

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 505**

51 Int. Cl.:

C07K 14/65 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/30 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01971494 .8**

96 Fecha de presentación: **24.09.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1333853**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54 Título: **Complejo del factor de crecimiento**

30 Prioridad:

22.09.2000 AU PR030900

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

11.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

11.12.2012

73 Titular/es:

**QUEENSLAND UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
(100.0%)
2 GEORGE STREET
BRISBANE, QLD 4000, AU**

72 Inventor/es:

**UPTON, ZEE y
KRICKER, JENNIFER ANN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 392 505 T3

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

DESCRIPCIÓN

Complejo del factor de crecimiento

Campo de la invención

5 Se describen aquí un complejo de proteína aislado que incluye una proteína de unión a factor de crecimiento y vitronectina y un complejo de proteína aislado que incluye un factor de crecimiento similar a insulina, una proteína de unión a factor de crecimiento similar a insulina y vitronectina. También se describen complejos del factor de crecimiento que comprenden factores de crecimiento variantes y/o proteínas de unión a factor de crecimiento que facilitan o mejoran la formación de los complejos del factor de crecimiento. Se pueden llevar a cabo métodos para modular la proliferación y/o migración celular al administrar el complejo de proteína para propósitos de cicatrización de heridas, reparación de la piel, mantenimiento cosmético de la piel y terapia de reemplazo de tejido. Por el contrario, al interrumpir los complejos de proteína formados in vivo, se puede suprimir la proliferación y/o migración celular conducida por el factor de crecimiento como tal para propósitos de tratamiento de cánceres, soriasis, aterosclerosis y heridas propensas a la formación de cicatrices hipertróficas. Estos tratamientos pueden tener aplicaciones médicas y veterinarias. La presente invención abarca un complejo de proteína aislado que comprende factor de crecimiento similar a insulina I, una proteína de unión a factor de crecimiento seleccionada del grupo que consiste de IGFBP2, IGFBP3, IBFBP4 y 1GFBP5; y vitronectina y un IGFBP3 o IGFBP5 variante que tiene un dominio de unión a heparina mutado o eliminado que evita o interrumpe la formación del complejo de proteína aislado de la invención para uso en tratamiento de cáncer.

Antecedentes de la invención

20 El crecimiento, reparación y cicatrización de la piel se someten a mecanismos de control biológico complejos que actúan a través de señales positivas y negativas. Tales señales actúan en el nivel de control de la proliferación, diferenciación y migración celular, y se miden normalmente por polipéptidos de factor de crecimiento. A este respecto, los factores de crecimiento importantes incluyen factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I y -II).

25 Se ha reportado que el IGF-I humano ejerce un amplio rango de actividades biológicas que incluyen estimulación de proliferación, diferenciación y migración celular, protección de degradación de proteína y apoptosis, así como también regulación de factores endocrinos tales como hormona de crecimiento. El IGF-II tiene propiedades similares a IGF-I pero parece ser más pertinente a carcinogénesis y desarrollo fetal y embrionario, el IGF-I tiene una función más importante en el desarrollo postnatal.

30 El IGF-I y IGF-II actúan a través de una interacción de unión con el receptor tipo IGF I (IGFR). La disponibilidad de los IGF para dicha interacción se regula por las proteínas de unión a factor de crecimiento similares a insulina (IGFBP 1-6). Se conoce que las IGFBP regulan tanto positivamente como negativamente la función IGF así como también exhiben actividad independiente de IGF.

35 Otro componente funcional de las rutas IGF es el tipo IGFR II que también se conoce como el receptor de manosa-6-fosfato independiente de catión (CI-MPR). El tipo IGFR tipo II es una proteína multifuncional que une las enzimas lisosómicas que llevan unidades estructurales de manosa-6-fosfato, así como también IGF-II, aunque la significancia funcional de la unión de IGF-II no es clara (O'Dell & Day, 1998, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 767; Brulke, 1999, *Horm. Metab. Res.* 31 242; Nykjaer et al., 1998, *J. Cell. Biol.* 141 815).

40 También se ha reportado que los IGF se unen a otros grupos de proteínas denominadas "proteínas relacionadas con IGFBP" que comparten la similitud estructural e incluyen factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) y productos codificados por los genes mac25, nov y cyr61. Estos unen los IGF con una afinidad mucho más baja que con las IGFBP.

45 Recientemente, se ha identificado la vitronectina (VN) como una proteína de matriz extracelular, no relacionada estructuralmente con las IGFBP y proteínas relacionadas con IGFBP, que unen el IGF-II pero no el IGF-I (Upton et al., 1999, *Endocrinol.* 140 2928).

50 La vitronectina es una proteína de matriz extracelular glicosilada de ~75kD, que también se encuentra en la sangre y se ha estado implicada en cánceres, enfermedades óseas y trastornos patológicos que involucran angiogénesis (revisado en Schwartz et al, 1999, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 539). La función de la vitronectina en eventos tales como angiogénesis y tumorigénesis por lo menos reside en parte en la capacidad de la vitronectina para unir integrinas e interactuar con componentes del sistema activador de plasminógeno de uroquinasa (por ejemplo PAI-1, uPAR, plasminógeno) para promover por lo tanto la proliferación, adhesión, propagación y migración celular. Se ha implicado más específicamente a la vitronectina en la prevención de apoptosis de células neoplásicas en respuesta al tratamiento con fármaco (Uhm et al., 1999, *Clin. Cancer Res.* 5 1587). La vitronectina parece ser un portador de IGF-II en la circulación (McMurtry et al., 1996, *J. Endocrinol.* 150 149).

Objeto de la invención

Los presentes inventores han encontrado de forma sorprendente que la IGFBP se une a la vitronectina, y que el IGF-1 se puede unir a la vitronectina cuando se une a una IGFBP.

Es por lo tanto un objeto de la invención proporcionar una IGFBP aislada y complejo que contiene vitronectina.

- 5 Nam & Clemmons (2000, Growth Hormone & IGF Research, volumen 10(4), 233-273, resumen de encuentro P21) identifican después de la fecha de prioridad de la presente solicitud que la IGFBP5 se une a la vitronectina con alta afinidad y que esta unión se inhibe por heparina y sulfato de heparano. Una presentación oral que se relaciona con el resumen del encuentro que tuvo lugar del 26 al 29 de octubre de 2000 y describe que los complejos IGF-I/IGFBP5/VN estimulan la función del músculo liso.

10 Resumen de la invención

La invención proporciona un complejo de proteína aislado que comprende: factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I); una proteína de unión a factor de crecimiento seleccionada del grupo que consiste de: IGFBP2; IGFBP3; IGFBP4; y IGFBP5; y vitronectina. Se proporciona una composición farmacéutica que comprende el complejo y un implante quirúrgico que comprende la composición. La invención abarca el uso de una IGFBP variante seleccionada del grupo que consiste de: IGFBP3 y IGFBP5, que tiene un dominio de unión a heparina eliminado o mutado (HBD), que evita o interrumpe la formación del complejo de proteína aislado de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer y un método para estimular la proliferación y/o migración celular que incluye la etapa de administrar a células aisladas de un animal, un complejo de proteína aislado de acuerdo con la invención. Se proporciona adicionalmente el uso de un complejo de proteína aislado de acuerdo con la invención para la fabricación de un medicamento para promover la cicatrización de heridas, reparación de la piel, cicatrización de 15 úlcera y quemadura o regeneración de piel in vitro, o para promover regeneración ósea y un complejo de proteína aislado de acuerdo con la invención para uso en promover la cicatrización de heridas, reparación de la piel, cicatrización de úlcera y quemadura o regeneración de piel in vitro, o para promover regeneración ósea. Finalmente, la invención proporciona un IGFBP3 o IGFBP5 variante que tiene un dominio de unión a heparina mutado o 20 eliminado (HBD) que evita o interrumpe la formación del complejo de proteína aislado de la invención para uso en tratamiento de cáncer.

Como se describirá en más detalle adelante, la interrupción de las interacciones entre la vitronectina y las IGFBP puede no solo inhibir la proliferación de células neoplásicas, sino también inhibir la metástasis tumoral, ambos eventos son centrales para la patología de tumor.

- 30 Se describen los usos de los complejos de proteína aislados y métodos como se describió anteriormente utilizando los complejos de proteína aislados en tratamientos que promueven cicatrización de heridas, reparación de la piel, cicatrización de úlcera y quemadura, regeneración de piel in vitro tal como para injertos de piel autólogos y regeneración ósea. Se describen métodos como se describió anteriormente que utilizan agentes que interrumpen o previenen la formación de un complejo de proteína en tratamientos terapéuticos o profilácticos de cáncer de mama 35 epitelial.

Se describe un implante quirúrgico o prótesis que comprende un complejo de proteína aislado. El implante quirúrgico o prótesis se puede recubrir, impregnar o pretratar de otra forma con dicho complejo de proteína aislado.

El animal tratado como se discute puede ser un mamífero, preferiblemente un humano, o puede ser un vertebrado no mamífero tal como un pez, reptil o ave, o células aisladas de cualquiera de estos.

- 40 A través de esta especificación, a menos que se indique lo contrario, "comprende", "comprenden" y "que comprende" se utilizan inclusivamente en lugar de exclusivamente, de tal manera que un entero establecido o grupo de enteros pueden incluir uno o más de otros enteros o grupos de enteros no establecidos.

Breve descripción de las figuras y tablas

- 45 TABLA 1: Lista de referencias que describen ácidos nucleicos que codifican factores de crecimiento y proteínas de unión a factor de crecimiento.

- 50 TABLA 2: El IGF-1 y IGFBP-5 unidos a vitronectina estimulan la síntesis de proteína en queratinocitos humanos HaCAT. Se derivan los datos de las mediciones de incorporación de ³H-leucina y se expresan como % de estimulación por encima del control (sin IGF-I, IGFBP-5 o vitronectina) durante 24 hr a partir de un experimento individual en el que cada tratamiento se prueba por triplicado. Se agrega IGF-I a IGFBP-5 (5 ng/pozo) en la presencia (+) de vitronectina (300 ng/pozo) o en la ausencia (-) de vitronectina.

FIGURA 1: Ensayo de unión de competencia utilizando concentraciones incrementadas de ya sea insulina (A) o IGF-II (♦) para competir con [¹²⁵I]-IGF-II para unión a 300 ng de vitronectina (VN) por pozo. Se agrega IGF-II radiomarcado (10,000 cpm) a pozos recubiertos con VN y se determina el número de conteos unidos después de incubación durante la noche y diversos lavados. La unión se expresa como un porcentaje de la unión observada en

los pozos de control sin agregar IGF-II o insulina. Los resultados se muestran como el promedio de las tres réplicas \pm desviación estándar a partir de un experimento representativo de tres experimentos.

5 FIGURA 2: Ensayo de unión de competencia utilizando concentraciones incrementadas de ya sea IGF-I o IGF-II para competir con [¹²⁵I]-IGFII para unión a 300 ng de vitronectina (VN) por pozo. Se agrega IGF-II radiomarcado (10,000 cpm) a ya sea a placas recubiertas con VN (■) - o IGFBP2 (◆) y se determina el número de conteos unidos después de incubación durante la noche y diversos lavados. La unión se expresa como un porcentaje de la unión observada en pozos de control sin agregar IGF.

10 FIGURA 3: Ensayo de unión de competencia utilizando concentraciones incrementadas de ya sea proIGF-II (■) o IGF-II (◆) para competir con [¹²⁵I]-IGF-II para unión a 300 ng de vitronectina (VN) por pozo. Se agrega IGF-II radiomarcado (10,000 cpm) a pozos recubiertos con vitronectina y se determina el número de conteos unidos después de una incubación durante la noche y diversos lavados. La unión se expresa como un porcentaje de la unión observada en los pozos de control sin agregar IGFII o proIGF-II. Los resultados se muestran como el promedio de tres réplicas \pm EEM de dos experimentos separados.

15 FIGURA 4: Ensayo de unión de competencia utilizando concentraciones incrementadas de ya sea PAI-1 (■) o IGF-II (◆) para competir con [¹²⁵I]-IGF-II para unión a 300 ng de vitronectina (VN) por pozo. Se agrega IGF-II radiomarcado (10,000 cpm) a pozo recubierto con vitronectina y se determina el número de conteos unidos después de una incubación durante la noche y diversos lavados. La unión se expresa como un porcentaje de la unión observado en los pozos de control sin agregar IGF-II o PAI-1. Los resultados se muestran como el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos separados.

20 FIGURA 5: Ensayo de unión de competencia que compara el efecto de preincubación de (A) IGF-II y IGFBP3 y (B) IGF-I y IGFBP3 luego de unión a vitronectina. La IGFBP3 no se glicosila ni se produce en E. coli. Concentraciones incrementadas de IGFBP3 más ya sea 10,000 cpm [¹²⁵I]-IGF-II (A) o [¹²⁵I]-IGF-I (B) se preincuban durante 4 hr y se agregan a pozos recubiertos con vitronectina. Alternativamente, se agregan IGFBP3 más ya sea 10,000 cpm de [¹²⁵I]-IGF-II (A) o [¹²⁵I]-IGF-I (B) a pozos recubiertos con vitronectina sin preincubación. La unión se expresa como el cpm obtenido en la ausencia de unión no específica. Los resultados se muestran como el promedio de tres réplicas de un experimento representativo de tres experimentos separados.

25 FIGURA 6: Unión de IGF-I marcado a pozos recubiertos con VN en la presencia de: (A) IGFBP1, (B) IGFBP2, (C) IGFBP3, (D) IGFBP4, (E) IGFBP5 y (F) IGFBP6. Las IGFBP recombinantes se producen en células de mamífero. Los datos, expresados como cpm promedio de IGF-I marcado unido/ pozo recubierto con NV (300 ng/pozo) en la presencia del IGFBP indicado son de seis determinaciones individuales. Se agregan diez mil cpm de IGF-I radiomarcado a cada pozo.

FIGURA 7: Unión de IGF-I marcado a VN en la presencia de "IGFBP-3 Gly" (IGFBP-3 glicosilado), "mutante IGFBP-3 HBD" (IGFBP-3 con el dominio de unión de heparina putativo mutado) y con "IGFBP-3 no-gly" (IGFBP-3 no glicosilado).

35 FIGURA 8: Ensayo de unión de competencia utilizando concentraciones incrementadas de IGFs y desIGFs para competir con IGFBP-3 no glicosilado incubado con [¹²⁵I]-IGF-I o -II. Se agregan 30 ng (A) o 10 ng (B) de IGFBP3 más 10,000 cpm de [¹²⁵I]-IGFII (A) o IGF-I (B) a pozos recubiertos con VN. Se agregan concentraciones incrementadas IGF-I, IGF-II, des (1-3) IGF-I (no mostrado) y des(1-6) IGF-II para competir con el radiomarcado para unión a VN. Los pozos de control recubiertos con VN tratados con ya sea 10 ng (A) o 30 ng (B) de IGFBP3 se muestran con los pozos de control recubiertos con solo VN. La unión se expresa como el cpm obtenido en la ausencia de unión no específica. Los resultados se expresan como el promedio de tres réplicas \pm desviación estándar de un experimento representativo de tres experimentos separados.

40 FIGURA 9: Estimulación de síntesis de proteína en queratinocitos humanos. Los datos, expresados como % de estimulación por encima del control (-VN, -IGF-II) durante 24 h se agrupan a partir de tres experimentos de réplica en los que cada tratamiento se prueba por triplicado. El efecto aditivo teórico representado por las barras en blanco (efecto de VN solo) combinado con barras grises (efecto de IGFII solo) se compara con el efecto real observado de IGF-II preunido a VN (barras negras). En todos los casos excepto en los de concentración más baja de IGF-II probado, el efecto observado real es significativamente mayor ($p < 0.05$) que el efecto aditivo calculado.

50 FIGURA 10: Unión de IGF-II marcado a pozos recubiertos con VN en la presencia de: (A) IGFBP1, (B) IGFBP2, (C) IGFBP3, (D) IGFBP4, (E) IGFBP5 y (F) IGFBP6. Las IGFBP recombinantes se producen en células de mamífero. Los datos, expresados como cpm promedio de IGF-II marcado unido/pozo recubierto con NV (300 ng/pozo) en la presencia de la IGFBP indicada son de seis determinaciones individuales. Se agregan diez mil cpm de IGF-II radiomarcado a cada pozo.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención ha surgido, por lo menos en parte, a partir del descubrimiento por los presentes inventores de que el IGF-I se une a vitronectina a través de una interacción de unión entre una IGFBP y vitronectina. Adicionalmente, se describe que también se pueden utilizar IGFs y IGFBPs variantes para aumentar o reducir la

- 5 unión entre IGFS, IGFbps y vitronectina. Estos descubrimientos han llevado a los presentes inventores a manipular estas interacciones de unión in vitro con el fin de manipular eventos biológicos in vivo contingentes asociados con el crecimiento, proliferación y migración celular. Esta invención por lo tanto tiene utilidad en los tratamientos médicos tales como cicatrización de heridas, reparación de la piel, regeneración ósea, y terapia de cáncer en áreas médicas y veterinarias.
- Para los propósitos de esta invención, por "aislado" se entiende eliminado de un estado natural o de otra forma sometido a manipulación humana. El material aislado puede estar sustancialmente o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural, o se puede manipular con el fin de estar en un estado artificial junto con los componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural.
- 10 Por "polipéptido" también se entiende "proteína", ya sea el término que se refiere a un polímero de aminoácidos.
- Se pueden aislar las proteínas y péptidos inclusive de factor de crecimiento, proteínas de unión de factores de crecimiento y proteínas de vitronectina en forma natural, sintética química o sintética recombinante.
- Un "péptido" es una proteína que tiene no más de cincuenta (50) aminoácidos.
- 15 Un "fragmento biológicamente activo" es un fragmento, porción o segmento de una proteína que exhibe por lo menos 1%, preferiblemente por lo menos 10%, más preferiblemente por lo menos 25% y aún más preferiblemente por lo menos 50% de la actividad biológica de la proteína.
- Los péptidos se pueden sintetizar fácilmente mediante técnicas de síntesis química o recombinantes. Por ejemplo, se puede hacer referencia a la síntesis en solución o la síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 9 titulado "Peptide Synthesis" por Atherton & Shephard que se incluye en una publicación titulada "Synthetic Vaccines", editada por Nicholson y publicada por Blackwell Scientific Publications. Los métodos de síntesis de péptidos también se describen en el capítulo 18 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY, 1997). Alternativamente, se pueden producir péptidos mediante la digestión de un polipéptido de la invención con proteasas tales como endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C y V8-proteasa de Estafilococos. Se pueden purificar los fragmentos digeridos mediante, por ejemplo, técnicas de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).
- 20 Los péptidos se pueden sintetizar fácilmente mediante técnicas de síntesis química o recombinantes. Por ejemplo, se puede hacer referencia a la síntesis en solución o la síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 9 titulado "Peptide Synthesis" por Atherton & Shephard que se incluye en una publicación titulada "Synthetic Vaccines", editada por Nicholson y publicada por Blackwell Scientific Publications. Los métodos de síntesis de péptidos también se describen en el capítulo 18 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY, 1997). Alternativamente, se pueden producir péptidos mediante la digestión de un polipéptido de la invención con proteasas tales como endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C y V8-proteasa de Estafilococos. Se pueden purificar los fragmentos digeridos mediante, por ejemplo, técnicas de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).
- 25 Se discute aquí un complejo de proteína aislado que comprende vitronectina, un factor de crecimiento y una proteína de unión a factor de crecimiento.
- Por "factor de crecimiento" se entiende una molécula que estimula o promueve el crecimiento de un organismo o de células de dicho organismo. Un factor de crecimiento puede ser una proteína o péptido que estimula la división celular, y en la división celular de mamíferos.
- 30 Los complejos de proteína aislados de la invención comprenden el factor de crecimiento IGF-I.
- Los polipéptidos de IGF y IGFbp aislados están disponibles comercialmente a partir de fuentes tales como GroPep (Adelaide, Australia), mientras que los polipéptidos VN están disponibles comercialmente a partir de fuentes tales como Promega Corporation (Madison WI, EE.UU.). Los IGF recombinantes, IGFbp y VN se preparan fácilmente por las personas expertas en la técnica, como se discutirá en más detalle más adelante.
- 35 Como apreciará el experto, existen formas precursoras de IGFs. Ejemplos de proteínas pro-IGF-I son proteínas IGF-I a las que se les ha eliminado el péptido de señal, pero no se procesan completamente por división del dominio E. El IGF-I tiene tres dominios E diferentes que resultan del corte de ARNm diferencial y estas proteínas precursoras pueden estar presentes en complejos de proteína aislados de la invención.
- 40 La invención contempla complejos de proteína aislados que comprenden vitronectina monomérica y multimérica, como la vitronectina puede existir en estados monoméricos y multiméricos. En particular, el VN multimérico se acumula en áreas de lesión vascular y también es la forma predominante de VN en el tejido. Así, la forma multimérica de VN proporciona la oportunidad de formar un complejo VN en el que más de un tipo de factor de crecimiento o una proteína de unión al factor de crecimiento se puede suministrar al mismo tiempo.
- 45 También se apreciará por el experto que los complejos de proteínas aislados de la invención pueden incluir vitronectina en estados "natural", "desnaturalizado" o "extendido" como se entiende bien en la técnica.
- Las variantes de IGF-BP3 o IGFbp5 se puede utilizar para formar complejos de proteína aislados de la invención y pueden ser útiles en los métodos de uso descritos aquí.
- 50 Como se utiliza aquí, proteínas, polipéptidos y péptidos "variantes" incluyen aquellos en los que se han sustituido uno o más aminoácidos por diferentes aminoácidos.
- Se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos se pueden cambiar a otros con propiedades ampliamente similares, sin cambiar la naturaleza de la actividad de los polipéptidos (sustituciones conservadoras).

- Se pueden hacer cambios sustanciales en la función al seleccionar sustituciones que son menos conservadoras. Otros reemplazos serían sustituciones no conservadoras y relativamente se pueden tolerar pocos de éstos. De forma general, las sustituciones que probablemente producen los mayores cambios en una propiedad del polipéptido son aquellas en las que (a) se sustituye un residuo hidrófilo (por ejemplo, Ser o Thr) para, o por, un residuo hidrófobo (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val); (b) se sustituye una cisteína o prolina para, o por, cualquier otro residuo; (c) se sustituye un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) para, o por, un residuo electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp) o (d) se sustituye un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa (por ejemplo, Phe o Trp) para, o por, uno que tiene una cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala, Ser) o no tiene cadena lateral (por ejemplo, Gly).
- 5
- 10 Dichos derivados incluyen supresiones y/o adiciones de aminoácidos.
- Otras variantes de polipéptido y péptido tienen modificación en cadenas laterales.
- Las modificaciones incluyen dentro de su alcance variantes de glicosilación ligadas a O y N- y formas no glicosiladas de proteínas que, en su estado de ocurrencia natural, son glicosiladas.
- 15 Con respecto a las variantes, éstas se pueden crear mediante mutagenia de un polipéptido o mediante mutagenia de un ácido nucleico codificado, por ejemplo mediante mutagenia aleatoria o mutagenia dirigida al sitio. Se proporcionan ejemplos métodos de mutagenia de ácidos nucleicos en el capítulo 9 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel et al., Supra.
- 20 Se apreciará por el experto que la mutagenia dirigida al sitio se realiza mejor cuando está disponible el conocimiento de los residuos de aminoácidos que contribuyen a la actividad biológica. En muchos casos, esta información no está disponible, o sólo se puede deducir por ejemplo mediante aproximaciones de modelización molecular.
- 25 En tales casos, se contempla mutagenia aleatoria. Los métodos de mutagenia aleatoria incluyen modificación química de proteínas mediante hidroxilamina (Ruan et al., 1997, Gene 188 35), la incorporación de análogos de dNTP en ácidos nucleicos (Zaccolo et al., 1996, J. Mol. Biol. 255 589) y mutagenia aleatoria con base en PCR tal como se describe en Stemmer, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 10747 o Shafikhani et al., 1997, Biotechniques 23 304, cada una de las cuales se incorpora aquí como referencia. También se observa que los equipos de mutagenia aleatoria con base en PCR están disponibles comercialmente, tales como el equipo Diversificar™ (Clontech).
- 30 Se describe el uso de variantes del factor de crecimiento tales como des (1-6) IGF-II y des (1-3) IGF-I para formar complejos de proteínas aislados.
- Se describirán otros IGFs e IGFbPs variantes útiles como agonistas o antagonistas en más detalle adelante.
- Complejos de factores de crecimiento recombinantes
- 35 Se apreciará que los complejos de proteínas aislados se pueden producir utilizando factores de crecimiento recombinantes, proteínas de unión a factor de crecimiento y/o vitronectina, mediante expresión de un ácido nucleico codificante en una célula anfitriona apropiada o en un sistema de expresión libre de células como son bien conocido en la técnica.
- El término "ácido nucleico" tal como se utiliza aquí designa mRNA, ARN, ADN y cARN de hebra sencilla o doble, dicho ADN inclusive de ADNc y ADN genómico.
- Un "polinucleótido" es un ácido nucleico que tiene ochenta (80) o más nucleótidos contiguos, mientras que una "oligonucleótido" tiene menos de ochenta (80) nucleótidos contiguos.
- 40 Una "sonda" puede ser un oligonucleótido o polinucleótido de hebra sencilla o doble, adecuadamente marcado con el fin de detectar secuencias complementarias en, por ejemplo, inmunotransferencia Northern o Southern.
- 45 Un "cebador" es usualmente un oligonucleótido de hebra sencilla, que tiene preferiblemente 15-50 nucleótidos contiguos, que es capaz de hibridar a un ácido nucleico complementaria "plantilla" y que se extiende de una manera dependiente de plantilla mediante la acción de una polimerasa de ADN tal como polimerasa Taq, la polimerasa de ADN dependiente de ARN o Sequenase™.
- Se conocen bien en la técnica los ácidos nucleicos que codifican IGFs, IGFbPs y VN y han estado disponibles durante muchos años. Sin embargo, el experto se refiere a la Tabla 1 que enumera referencias que proporcionan ejemplos de estas secuencias de ácido nucleico.
- Se pueden preparar ácidos nucleicos de acuerdo con el siguiente procedimiento:
- 50 (i) crear cebadores que opcionalmente, se degeneran en donde cada una comprende una porción respectiva de un ácido nucleico objetivo, y

(ii) utilizar dichos cebadores en combinación con una técnica de amplificación de ácido nucleico para amplificar uno o más productos de amplificación a partir de un extracto de ácido nucleico.

5 Son bien conocidas por el experto las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos adecuadas, e incluyen la reacción de cadena de polimerasa (PCR) como se describe por ejemplo en el capítulo 15 de Ausubel et al. supra; amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), como por ejemplo se describe en la Patente Estadounidense No. 5,422,252; replicación por círculo rodante (RCR) como por ejemplo se describe en Liu et al, 1996, J. Am.. Chem. Soc. 118 1587, Solicitud Internacional WO 92/01813 y Solicitud Internacional WO 97/19193; amplificación con base en secuencias de ácido nucleico (NASBA), como por ejemplo se describe por Sooknanan et al, 1994, Biotechniques 17 1077; reacción de cadena ce ligasa (LCR) como se describe por ejemplo en la Solicitud Internacional 10 WO89/09385, y amplificación de Q-₂ replicasa, como se describe por ejemplo por Tyagi et al, 1996, Proc.. Natl. Acad. Sci. USA. 93 5395.

Como se utiliza aquí, un "producto de amplificación" se refiere a un producto de ácido nucleico generado por técnicas de amplificación de ácido nucleico.

15 Se pueden preparar proteínas recombinantes mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, se pueden preparar la proteína recombinante mediante un procedimiento que incluye las etapas de:

- (i) preparar una construcción de expresión que comprende un ácido nucleico, ligado en forma funcional a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras;
- (ii) transfectar o transformar de una célula anfitriona adecuada con la construcción de expresión, y
- 20 (iii) expresar el polipéptido en dicha célula anfitriona.

Para propósitos de expresión de célula anfitriona, el ácido nucleico recombinante se liga en forma funcional a una o más secuencias reguladoras en un vector de expresión.

Un "vector de expresión" puede ser un vector extracromosómico auto-replicante tal como un plásmido, o un vector que se integra en un genoma anfitrión.

25 Por "ligado en forma funcional" se entiende que dicha secuencia de nucleótido reguladora está posicionada con relación al ácido nucleico recombinante de la invención para iniciar, regular o de otra forma controlar la transcripción.

Las secuencias de nucleótidos reguladoras de forma general serán apropiadas para la célula anfitriona utilizada para expresión. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas son conocidas en la técnica para una variedad de células anfitrionas.

30 Normalmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias de promotor, líder o secuencias señal, sitios de unión ribosómico, inicio de transcripción y secuencias de terminación, inicio de traducción y secuencias de terminación, y secuencias potenciadoras o activadoras.

Se describen promotores constitutivos o inducibles como se conocen en la técnica. Los promotores pueden ser promotores de origen natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor.

35 El vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células anfitrionas transformadas. Los genes marcadores seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula anfitriona utilizada.

40 El vector de expresión también puede incluir un socio de fusión (normalmente proporcionado por el vector de expresión) de tal manera que el polipéptido recombinante se expresa como un polipéptido de fusión con dicho socio de fusión. La principal ventaja de los socios de fusión es que facilitan la identificación y/o purificación de dicho polipéptido de fusión y también mejoran los niveles de expresión de proteínas y rendimiento general.

Con el fin de expresar dicho polipéptido de fusión, es necesario ligar una secuencia de nucleótido en el vector de expresión de tal manera que coincidan los cuadros de lectura traduccionales del socio de fusión y la secuencia de nucleótidos de la invención.

45 Ejemplos bien conocidos de socios de fusión incluyen, pero no se limitan a, glutationa-S-transferasa (GST), porción Fc de la IgG humana, proteína de unión a maltosa (MBP) y hexahistidina (HIS6), que son particularmente útiles para el aislamiento del polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para propósitos de purificación de polipéptido de fusión por cromatografía de afinidad, las matrices relevantes para la cromatografía de afinidad son resinas conjugadas con glutationa-, amilasa-, y níquel-o cobalto respectivamente. Muchos de tales matrices están disponibles en forma de "equipo", tal como el sistema QIAexpress TM (Qiagen) útil con socios de fusión (HIS6) y el sistema de purificación Pharmacia GST.

50

Otro socio de fusión bien conocido en la técnica es la proteína verde fluorescente (GFP). Este socio de fusión sirve como una "etiqueta" fluorescente que permite que el polipéptido de fusión sea identificado por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo. La etiqueta GFP es útil para evaluar la localización subcelular del polipéptido de fusión, o para el aislar células que expresan el polipéptido de fusión. Los métodos de citometría de flujo tales como clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) son particularmente útiles en esta última aplicación.

5 En algunos casos, los socios de fusión también tienen un sitio de división de proteasa, tal como para el Factor Xa o Trombina, que permiten a la proteasa relevante digerir parcialmente el polipéptido de fusión y de ese modo liberar el polipéptido recombinante de la misma. El polipéptido liberado luego se puede aislar del socio de fusión de mediante separación cromatográfica posterior.

10 Los socios de fusión también incluyen dentro de su alcance "etiquetas de epítipo", que usualmente son secuencias de péptidos cortas para las cuales hay un anticuerpo específico disponible. Ejemplos bien conocidos de etiquetas de epítipo de anticuerpos monoclonales específicos que están fácilmente disponibles incluyen c-myc, hemaglutinina del virus de la influenza y las etiquetas FLAG.

15 La proteína recombinante se puede preparar convenientemente por un experto en la técnica utilizando protocolos estándar como se describe por ejemplo en Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular el capítulo 16 y 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al, (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular los capítulos 10 y 16; y CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley&Sons, Inc. 1995-1999), en particular los capítulos 1, 5 y 6.

20 Se pueden realizar por separado la expresión recombinante de factor de crecimiento, proteína de unión al factor de crecimiento y vitronectina, y los complejos formados a partir de los mismos.

Se puede realizar la expresión recombinante de factor de crecimiento, proteína de unión a factor de crecimiento y vitronectina en la misma célula, y los complejos formados de a partir de la misma.

25 Como anteriormente, los polipéptidos descritos aquí se pueden producir al cultivar una célula anfitriona transformada con dicha construcción de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica polipéptido, u homólogo de polipéptido. Las condiciones apropiadas para la expresión de la proteína variarán con la elección del vector de expresión y la célula anfitriona. Esto se determina fácilmente por los expertos en la técnica a través de experimentación de rutina.

30 Las células anfitrionas adecuadas para la expresión recombinante incluyen bacterias tales como E. coli., Clostridium sp., Pseudomonas sp., levadura, células vegetales, células de insecto (por ejemplo, Sf9) y células de mamíferos tales como los fibroblastos y los queratinocitos.

Las células anfitrionas pueden ser queratinocitos humanos.

35 Se contemplan vectores de expresión inducibles y no inducibles. En células de mamífero transfectadas de manera estable, se han ideado una serie de sistemas inducibles y reprimibles que incluyen metalotionina inducible (MT) y tetraciclina y reprimibles (tetR).

Los ejemplos particulares de vectores de expresión adecuados y métodos de expresión recombinante IGFBP se puede encontrar en la Patente de Estados Unidos 5,973d115.

Imitadores, agonistas y antagonistas

40 Se describen agentes que pueden promover, prevenir o interrumpir la formación de complejos de proteínas que comprenden factores de crecimiento, proteínas de unión a factor de crecimiento y de vitronectina. Tal agente puede ser un imitador. El término "imitador" se utiliza aquí para referirse a moléculas que se diseñan para parecerse a determinadas regiones funcionales de proteínas o péptidos, e incluye dentro de su alcance los términos "agonista", "análogo" y "antagonista", como se conocen bien en la técnica.

45 De relevancia es la aclaración de las porciones de IGF y IGFBP que son responsables de la unión a IGF-IGFBP, como se describe en la Publicación Internacional WO00/23469. Adicionalmente, se han hecho variantes agonistas de IGF-I que se unen selectivamente a IGFBP-1 o IGFBP-3, como se describe en la Publicación Internacional WO00/40612.

50 Por lo tanto, se podrían diseñar por ingeniería agentes que interrumpen o evitan la formación de complejos de polipéptido entre IGFBPs y VN. Un ejemplo podría ser un péptido que compite por la unión de la IGFBP a VN al asemejar al sitio de unión en VN o IGFBP.

Como se describirá en más detalle más adelante, el IGF-II es un agente que puede inhibir la unión entre un IGFBP y vitronectina. También se ha propuesto que podrían ser eliminados los residuos V35 o S36 junto con S39 de la secuencia RVSRRSR en las posiciones 34- 40 en el dominio C de IGF-II para asemejarse de ese modo el HBD de

IGFBP3 (BXBBB en donde B es un residuo de aminoácido básico). Esto crearía un agente aún más capaz de inhibir la formación de un complejo entre IGFBPs y vitronectina.

5 Un ejemplo de un agonista de IGF-1 diseñado por ingeniería para incluir un dominio de unión a heparina (HBD) de una IGFBP para enlazar directamente por consiguiente vitronectina. Por ejemplo, la secuencia SSSRRAPQT en el dominio C de IGF-I se puede diseñar por ingeniería para tener un motivo BXBBB. Un motivo BXBBB incluye la secuencia KGRKR de IGFBP-3 (residuos 228-232).

Alternativamente, se puede introducir el dominio de unión de vitronectina putativo de IGF-II: RVSRRSR (residuos 34 a 40) en IGF-I.

10 Un ejemplo de un antagonista es un IGFBP diseñado por ingeniería para mutar residuos básicos en la HBD (como se describió anteriormente) reducir o evitar la unión de IGFBP a vitronectina.

De forma adecuada, la IGFBP diseñada por ingeniería es capaz de unir el IGF-I.

La IGFBP diseñada por ingeniería puede ser IGFBP-3 o IGFBP-5.

15 También se contempla que un análogo de un IGFBP puede ser diseñado por ingeniería lo que permite la formación de un complejo entre el análogo y VN. De forma adecuada, el análogo también se une a un IGF. Las ventajas potenciales de tal análogo es que se puede sintetizar más fácilmente o aislar de una IGFBP, tener una vida biológica media particular deseada y quizás ser diseñado por ingeniería para unirse específicamente a IGF-I.

Composiciones Farmacéuticas

20 Se describe la administración de un complejo de proteínas como se discutió anteriormente en la forma de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas incluyen los complejos de proteínas aisladas como se describió anteriormente.

De forma adecuada, la composición farmacéutica comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir variantes de polipéptidos, fragmentos o imitadores como se definió aquí anteriormente.

25 Por "portador farmacéuticamente aceptable" se entiende un relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia encapsulante que se puede utilizar de manera segura en la administración sistémica. Dependiendo de la ruta particular de administración, se puede utilizar una variedad de portadores, bien conocidos en la técnica. Estos portadores 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 reguladas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica, y agua libre de pirógenos.

30 Se puede emplear cualquier ruta de administración adecuada para proporcionar a un paciente con la composición. Por ejemplo, oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intra-articular, intra-muscular, intradérmica, subcutánea, por inhalación, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica y similares se pueden emplear. La inyección intra-muscular y subcutánea es apropiada, por ejemplo, para la administración de composiciones inmunogénicas, vacunas y vacunas de ADN.

35 Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, pastillas, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este propósito u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente en esta forma. Se puede efectuar la liberación controlada del agente terapéutico mediante el recubrimiento del mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico y ciertos derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa. Además, la liberación controlada se puede efectuar utilizando otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

45 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral o parenteral se pueden presentar como unidades discretas tales como cápsulas, sobres o comprimidos, cada uno contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos de la invención, como un polvo o gránulos o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión aceite en agua o una emulsión líquida agua en aceite.

Usos Terapéuticos

Se discuten los métodos de tratamiento que utilizan complejos de polipéptido descritos anteriormente. Estos métodos se dirigen particularmente a tratamiento terapéutico de mamíferos, y más particularmente humanos.

50 Dichos métodos incluyen administración de composiciones farmacéuticas como se definió aquí anteriormente, y puede ser a través de inyección con microagujas en sitios de tejidos específicos, tales como los descritos en la patente Estadounidense 6,090,790, cremas tópicas, lociones o apósito sellante aplicado a heridas, quemaduras o

úlceras, tal como se describe en la patente Estadounidense 6,054,122 o implantes que liberan la composición tal como se describe en la Publicación Internacional WO99/47070.

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

- 5 Se pueden utilizar estos métodos para estimular la proliferación celular y de este modo facilitar el progreso o la curación de heridas y quemaduras, reparación de lesiones de la piel tales como úlceras, reemplazo e injerto de tejido tal como mediante el cultivo in vitro de piel autóloga.

10 Se ha llegado a conocer bien la terapia de reemplazo de piel en la técnica, y puede emplear el uso de estirpes celulares de epitelio/queratinocitos co-cultivadas, por ejemplo como se describe en Kehe et al., 1999, Arch. Dermatol. Res. 291 600 o en cultivo in vitro de células epidérmicas principales (usualmente autólogas), dérmicas y/o de queratinocitos. También se pueden utilizar estas técnicas biomateriales modificadas por ingeniería y polímeros sintéticos "andamios".

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

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

20 También se contemplan andamios de polímero con el propósito de facilitar el reemplazo de la piel por ingeniería, como se describe por ejemplo en Sheridan et al., 2000, J. Control Release 14 91 y Fauza et al., 1998, supra, ya que son microesferas como agentes para el suministro de células de piel para heridas y quemaduras (LaFrance & Armstrong, 1999, Tissue Eng. 5 153).

25 Se describe el uso de complejos de proteína aislados descritos aquí para promover la proliferación celular de la piel para propósitos de reemplazo de tejido y para tratamientos cosméticos para la piel.

Con respecto a la regeneración ósea, se discuten implantes quirúrgicos o protésicos recubiertos, impregnados o de otra forma pretratados con un complejo de proteína aislado descrito anteriormente.

30 Por el contrario, la inhibición o supresión de la proliferación y migración celular al evitar o interrumpir la formación de complejos de IGF-IGFBP-VN puede constituir un tratamiento profiláctico o terapéutico de cánceres epiteliales tales como el cáncer de mama.

Con el fin de que se pueda entender fácilmente la invención y tener una aplicación práctica, se describirán ahora las realizaciones preferidas particulares por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

35 Todos los ensayos de unión competitiva de radioligandos como se describen aquí se realizan esencialmente como se describe en Upton et al., 1999, supra.

EJEMPLO 1

Ensayo de unión de competencia para evaluar la capacidad de la insulina, pro-IGF-II e IGF-I para competir con IGF-II para la unión a vitronectina

40 Debido a la similitud en la estructura compartida entre los IGF e insulina, se examina la unión de insulina a vitronectina. Los experimentos de entrecruzamiento realizados por Upton et al., 1999, supra indican que es poco probable que la insulina compita con el IGF-II para unión a vitronectina, como es el caso con IGF-1. Como consecuencia, se examinan altas concentraciones de insulina con el fin de establecer si la insulina podría competir con IGF-II radiomarcado para unión a vitronectina. Los resultados mostrados en la FIGURA 1 indican que, para la situación observada originalmente con IGF-I (Upton et al., 1999, supra), la insulina compitió pobremente con [¹²⁵I]-IGF-II para unión a vitronectina.

La investigación de IGF-I como un competidor para la unión IGF-II a vitronectina revela que el IGF-I, podría competir con la unión de [¹²⁵I]-IGF-II a vitronectina (FIGURA 2). Sin embargo, el IGF-I es marcadamente menos eficaz que el IGF-II en la competencia con IGF-II radiomarcado para la unión a vitronectina, lo que requiere un aproximado de 3000 veces más en la concentración de IGF-I por encima de IGF-II para alcanzar el mismo efecto.

50 Los estudios similares demuestran que el proIGF-II podría competir con [¹²⁵I]-IGF-II para unión a vitronectina (FIGURA 3). El ProIGF-II no fue tan eficaz como el IGF-II en la competencia con [¹²⁵I]-IGF-II para unión a vitronectina con valores de CI50 de 65.6 nM y 9.6 nM, respectivamente. Por lo tanto, la presencia del dominio E dentro de proIGF-II representa una modificación estructural que altera la unión a vitronectina. Esto se podría deber al

impedimento estérico por el dominio adicional en proIGF-II en comparación con IGF-II, o puede ser un resultado de una estructura alterada de la molécula de proIGF-II, que altera la afinidad de proIGF-II de la vitronectina.

EJEMPLO 2

Investigación de PAI-1 y uPAR como competidores para la unión de IGF-II a vitronectina

5 Se investigan el PAI-1 y suPAR como moléculas que podrían competir con IGF-II para unión a vitronectina, ya que se ha informado que estas proteínas se unen a vitronectina (Declerck et al., 1988, J. Biol. Chem. 263 15454; Wei et al., 1994, J. Biol. Chem. 269 32380; Kanse et al., 1996, Exp. Cell Res. 344 224). En concentraciones de hasta de 2000 nM se observa competencia de PAI-1 con 125 I-IGF-II para unión a vitronectina con un valor de IC50 aproximado de 524 nM (FIGURA 4). Si bien esta concentración es relativamente alta en términos de valores IC50, dichas
10 concentraciones se pueden encontrar in vivo asociadas con tumores (Grondahl-Hansen et al., 1993, Cancer Res. 53 2513). En efecto, Kjoller et al., 1997, Exp. Cell Res. 232 420, encontró que se requiere 370 nM de PAI-1 para alcanzar la mitad del efecto máximo en una evaluación de ensayo de la capacidad del PAI-1 para inhibir la migración celular de células WISH. Se postula esta inhibición para resultar a través de PAI-1 que compite con las integrinas y uPAR para unión a vitronectina. Así, la interacción observada entre PAI-1, IGF-II y vitronectina de hecho puede tener
15 consecuencias funcionales in vivo, particularmente cuando los niveles de IGF-II y PAI-1 se expresan altamente como a veces se encuentran en los tumores.

Aunque se sabe que el PAI-1 se une al dominio B de somatomedina de terminal N de vitronectina, las altas concentraciones de PAI-1 requeridas para competir eficazmente con IGF-II para unión a vitronectina sugieren que estos estudios no han proporcionado información clara acerca de la localización de IGF-II del sitio de unión de
20 vitronectina. Sin embargo, se pueden interpretar los resultados de dos maneras. La primera posibilidad es que la competencia observada entre el IGF-II y PAI-1 se debe a la competencia parcial en el sitio de alta afinidad principal en vitronectina dentro del dominio B de somatomedina a través de impedimento estérico. Alternativamente, la competencia se podría deber a la competencia directa entre IGF-II y PAI-1, para unirse a un sitio en vitronectina al cual se une PAI-1 con una afinidad reducida. Se requieren otros estudios experimentales adicionales para aclarar esta cuestión.

Si bien los presentes inventores no pudieron demostrar que el suPAR soluble compite por la unión de IGF-II a VN, esto se puede deber al hecho de que suPAR liofilizado se utiliza después del transporte internacional. No hay evidencia que el suPAR reconstituido es biológicamente activo después de la reconstitución, aunque la observación de que los 125 I-suPAR no se unen a VN (datos no mostrados) tal vez apoya la interpretación de que es inactivo el
30 suPAR utilizado en estos estudios.

El uso de técnicas similares a aquellas que identifican el sitio de unión de PAI-1 sobre vitronectina que están dentro de un fragmento de vitronectina que contiene los 44 aminoácidos de terminal N (Deng et al., 1995, Thromb. Haemost. 74 66), puede establecer si la competencia observada entre PAI-1 e IGF-II para unirse a vitronectina es el resultado de cualquiera de estas posibilidades.

35 Se ha mostrado previamente que la forma soluble del receptor de uroquinasa (suPAR) se puede unir a la vitronectina inmovilizada (Wei et al., 1994, supra). En los estudios reportados aquí, sin embargo, incluso a concentraciones de hasta 300 nM, no se observa competencia entre suPAR y 125 I-IGF-II para unión a vitronectina.

EJEMPLO 3

Unión de IGF-I e IGF-II a vitronectina en presencia de IGFBP-3 no glicosilado recombinante

40 Para investigar si las IGFBP podrían mediar la unión de los IGF a vitronectina, se evalúa el efecto de concentraciones incrementadas de IGFBP-3 en presencia de 125 I-IGF-I o 125 I-IGF-II. Los resultados se muestran en la FIGURA 5.

En las concentraciones probadas, 10 ng de IGFBP-3 por pozo provoca la mayor cantidad de 125 I-IGF-I para unir a los pozos recubiertos con vitronectina, mientras que 30 ng de IGFBP-3 por pozo provoca la mayor cantidad de 125 I-IGF-II para unir a los pozos recubiertos con vitronectina. El efecto es más notable en el caso de los 125 I-IGF-I, en
45 razón a que los bajos conteos de unión de 125 I-IGF-I a vitronectina, e incluso a la menor concentración de IGFBP-3 (3.7 ng), se aumenta esta unión (FIGURA 5A). Por el contrario el 125 I-IGF-II no muestra un aumento sobre unión obtenida en pozos recubiertos solo con vitronectina, hasta que se alcanzan concentraciones de 11 ng/100 μ L - 33 ng/100 μ L (FIGURA 5B).

50 La preincubación de IGFBP-3, ya sea con 125 I-IGF-I o 125 I-IGF-II no altera la unión a vitronectina, en comparación con las concentraciones no preincubadas de IGFBP-3 y 125 I-IGF-I o 125 I-IGF-II.

EJEMPLO 4

Unión de IGF-I a vitronectina en presencia de IGFBP recombinante producida en células de mamífero

Los ensayos de unión que examinan la capacidad de [¹²⁵I]-IGF-I para unirse a platos recubiertos con VN en la presencia de IGFBP, agregadas al mismo tiempo que el radiomarcador, se realizan como se describe en Upton et al., 1999, supra. Los datos se muestran en la FIGURA 6. Las cantidades incrementadas de IGFBP-2, -4 y -5 resultan en una mayor unión de IGF-I marcado a pozos recubiertos con vitronectina. En la mayor cantidad de IGFBP probado, 5 ng, de unión de IGF-I marcado se incrementa aproximadamente 2,8 -, 3,8-y 8-veces para IGFBP-2, 4 y 5 en comparación con los pozos de control donde está presente VN, pero no IGFBPs.

La presencia de IGFBP-3 a 0,05, 0,2 y 0,5 ng / pozo también aumenta la unión de IGF-I marcado a VN mientras que 2 y 5 ng de IGFBP-3/pozo parece inhibir la unión de el radiomarcador. Todas las concentraciones de IGFBP-1 y -6 probadas también fueron inhibitorias.

Estos resultados demuestran que a diferencia de la situación con IGF-II, se observa la unión directa mínima de IGF-I a VN. Sin embargo, la presencia de IGFBP, especialmente IGFBP-2, -3, -4 y -5 mejora la unión de IGF a pozos recubiertos con VN, lo que sugiere que las IGFBP median la unión de IGF-I a VN en esta situación. Además, los datos sugieren que las IGFBP tienen el potencial para mejorar e inhibir la unión de IGF-I a VN, dependiendo de a) que estén presentes las IGFBP y b) éste presente la cantidad de IGFBP.

EJEMPLO 5

Unión de IGF-I marcado a VN en la presencia las variantes IGFBP-3

Los ensayos de unión que examinan la capacidad de [¹²⁵I]-IGF-I para unirse a platos recubiertos con VN en la presencia de una variante de IGFBP-3 en la que se muta el "dominio de unión a heparina" putativo (IGFBP-3 HBD) y una variante en la que se han mutado los sitios de glicosilación (Non-gly IGFBP-3) se desarrolla como se describió anteriormente. Los datos se muestran en la FIGURA 7.

El mutante de glicosilación IGFBP-3 utilizado en estos estudios de unión tiene tres posibles sitios de O-glicosilación en las posiciones Asn89, Asn109, Asn172 mutadas a Ala

El mutante IGFBP-3 HBD no potencia la unión de [¹²⁵I]-IGF-I a platos recubiertos con VN, lo que sugiere que el dominio de unión a heparina de IGFBP-3 está implicado en la unión de IGFBP-3 a VN. Otros estudios han identificado que los residuos de aminoácidos fuera del "dominio de unión a heparina" putativo son responsables de IGF-I de unión a IGFBP-3, por lo tanto es más probable que los resultados representen la unión reducida de IGFBP-3 a VN, en lugar de unión reducida de IGF-I marcado a IGFBP-3 (Imai et al., 2000, J. Biol. Chem. 275:18188-18194).

Curiosamente, el mutante IGFBP-3 no glicosilado mejora significativamente la unión de [¹²⁵I]-IGF-I para unirse a los platos recubiertos con VN. El notable incremento de 20 veces en la unión de IGF-I marcado a pozos recubiertos con VN en presencia de 2 ng del mutante IGFBP-3 es intrigante, y sugiere que la glicosilación de IGFBP-3 inhibe la interacción de a) IGF-I a IGFBP-3 o b) IGFBP-3 con VN. Alternativamente, ambas interacciones se pueden obstaculizar por la presencia de carbohidratos. Si la IGFBP-3 no glicosilada es funcionalmente relevante in vivo queda por establecer. Sin embargo, este hallazgo sugiere que la IGFBP-3 no glicosilada unida a VN puede ser una forma útil para suministrar IGF-I a sitios donde se requiere IGF-I para potenciar la función celular, tal como en estimular la proliferación celular. Alternativamente, la IGFBP-3 no glicosilada unida a VN puede proporcionar un mecanismo para secuestrar el exceso de IGF-I en situaciones donde que no se requiere la proliferación celular, tales como en los tumores que sobreexpresan IGFs.

EJEMPLO 6

Ensayo de unión de competencia que evalúa la capacidad de las variantes de IGF para competir con IGF marcados para unión a VN en presencia de no IGFBP-3 glicosilada recombinante

La concentración de IGFBP3 que produce la mayor unión de IGF radiomarcado representado en la Figura 5 se utiliza en un ensayo de competencia para determinar si las concentraciones incrementadas de IGF y desIGFs pueden competir con IGF radiomarcados para unión a vitronectina en presencia de IGFBP3. Los resultados indican que el IGF-I, IGF-II, des (1-6) IGF-II y quizás también des(1-3)IGF-I (no mostrado), en alta concentración, pueden competir con la unión de [¹²⁵I]-IGF-II a vitronectina en presencia de 10 ng de IGFBP3 (FIGURA 8). Estos resultados experimentales indican que sólo IGF-I,-II y des (1-6) IGF-II pueden competir con IGF-II para unión a pozos recubiertos con vitronectina en presencia de 30 ng de IGFBP3.

EJEMPLO 7

Estimulación de proliferación celular mediante complejos de proteína aislados que comprenden IGF-II y vitronectina

La estrategia de pre-unión de IGF-II a VN se utiliza en este estudio en un intento para reflejar con más precisión el ambiente extracelular in vivo. La mayoría de los métodos de cultivo celular agregan sustratos exógenos en fase de solución; por consiguiente, las células se exponen constantemente a los tratamientos. Las células en los tejidos no encuentran este ambiente "de fase de solución, constante" in vivo. Por lo tanto el método adoptado para este estudio es pre-unit IGFs a VN, una situación que refleja con mayor precisión las condiciones in vivo.

Después de la pre-unión de IGF a VN en placas de cultivo, las células se siembran en pozos y se examina la capacidad de los IGFs complejo con VN para estimular la síntesis de proteínas mediante métodos establecidos (Francis et al, 1986, Biochem J. 233: 207-213). La síntesis incrementada de proteína se correlaciona con los aumentos en el número de células, por lo tanto, es un reflejo de la proliferación celular. Las respuestas, expresadas como porcentaje por encima de los pozos de control en el que no están presentes la VN o IGF, miden la incorporación de [³H]-leucina en la proteína recién sintetizada durante 48 horas.

Haciendo referencia a los datos en la FIGURA. 9, cuando 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 ng de IGF-II se pre-unen a los pozos en ausencia de VN, se observan respuestas resultantes de 8, 12, 10, 16, 24 y 43% por encima de los pozos de control (-VN, IGF-), respectivamente. Adicionalmente, estas mismas dosis de IGF-II pre-unidas a los pozos recubiertos con VN estimulan la incorporación de [³H]-leucina en la proteína con efectos de 19, 29, 39, 51, 70 y 101% respectivamente. La combinación de las respuestas obtenidas con VN solo (12%) con aquella obtenida para IGF-II solo (mencionado anteriormente) da lugar a efectos aditivos predichos de 20, 24, 22, 28, 36, y 55% para 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 ng de IGF-II, respectivamente. Estos valores son significativamente diferentes ($p < 0,05$) a los efectos reales observados cuando IGF-II se pre-une al VN en todas las dosis excepto para las dos cantidades más bajas de IGF-II probado (3 y 10. ng). Así el IGF-II pre-unido al VN estimula los efectos sinérgicos en la síntesis de proteínas que varían desde 5 a 46% más que los efectos aditivos calculados. Estas respuestas también pueden ser el resultado de la unión directa de IGF-II a VN, y también pueden surgir de unión indirecta de IGF-II a través de VN IGFBPs. Los queratinocitos HaCaT producen grandes cantidades de IGFBP-3 (Wraight et al., 1994, J. Invest. Dermatol 103:627-631).

EJEMPLO 8

Unión de IGF-II marcado a VN en la presencia de IGFBP recombinantes producidas en células de mamífero

Los ensayos de unión que examinan la capacidad de [¹²⁵I]-IGF-II se unen a platos recubiertos con VN en la presencia de IGFBP, se agrega al mismo tiempo que el radiomarcador, se realiza como se describe en Upton et al., 1999, supra. Las IGFBP utilizadas en estos estudios son glicosiladas que se han producido en células de mamífero. Como se muestra en la FIGURA. 10, cantidades incrementadas de IGFBP-1, -3 y -6 resultan en la disminución de unión de IGF-II marcado a pozos recubiertos con vitronectina en una forma dependiente de dosis. La IGFBP-2 también parece competir por la unión de IGF-II marcado a VN, aunque menos eficazmente que la IGFBP-1, -3 o -6. IGFBP-4 por otra parte tiene poco efecto sobre la unión de IGF-II a VN, mientras que IGFBP-5 parece mejorar la unión de IGFII en un menor grado. El efecto inhibitorio de IGFBP-3 puede resultar de IGFBP-3 que compite por la unión de IGF-II a la misma región de unión en VN. Alternativamente, o además, el efecto inhibitorio de IGFBP-3, así como IGFBP-1 y -6. puede surgir de la afinidad de IGF-II para VN siendo menos que la afinidad de IGF-II para estas IGFBP, por lo tanto, estas IGFBP secuestran el IGF-II y el complejo no se une a VN.

EJEMPLO 9

Estimulación de la proliferación celular mediante complejos de proteína aislados que comprenden IGF-I, IGFBP-5 y vitronectina

Con referencia a la Tabla 2, el IGF-I con IGFBP-5 y vitronectina estimula la proliferación de queratinocitos (según se mide por incorporación de ³H-leucina proteínas sintetizadas nuevamente) en todas las concentraciones probadas con efectos sinérgicos observados en la más alta cantidad probada.

Se ha propuesto por los presentes inventores que el efecto de los complejos de proteínas aislados sobre la proliferación celular pueden ser incluso mayores a mayores concentraciones de IGFBP-5 que la cantidad relativamente baja descrita en la Tabla 2.

EJEMPLO 10

Variantes IGFP e IGFBP diseñadas por ingeniería

Los residuos de aminoácidos en la IGFBP-3 que son importantes para la asociación con el ECM y se han definido como el "dominio de unión a heparina" putativo son residuos KGRKR en las posiciones 228-232. Residuos similares se encuentran en la región correspondiente de IGFBP-5. El mutante IGFBP-3 HBD que se utiliza en los estudios de unión registrados aquí tienen los residuos KGRKR alterado para MDGEA con base en los aminoácidos encontrados en las posiciones correspondientes en la IGFBP-1. Estos cambios resultan en una inversión de carga en esta parte de la proteína. Este mutante se une todavía a IGF-I e IGF-II con alta afinidad, pero se une pobremente a la subunidad de ácido lábil y la superficie celular (Firth et al., 1998, J. Biol. Chem. 273 2631-2638).

Motivos de unión a heparina en un diverso rango de proteínas se describieron originalmente en Cardin et al., 1989, Arteriosclerosis 9 21-32.

El dominio C de IGF-II humano contiene un número de residuos de aminoácidos cargados positivamente y en particular las posiciones 34-40 contienen los aminoácidos RVSRRSR. Dado que los aminoácidos cargados positivamente son importantes en mediar la unión de IGFBP a las superficies celulares y a VN, estos aminoácidos en

IGF-II pueden ser importantes en la unión de IGF-II directamente a VN. Independientemente, sería un procedimiento relativamente simple para introducir similar un "motivo de unión a heparina" a aquel encontrado en IGFBP-3 (BXBBB; donde B es un aminoácido básico) al crear un mutante de IGF-II con supresiones de cualquiera V35 o S36 junto con S39. La importancia de los residuos positivos en la mediación de unión de IGF-II a VN se ilustra adicionalmente por la evidencia de los presentes inventores de unión reducida del mutante IGF-II de pollo, (desR40)-IGF-II, a VN.

El dominio C de IGF-I por otro lado contiene una extensión relativamente no cargada de aminoácidos en la región correspondiente de la proteína que se describió anteriormente para el IGF-II. Esto puede explicar porque el IGF-I no se une directamente a VN. Además, la insulina, que tampoco se une a VN (o a IGFBP) no tiene un dominio C correspondiente, ya que se divide en la proteína madura.

IGF-I Humano	SSSRRAPQT
IGF-II Humano	RVSRRS- -R

La introducción de la secuencia RVSRRSR IGF-II o la secuencia KGRKR IGFBP3 en IGF-I puede permitir IGF Humano SSSRRAPQT IGF-I humano IQF-II RVSRRS-R I unirse a VN directamente.

EJEMPLO 11

Complejos de proteínas aisladas, proliferación y supervivencia celular

La transcripción Bcl-2, un elemento crítico de la ruta de supervivencia celular, se eleva en las células que se adhieren a VN a través de alfaV -beta3 integrinas. (Matter & Ruoslahti, 2001, J. Biol. Chem. 276 27.757 -27.763). Además, el IGF-I protege las células de la apoptosis al elevar la transcripción bcl-2 en una forma dependiente de AKT (Pugazhenthil et al., 1999, J Biol. Chem. 274 27529-35). El receptor de IGF se asocia físicamente asociados con la alfaV-beta3 integrina con un efecto sinérgico sobre el crecimiento celular (Schneller et al., 1997, EMBO J 16 5600-5607). Así, los complejos de proteínas aisladas de la invención pueden proporcionar un punto extracelular de integración para iniciar las señales de supervivencia celular mediadas por la integrina y el receptor del factor de crecimiento. Se ha demostrado que la IGFBP-5 potencia los efectos anti-apoptóticos y mitogénicos del IGF-I en células de cáncer de próstata (Miyake et al., 2000, Endocrinol. 141 2257-2265). Además, la síntesis de VN in vivo por células de glioma y en adenocarcinoma colorrectal se correlaciona con el grado del tumor (Uhm et al, 1999, Clin Cancer Res. 5 1587-1594; Tomasini-Johansson et al, 1994, Exp Cell Res. 214 303-312; Gladson et al, 1995, J. Cell Sci. 108 947-56; Gladson & Cheresch, 1991, J. Clin Invest 88 1924/32).

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se propone que los complejos IGF: IGFBP: VN formados in vivo pueden promover la supervivencia y progresión de células neoplásicas. La invención por lo tanto contempla agentes terapéuticos que alteran la formación de complejos in vivo.

Se ha descrito que el dominio de unión a heparina de VN inhibe el montaje de matriz de fibronectina (Hocking et al., 1999, J. Biol. Chem. 274 27257 a 27264). La precipitación de fibronectina reducida se asocia con la invasión de células neoplásicas ya que los índices de migración de células reducidos se asocian con mayores niveles de fibronectina polimerizada (Morla et al., 1994, Nature 367 193-196). Por lo tanto, los complejos de IGF: IGFBP unidos al dominio de unión a heparina de VN, pueden empapar el ensamble de matriz de fibronectina y facilitar la invasión tumoral del tejido conjuntivo local. Por lo tanto, la invención contempla agentes terapéuticos que interrumpen estos en complejos in vivo para reducir la invasividad tumoral.

Complejos aislados de proteínas y cicatrización de heridas

Se puede utilizar argumento inverso para apoyar el uso del complejo en situaciones donde se requiere la migración de células tal como en la reparación de heridas. El sistema de IGF cumple una función importante en la cicatrización de heridas y ambos IGF-I e IGFBP-3 están presentes en el fluido de heridas en concentraciones significativas. (Skottner et al, 1990, Acta Scand Suppl 367 63-66;... Clark R (ed) 1996, Molecular and Cell Biology of Wound Repair, pp 3-50, Plenum Press, New York; Robertson et al., 1996, Endocrinol. 137 2774-2784; Vogt et al., 1998, Growth Horm. IGF Res. 8 Suppl B:107-9.

Se ha demostrado que las IGFBP reducen el índice de depuración de IGF de heridas. (Robertson et al., 1999, Am J Physiol. 276 E663-71).

Los complejos IGFBP-3: IGF-I se unen a coágulos de fibrina in vitro que llevan a la sugerencia de que esto también ocurre in vivo, lo que resulta en la concentración de IGF-I en sitios de herida. (Campbell et al., 1999, J. Biol. Chem. 274 30215 a 30221). De forma similar, la vitronectina se une a la fibrina (Podor et al., 2000, J. Biol. Chem. 275 19,788 a 19,794). También se observa que los ratones vironectinulos exhiben fibrinólisis de herida incrementada y angiogenia microvascular reducida (Jang et al., 2000, Surgery 127 696-704).

De acuerdo con la presente invención, se propone que los IGF unidos a IGFBP puedan unirse a VN, que a su vez se asocia con el coágulo de fibrina, proporcionando así un reservorio de IGFs en el sitio de herida. Así, los complejos

de proteínas aislados de la invención se pueden administrar a las heridas para acelerar el proceso de reparación. Un aspecto particular de cicatrización contemplado por la presente invención se relaciona compuesto la curación de úlceras de pie diabético. La cicatrización de heridas se retrasa en la diabetes. Los factores de crecimiento influyen el proceso de curación y, en particular, los IGF han mostrado estimular la proliferación de queratinocitos. Sin embargo, el análisis de los tejidos de la piel y las úlceras del pie diabético revela la carencia de expresión de IGF-I dentro de la capa basal y fibroblastos en comparación con secciones de tejido de los pacientes no diabéticos. (Blakytyn et al., 2000, J. Pathol. 190 589-594). Los complejos aislados de proteínas de la invención podrían ser útiles en el suministro de IGF-I a estos tipos de heridas.

Complejos aislados de proteínas y hueso diseñados por ingeniería

10 El IGFBP-5 facilita la unión de IGF-I marcado con el hueso mediante un mecanismo que es independiente de los receptores de IGF. (Mohan et al., 1995, J. Biol. Chem. 270 20424 a 20431) y mejora la función osteoblástica estimulada por IGF. (Andress, 1995, J. Biol. Chem. 270 28289 a 28296).

15 Se ha mostrado en numerosos estudios que el material de implante de hidroxilapatita es altamente biocompatible y se osteointegra bien con el hueso existente. La evidencia reciente ha encontrado que la hidroxilapatita absorbe más VN a partir de suero de otros materiales de implante utilizados comúnmente tales como titanio y acero inoxidable. La absorción de VN es acompañado por una mayor unión de las células precursoras de los osteoblastos (Kilpadi et al., 2001, J. Biomed. Mater. Res. 57 258-267).

20 Se ha encontrado que el efecto de VN sobre alúmina nanofasa vs alúmina convencional examinado recientemente con VN mejora la adhesión de osteoblastos (Webster et al., 2001. Tissue Eng 7 291-301). Los presentes inventores proponen que los complejos de proteínas aislados de la invención pueden ser útiles como revestimientos aplicados a estos materiales y por lo tanto acelerar la fijación ósea celular, el crecimiento y la integración en aplicaciones ortopédicas tales como reemplazos de cadera.

25 El VN mejora la resorción osteoclástica estimulada por IGF-I y las actividades de proteinasa en el cultivo de células óseas de conejo. (Rousselle et al., 2001, Histology & Histopathology 16 727-734) y la IGFBP-5 mejora la mitogenia osteoblástica estimulada por IGF. (Andress & Birnbaum, 1992, J. Biol. Chem. 267 22467 - 22472).

Los presentes inventores proponen que como la IGFBP principal producida por las células óseas es la IGFBP-5, la potenciación del efecto IOF por VN es probable que también implique IGFBP-5.

30 A lo largo de la especificación, el objetivo ha sido describir las realizaciones preferidas de la invención sin limitar la invención a ninguna realización, o colección específica de características. Por lo tanto, se apreciará por los expertos en la técnica que, a la luz de la presente descripción, se pueden hacer diversas modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ejemplificadas sin apartarse del alcance de la presente invención.

Tabla 1

Ácido nucleico	Referencia
IGF-1	Ordin et al., 1983, Nature 306 609
IGF-II	Ordin et al., 1985, FEBS Lett 179 243
IGFBP-1	Brinkman et al., 1988, EMBO J. 7 2417
IGFBP-2	Binkert et al., 1989, EMBO J. 8 2497
IGFBP-3	Ord et al., 1988, Mol. Endocrinol. 2 1176
IGFBP-4	LaTour et al., 1990, Mol. Endocrinol. 4 1806
IGFBP-5	Kiefer et al., 1991, Biochem. Biophys. Res. Comm. 176 219
IGFBP-6	Shimasaki et al., 1991, Mol. Endocrinol. 5 938
ALS	Leong et al., 1992, Mol. Endocrinol. 6 870
Vitronectina	Suzuki et al., 1985, EMBO J. 4 2519

Tabla 2

Tratamiento	- Vitronectina	+ Vitronectina
Control	100 ± 2.6	-
IGFBP-5	-	109.5_9.2
100 ng IGF-1 + IGFBP-5	117.4 ± 10.2	119.4 ± 1.9
300 ng IGF-1 + IGFBP-5	140.9 ± 2.0	154.3 ± 1.8
1000 ng IGF-1 + IGFBP-5	144.3 ± 11.0	161.4 ± 9.1

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de proteína aislado que comprende:
factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) ; una proteína de unión a factor de crecimiento seleccionada del grupo que consiste de: IGFBP2; IGFBP3; IGFBP4; y IGFBP5; y vitronectina.
- 5 2. El complejo de proteína aislado de la Reivindicación 1, que se produce en forma Recombinante.
3. El complejo de proteína aislado de la Reivindicación 1 o Reivindicación 2, en donde dicha proteína de unión a factor de crecimiento media la unión de factor de crecimiento I similar a insulina (IGF-I) a vitronectina.
4. El complejo de proteína aislado de la Reivindicación 1, en donde la proteína de unión a factor de crecimiento es IGFBP3 no glicosilada.
- 10 5. El complejo de proteína aislado de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde la IGFBP es IGFBP3 o IGFBP5.
6. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de proteína aislado de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. Un implante quirúrgico que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 6.
- 15 8. Una célula transformada capaz de expresar un complejo de proteína recombinante de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5, o polipéptidos recombinantes capaces de formar dicho complejo.
9. Uso de un IGFBP variante seleccionada del grupo que consiste de: IGFBP3 y IGFBP5, que tiene un dominio de unión a heparina eliminado o mutado (HBD), que evita o interrumpe la formación del complejo de proteína aislado de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.
- 20 10. Un método para estimular proliferación y/o migración celular que incluye la etapa de administrar a células aisladas de un animal, un complejo de proteína aislado de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
11. Uso de un complejo de proteína aislado de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para promover cicatrización de heridas, reparación de la piel, cicatrización de úlcera y quemadura o regeneración de piel in vitro, o para promover regeneración ósea.
- 25 12. Un complejo de proteína aislado de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 para uso en promover cicatrización de heridas, reparación de la piel, cicatrización de úlcera y quemadura o regeneración de piel in vitro, o para promover regeneración ósea.
- 30 13. Un IGFBP3 o IGFBP5 variante que tiene un dominio de unión a heparina mutado o eliminado (HBD) que evita o interrumpe la formación del complejo de proteína aislado de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 para uso en tratamiento de cáncer.
14. Uso de acuerdo con la Reivindicación 9 o la IGFBP-3 variante o IGFBP5 que tiene un HBD mutado o eliminado para uso de acuerdo con reivindicación 13, en donde el cáncer es cáncer de mama epitelial.

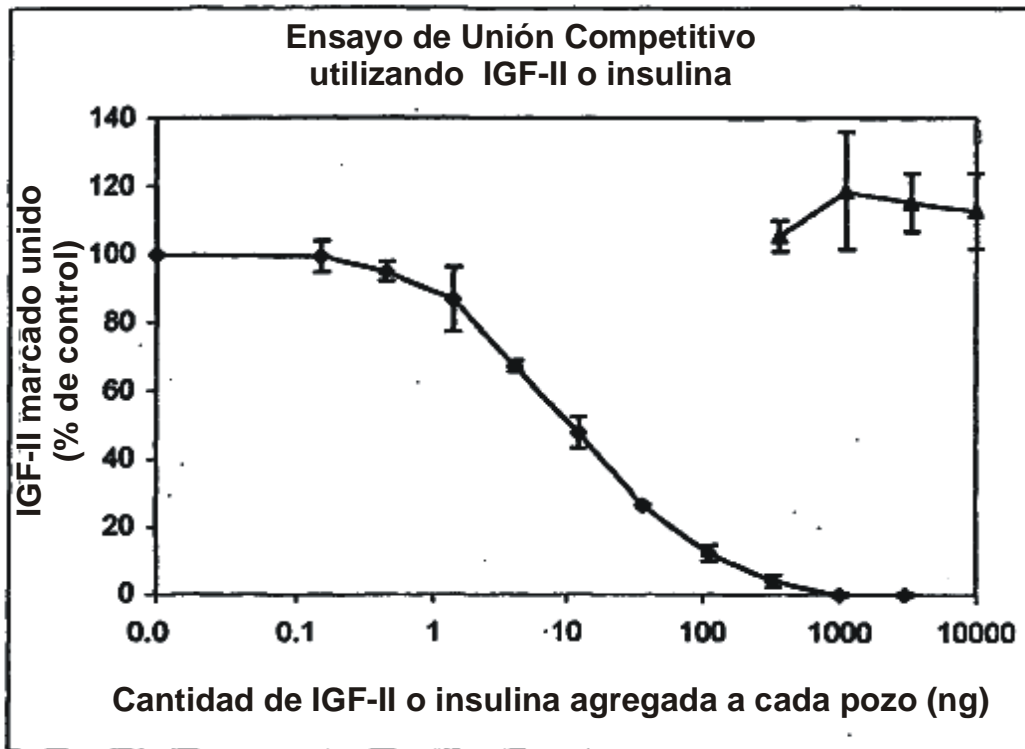


FIG. 1

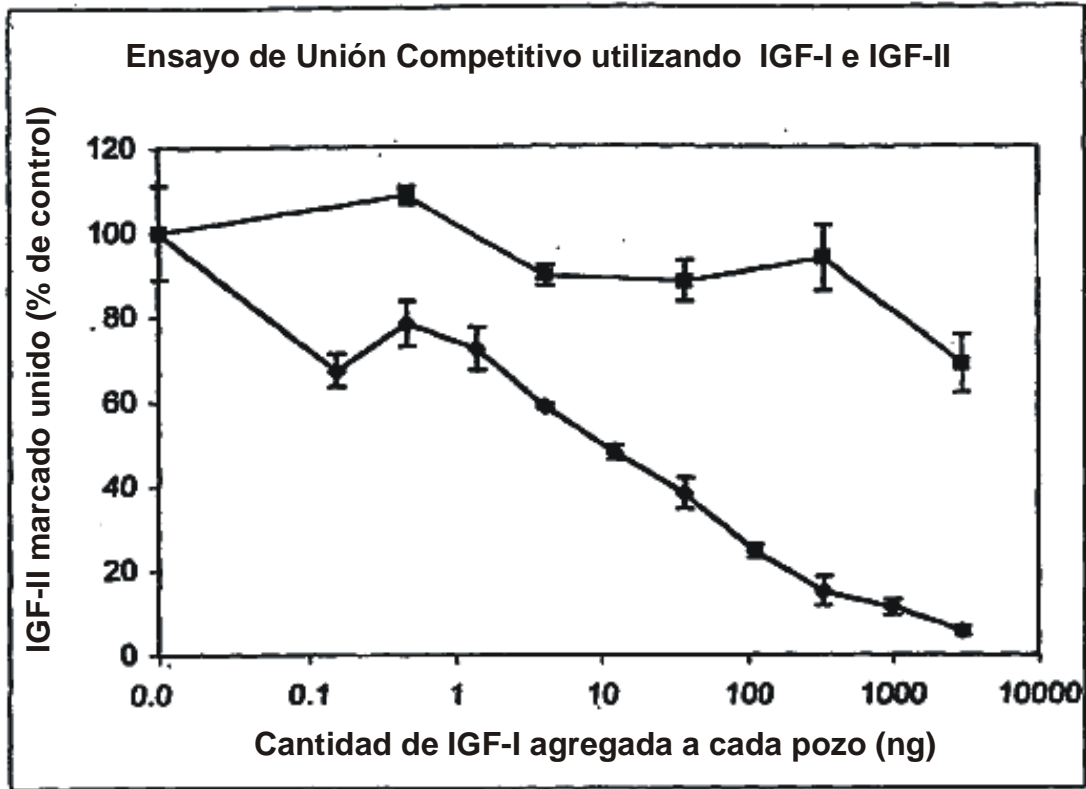


FIG. 2

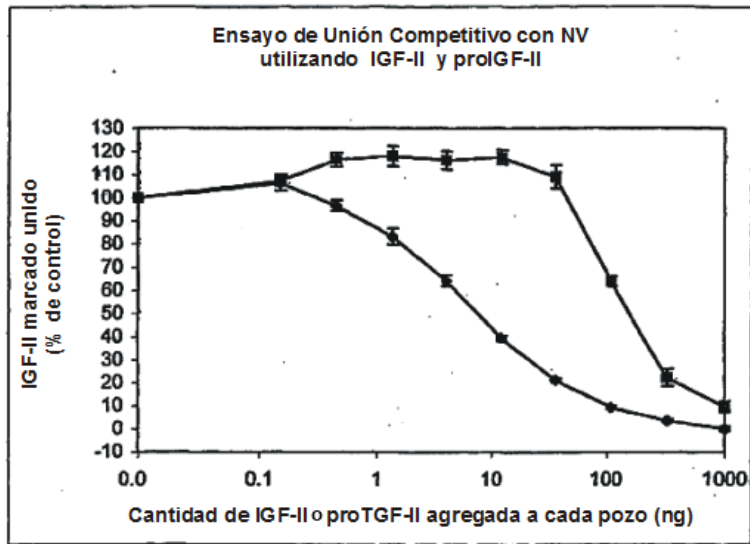


FIG. 3

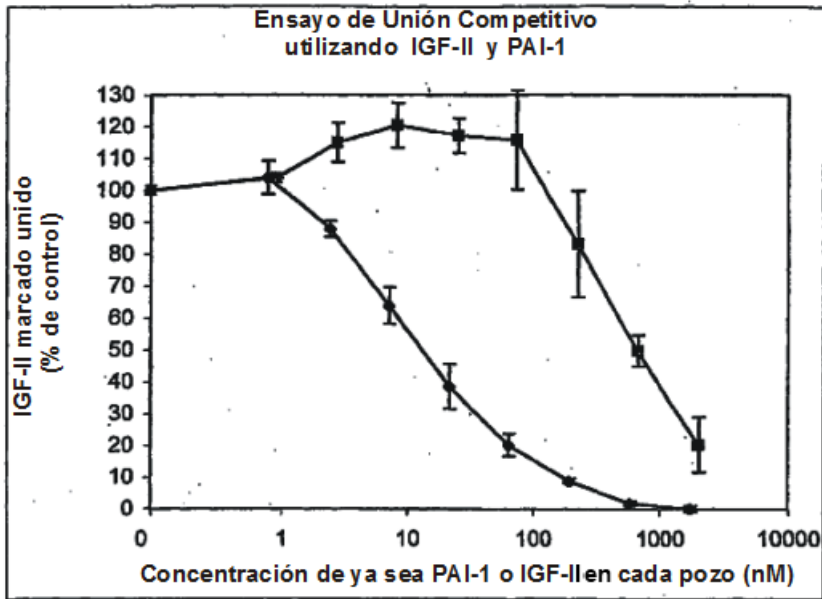
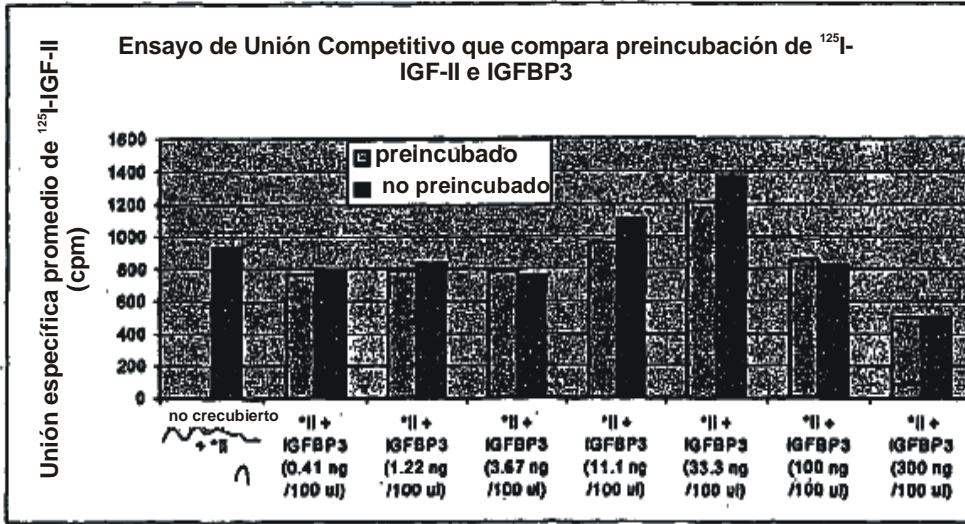


FIG. 4

(a)



(b)

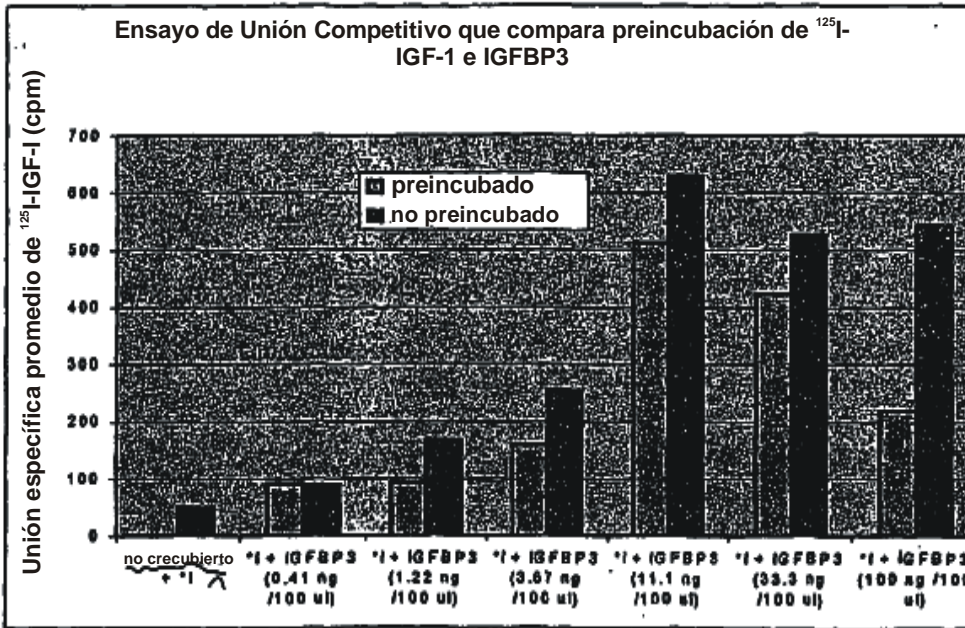
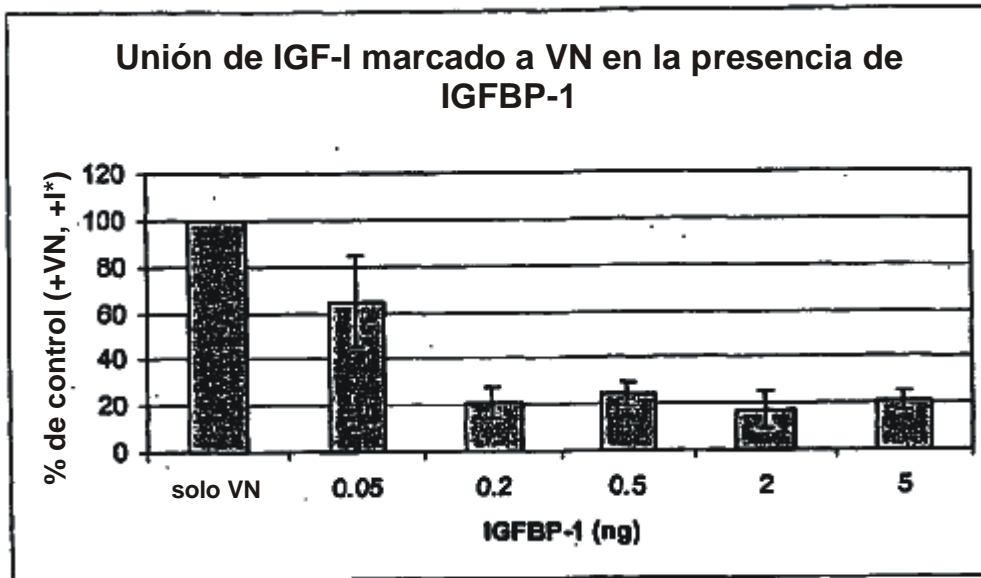


FIG. 5

A



B

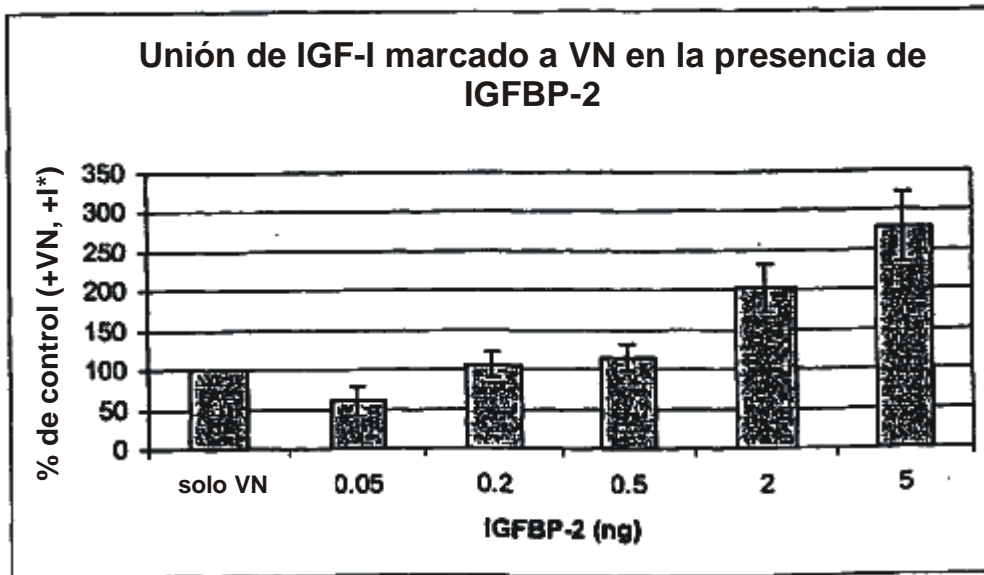
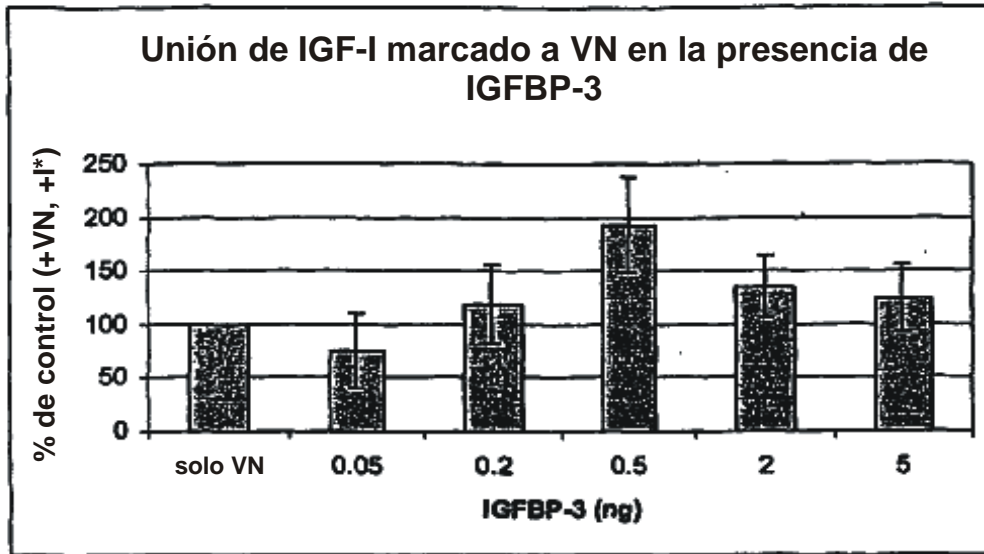


FIG. 6

C



D

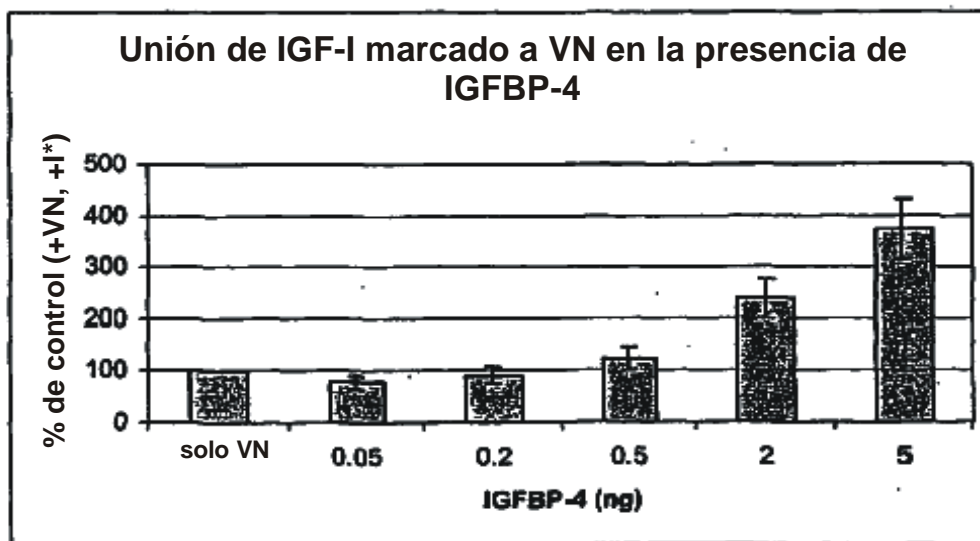
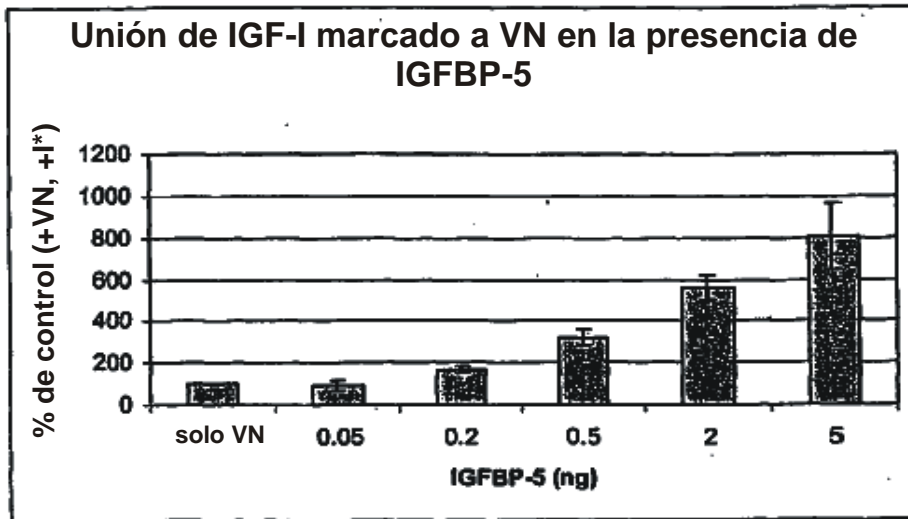


FIG. 6

E



F

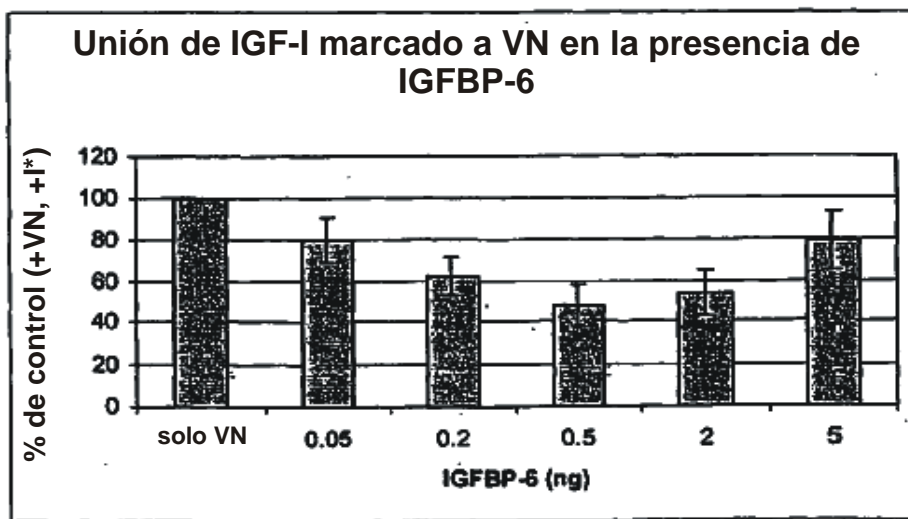


FIG. 6

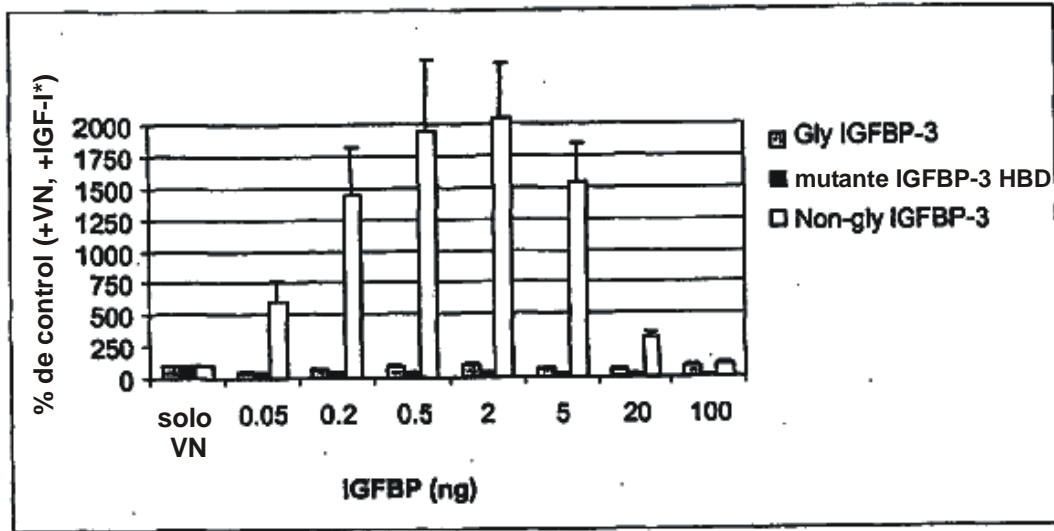
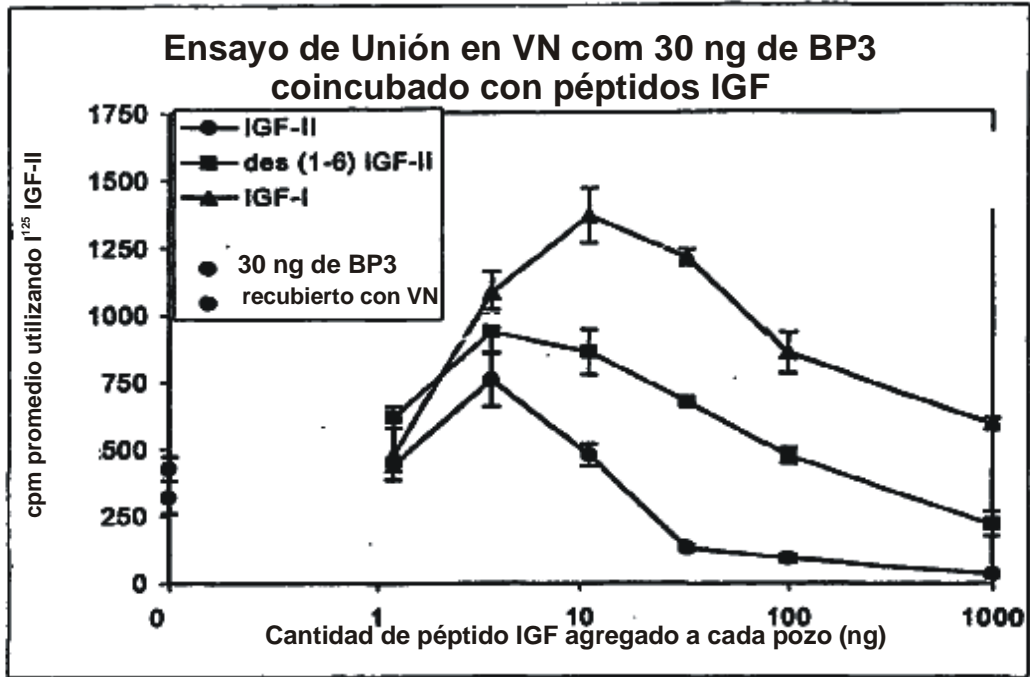


FIG. 7

(a)



(b)

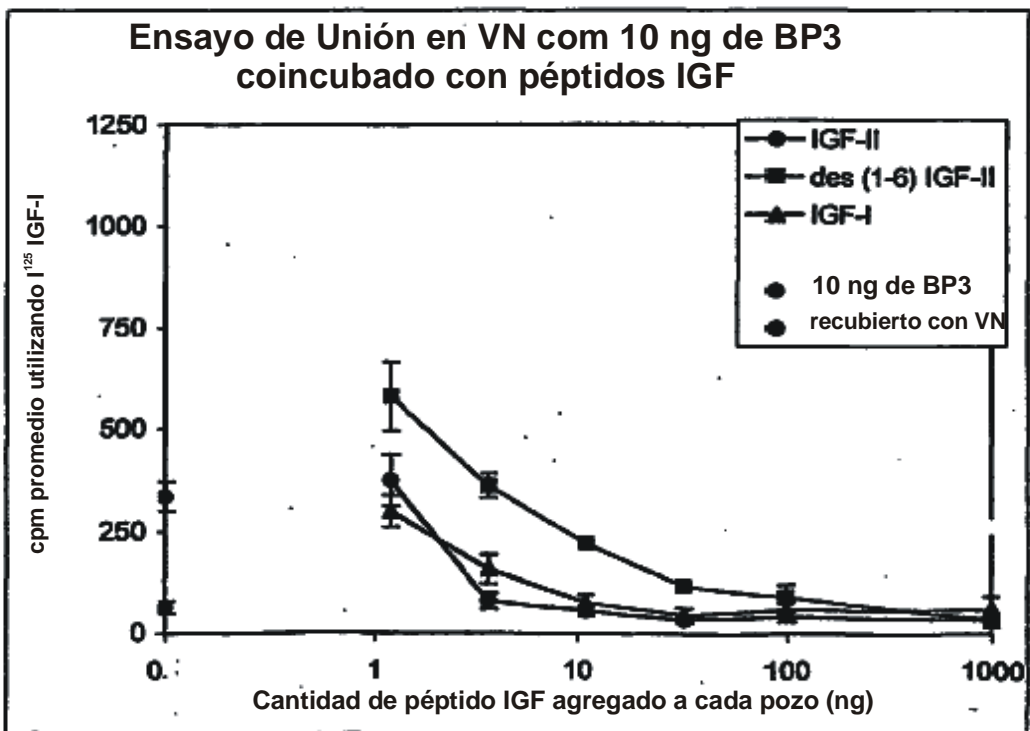


FIG. 8

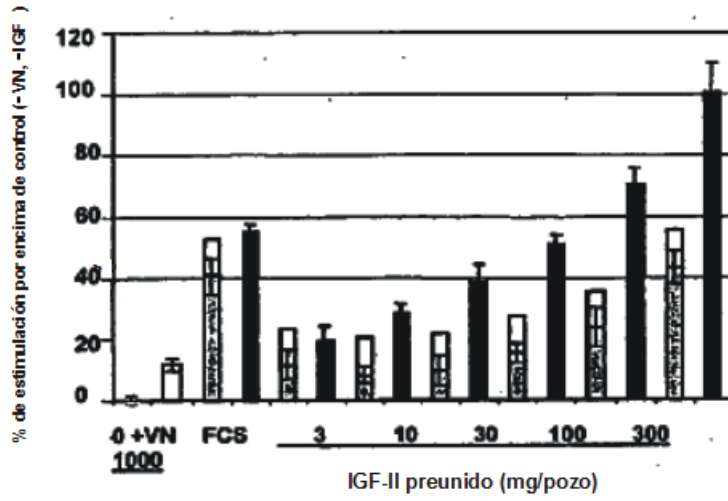
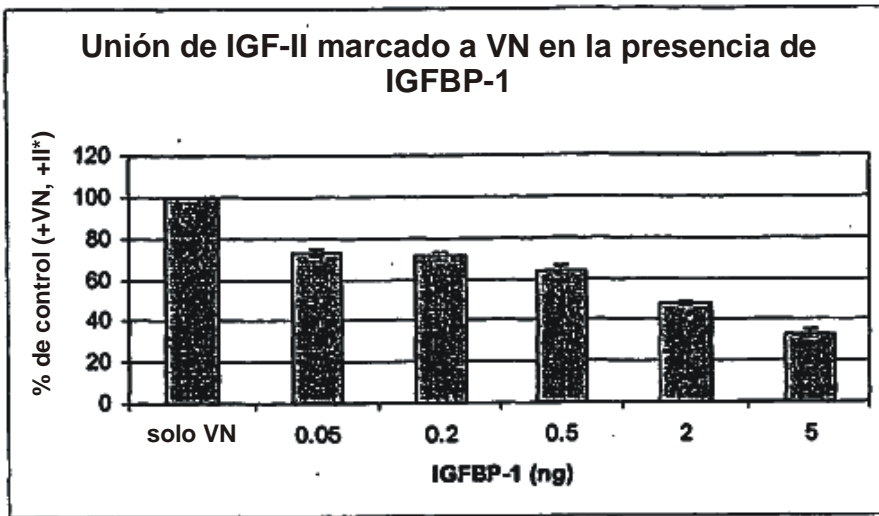


FIG. 9

A



B

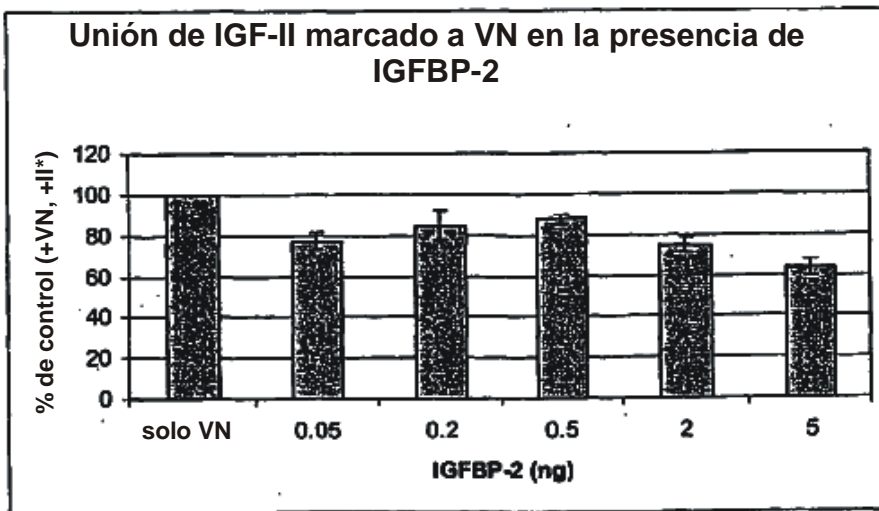
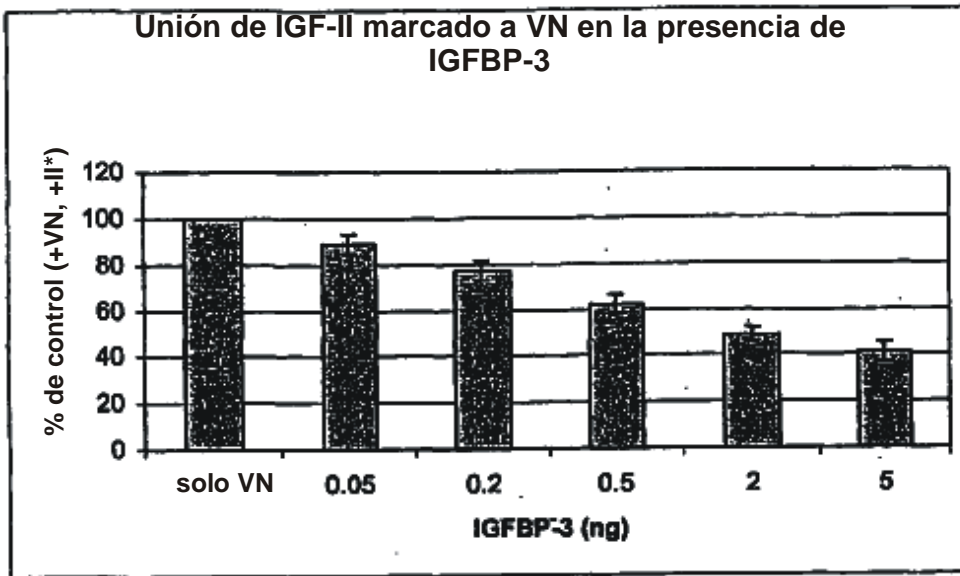


FIG. 10

C



D

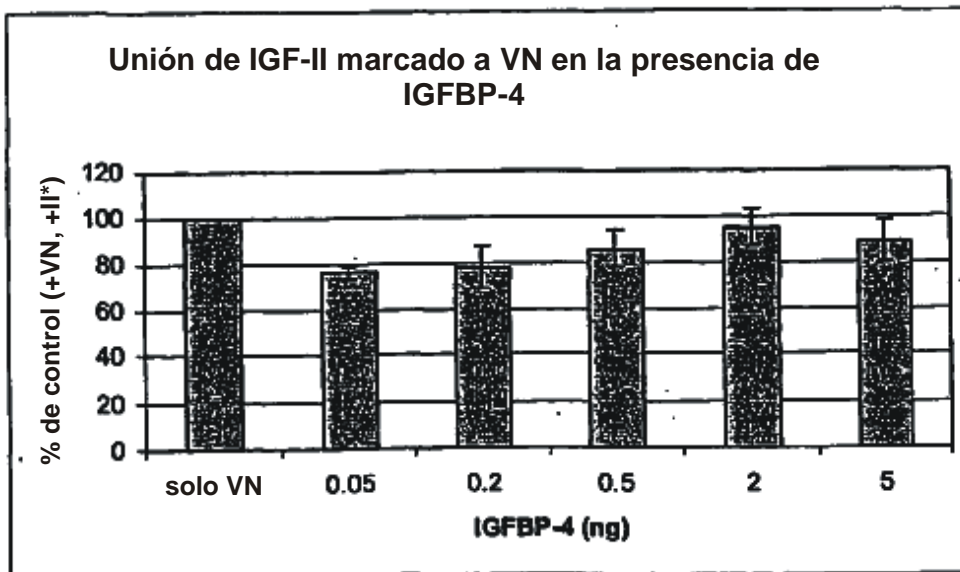
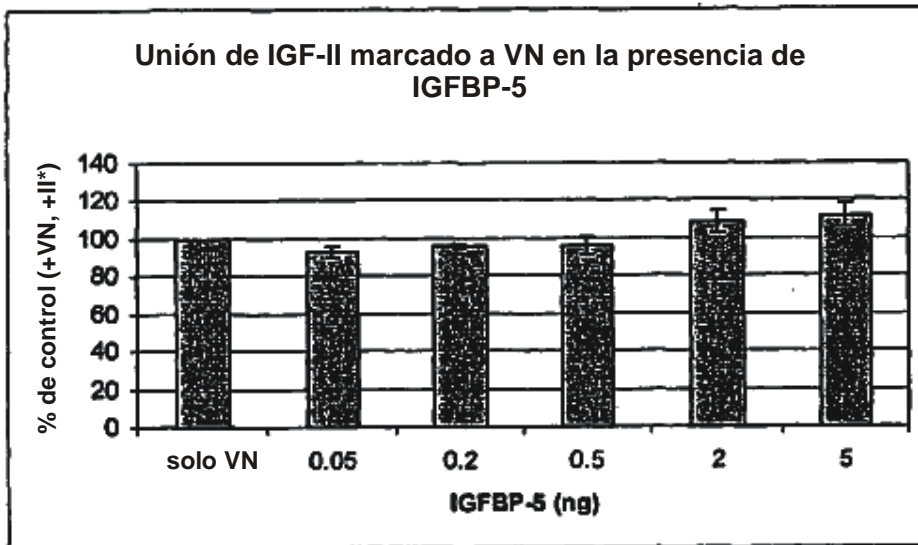


FIG. 10

E



F

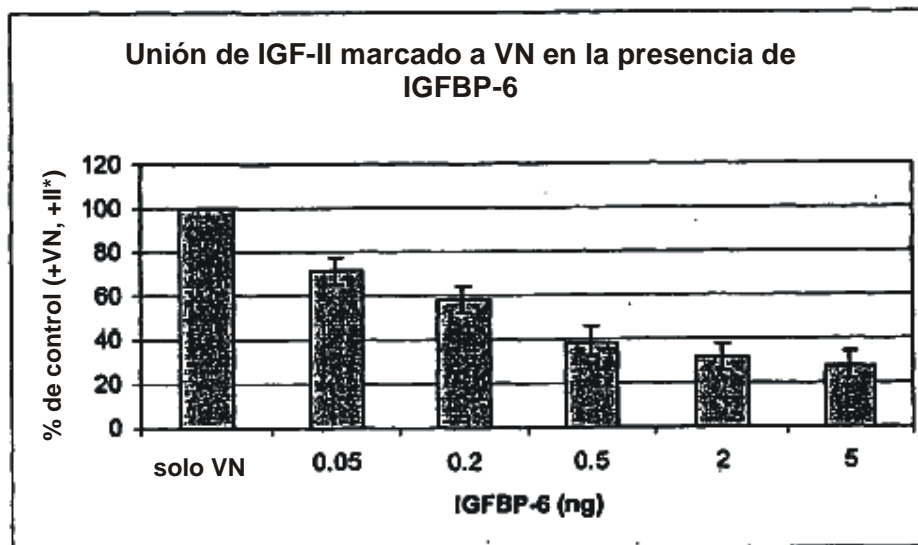


FIG. 10