```
dqesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrppq paeelcsgk pfdafdlkn gslfarggy cyeldekavr pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfghqps qeecegssls avfehfaammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisdw hgvpqgvdad magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twlsifsee snigannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkapksa
```

**B) VN (1...379) IGF-I (1...70)**

```
dqesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrppq paeelcsgk pfdafdlkn gslfarggy cyeldekavr pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincgkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkgkqy weyqfghqps qeecegssls avfehfaammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisdw hgvpqgvdad magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsr -- LINK -- gpetlcgael
ygssrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkapksa
```

**C) VN (1...52) IGF-I (1...70)**

```
dqesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mp
-- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrapq tgivdeccfr
scdlrrlemy caplkapksa
```

**D) VN (1...130) IGF-I (1...70)**

```
dqesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrppq -- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrapq
tgivdeccfr scdlrrlemy caplkapksa
```

**E) VN (1...130, 347...459) IGF-I (1...70)**

```
dqesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrppq ammqrdswe ifellfwgrt sagtrqpqi srdwhgvpgq vdaamagriy
isgmprpsl akkqrfrhrn rkgysrgrh srgnrqnsrr psratwlsif seesnlgan
nyddyrmawl vpatcepiqs vffsgdkyy rvlrtrrvd tvdppyrpsi aqywlcpap
ghl -- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrapq
tgivdeccfr scdlrrlemy caplkapksa
```

FIGURA 14

**F) VN (1...130, 347..379) IGF-I (1...70)**

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd  
dgeeknnatv heqvvgpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp  
etlhpgrpp ammqrdswe ifellfwgrt sagtrqpqfi -- LINK -- gpetlcgael  
vdalqfvcgd rgfyfinkptg ygssrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkapksa

**G) VN (1...346) IGF-I (1...70)**

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvyd  
dgeeknnatv heqvvgpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp  
etlhpgrpp paeelcsgk pfdafdlkn gslfafrggy cyeldekavr pgyplirvd  
wgiegpidaa ftrincgkkt ylfkgsqywr fedgvlpdy prnisdgfdg ipdnvdaala  
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehfamq rdswedifel  
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpsla -- LINK --  
gpetlcgael vdalqfvcgd rgfyfinkptg ygssrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy  
caplkapksa

**H) VN (T50A, T57A) IGF-I (1...70)**

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvfa mpedeyavyd  
dgeeknnatv heqvvgpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp  
etlhpgrpp paeelcsgk pfdafdlkn gslfafrggy cyeldekavr pgyplirvd  
wgiegpidaa ftrincgkkt ylfkgsqywr fedgvlpdy prnisdgfdg ipdnvdaala  
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehfamq rdswedifel  
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakk rfrhnrkgy  
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twlsfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff  
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael  
vdalqfvcgd rgfyfinkptg ygssrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkapksa

**I) VN (T50E, T57E) IGF-I (1...70)**

dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvfe mpedeyevyd  
dgeeknnatv heqvvgpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp  
etlhpgrpp paeelcsgk pfdafdlkn gslfafrggy cyeldekavr pgyplirvd  
wgiegpidaa ftrincgkkt ylfkgsqywr fedgvlpdy prnisdgfdg ipdnvdaala  
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehfamq rdswedifel  
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakk rfrhnrkgy  
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twlsfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff  
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael  
vdalqfvcgd rgfyfinkptg ygssrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkapksa

FIGURA 14 (Cont.)

**J) VN (S378E) IGF-I (1...70)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytyvd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgprqp paeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrggy cyeldekavr pgyplirdv
wgiegpidaa ftrincgkkt ylfkgsqywr fedgvlđpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehhammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpĀra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkpaksa
```

**K) VN (S378A) IGF-I (1...70)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytyvd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgprqp paeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrggy cyeldekavr pgyplirdv
wgiegpidaa ftrincgkkt ylfkgsqywr fedgvlđpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehhammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpĀra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkpaksa
```

**L) VN (S362E) IGF-I (1...70)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytyvd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgprqp paeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrggy cyeldekavr pgyplirdv
wgiegpidaa ftrincgkkt ylfkgsqywr fedgvlđpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehhammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gpetlcgael
vdalqfvcgd rgfyfnkptg ygssrrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplkpaksa
```

**M) VN (1...459) IGF-I (4...70)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytyvd
dgeeknatv heqvggpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgprqp paeelcsgk pfdaftdlkn gslfafrggy cyeldekavr pgyplirdv
wgiegpidaa ftrincgkkt ylfkgsqywr fedgvlđpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehhammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twlslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- tlcgaelvda
lqfvcgdrgf yfnkptgygs ssrrapqgtgi vdeccfrscd lrrlemycap lkpaksa
```

FIGURA 14 (Cont.)



**N) VN (1...52, 65...459) IGF-I (1...70)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpknnatvhe
qvggpsltsd lqaqskgnpe qtpvlkpeee apapevgask pegidsrpet lhpgrppppa
eeelcsgkpf daftdlkngs lfafrgqycy eldekavrpg ypklirdvwg iegpidaaft
rincqgktyl fkgsqywrfe dgvl dpdypr nisdgfdgip dnvdaalalp ahsysgrerv
yffkgkqywe yqfghqpsqe ecegsslsav fehfamnrqrd swedifellf wgrtsagtrq
pqfisrdwhg vpgqvdaama griyisgmap rpslakkqrf rhnrnkgyrs qrghsrgrnq
nsrrpsratw lsfsseesn lgannyddy rmdwlvpatce piqsvfffsg dkyyrvnlrt
rrvdtvdp py prsiaqywl g cpapghl -- LINK -- gpetlcgael vdalqfvcgd
rgfyfinkptg ygssrrrapq tgivdeccfr scdlrrlemy caplcpaksa
```

**FIGURA 14 (Cont.)**

**A) VN (1...459) PDGF (1...210)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvvd
dgeeknatv heqvvgpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrqp paeelcsgk pfdafdlkn gslfafrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincggkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehhammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK --
(PDGF Accession # P04085)
```

**B) VN (1...459) VEGF (1...102)**

```
dgesckgrct egfnvdkkcq cdelcsyyqs cctdytaeck pqvtrgdvft mpedeytvvd
dgeeknatv heqvvgpslt sdlqaqskgn peqtpvlkpe eeapapevga skpegidsrp
etlhpgrqp paeelcsgk pfdafdlkn gslfafrgqy cyeldekavr pgypklirdv
wgiegpidaa ftrincggkt ylfkgsqywr fedgvldpdy prnisdgfdg ipdnvdaala
lpahsysgre rvyffkqkqy weyqfghqps qeecegssls avfehhammq rdswedifel
lfwgrtsagt rqpqfisrdw hgvpgqvdaa magriyisgm aprpslakkq rfrhrnrkgy
rsqrghsrgr nqnsrrpsra twslfssee snlgannydd yrmdwlvpat cepiqsvfff
sgdkyyrvnl rtrrvdtvdp pyprsiaqyw lgcpapghl -- LINK -- gqnhhevkvf
mdvyqrsych pietlvdifq eypdeieyif kpscvplmrc ggccndegle cvpteesnit
mqimrikphq gqhigemsfl qhnccecrpk kd
```

FIGURA 15