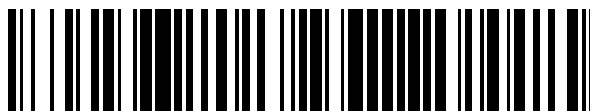


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 517**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2007 E 07702949 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 1973944**

54 Título: **Péptidos de unión a FGF2 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

24.01.2006 EP 06001457

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

29.06.2016

73 Titular/es:

**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A. (100.0%)
Viale Shakespeare 47
00144 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**PRESTA, MARCO;
CAMOZZI, MAURA;
RUSNATI, MARCO;
COLOMBO, MAURIZIO y
MASTROIANNI, DOMENICO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 517 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

Péptidos de unión a FGF2 y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos de unión a Factor de Crecimiento de Fibroblasto 2 (FGF2), capaces de unirse a FGF2 para inhibir su actividad pro-angiogénica *in vitro* e *in vivo* sin un impacto anticipado en la inmunidad innata.

Antecedentes de la invención

10 Las pentraxinas son una superfamilia de proteínas que se caracterizan por una estructura pentamérica¹. Las clásicas pentraxinas cortas proteína C-reactiva (CRP) y componente P amiloide de suero (SAP) son proteínas de fase aguda en el hombre y el ratón, respectivamente, producidas en el hígado en respuesta a mediadores inflamatorios^{2,3}. Las pentraxinas se unen a diversos ligandos y están implicadas en la resistencia innata a microbios y la recuperación de residuos celulares y componentes de la matriz extracelular^{1,4-6}.

15 Las pentraxinas largas se caracterizan por un dominio N-terminal no relacionado acoplado a un dominio 7 C-terminal de tipo pentraxina. La pentraxina larga prototípica PTX3^{8,9} es una proteína glicosilada de 45 kD estructurada predominantemente en multímeros de 10-20 unidades¹⁰. La PTX3 se produce localmente y es liberada por diferentes tipos de células, en particular por fagocitos mononucleares, células dendríticas y células endoteliales, en respuesta a señales inflamatorias primarias¹¹. Estudios en ratones *ptx3*⁻¹ han demostrado que esta molécula desempeña funciones no redundantes complejas *in vivo*, que van desde la constitución de una matriz extracelular rica en ácido hialurónico, hasta la fertilidad femenina y la inmunidad innata contra diversos microorganismos^{12,13}. Esto está relacionado, al menos en parte, con la capacidad de la PTX3 para unirse con una elevada afinidad al componente de complemento C1q, la proteína de matriz extracelular TSG6 y el microorganismo seleccionado, activando la activación de complemento y facilitando el reconocimiento de patógeno por parte de los macrófagos y de las células dendríticas^{1,14}. Por tanto, la PTX3 es un receptor de reconocimiento de patrón soluble con funciones no redundantes únicas en varias afecciones patofisiológicas^{1,14}.

25 El factor de crecimiento de fibroblasto 2 (FGF2) es un factor de crecimiento de unión a heparina que induce la proliferación celular, la quimiotaxis y la producción de proteasa en células endoteliales cultivadas mediante la interacción con receptores de tirosina-quinasa de alta afinidad (FGFRs)¹⁵. El FGF2 induce angiogénesis *in vivo* y modula la neovascularización durante la curación de heridas, la inflamación, la aterosclerosis y el crecimiento tumoral¹⁶. Varias moléculas secuestran FGF2 en el entorno extracelular, evitando de este modo su interacción con FGFRs de célula endotelial e inhibiendo su actividad angiogénica (revisado en¹⁶). Muchos de estos inhibidores se producen/liberan local y/o sistémicamente, soportando así el complejo ajuste del proceso de angiogénesis.

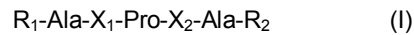
30 La PTX3 larga se une a FGF2 con una elevada afinidad y especificidad. Por consiguiente, la PTX3 larga inhibe la proliferación de células endoteliales dependientes de FGF2 *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*¹⁷. Asimismo, la PTX3 entera inhibe la activación de células de músculo liso dependientes de FGF2 y el espesamiento íntimo tras lesión arterial¹⁸. Por tanto, la PTX3 puede contribuir potencialmente a la modulación de la actividad de FGF2 en diferentes situaciones patológicas caracterizadas por la co-expresión de las dos proteínas, que incluyen inflamación, curación de heridas, aterosclerosis y neoplasia. Sin embargo, no se describe ningún uso terapéutico de la proteína dada la imposibilidad de utilizar dicha molécula grande y a otras actividades de la proteína. De hecho, la PTX3 se une a C1q a través del dominio de pentraxina C-terminal¹⁰.

40 Actualmente, no se han asignado funciones biológicas al extremo N de la PTX3. En base a esto, los autores han investigado la capacidad del extremo N para interactuar con FGF2.

Descripción de la invención

45 Se ha descubierto que células endoteliales retrovirales transducidas que sobre-expresan el fragmento N-terminal de la PTX3 (1-178) muestran una actividad mitogénica reducida en respuesta a FGF2. La PTX3(1-178) purificada recombinante se une a FGF2 y evita la interacción PTX3/FGF2. Asimismo, el anticuerpo monoclonal mAb-MNB4, que reconoce el epítipo PTX3(87-99), evita la interacción FGF2/PTX3 y elimina la actividad de antagonista de FGF2 de la PTX3. Sorprendentemente, los autores han descubierto que los péptidos muy cortos retienen dicha actividad y son útiles como fármacos terapéuticos. Consistentemente, los péptidos sintéticos PTX3(82-110), PTX3(97-110), PTX3(97-107) y PTX3 (100-104) se unen a FGF2 e inhiben la interacción de FGF2 con PTX3 larga entera inmovilizada en un chip sensor BIAcore, la proliferación de células endoteliales dependientes de FGF2 y la angiogénesis *in vivo*. Por tanto, los datos permiten identificar un dominio de unión a FGF2 muy corto en la extensión N-terminal de la PTX3 que se extiende en la región PTX3(97-110). Los péptidos sintéticos relacionados con esta secuencia son capaces de unirse a FGF2 y de inhibir su actividad pro-angiogénica *in vitro* e *in vivo* sin ningún impacto anticipado en la inmunidad innata.

55 El principal objetivo de la presente invención es, por tanto, un péptido de unión a FGF2 de fórmula I:



donde:

X₁ es un aminoácido seleccionado entre Arg y Lys;

X₂ es un aminoácido seleccionado entre Cys y Thr;

5 R₁ está ausente o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3;

R₂ está ausente o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4, con las siguientes condiciones:

10 cuando R₁ está presente, también R₂ está ausente; cuando R₁ es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, R₂ es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; cuando R₁ es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, R₂ es una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Preferiblemente, X₁ es Arg. Más preferiblemente X₂ es Cys. Incluso más preferiblemente, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 10.

15 El término "péptido" se aplica ordinariamente a una cadena polipeptídica que contiene entre 4 y 100 ó más aminoácidos contiguos, normalmente entre 5 y 20 aminoácidos contiguos. El término "funcional" define un péptido que presenta propiedades de unión a FGF2 capaces de reducir enormemente la actividad biológica de FGF2. La actividad biológica de FGF2 incluye efectos mitogénicos y angiogénicos. En particular, los péptidos de la invención son capaces de inhibir la proliferación inducida por FGF2 de células endoteliales o células de músculo liso.

20 Los "precursores" son compuestos que pueden convertirse en los compuestos de la presente invención mediante un procesado metabólico y enzimático antes o después de la administración a las células o al cuerpo.

25 El término "sales" en la presente memoria se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición ácida de los grupos amino de los péptidos, polipéptidos, o análogos de los mismos, de la presente invención. Las sales de un grupo carboxilo pueden formarse mediante los medios conocidos en la técnica e incluyen las sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, férricas o de zinc, y otras similares, y las sales con bases orgánicas como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición ácida incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Cualquiera de dichas sales debería tener una actividad sustancialmente similar a la de los péptidos y polipéptidos de la invención o sus análogos.

35 El término "derivados" tal como se usa en la presente memoria se refiere a derivados que pueden prepararse a partir de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los restos de aminoácido o en los grupos N-/ ó C-terminales, según métodos conocidos. Dichos derivados incluyen por ejemplo ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y derivados de N-acilo de grupos amino libre o derivados de O-acilo de grupos hidroxilo libres, y están formados con grupos acilo como por ejemplo grupos alcanilo o aroilo. La presente invención también incluye peptidomiméticos de los péptidos ya descritos, en los que la naturaleza de los péptidos ha sido modificada químicamente al nivel de cadenas laterales de aminoácido, quiralidad de aminoácidos, y/o cadena principal de péptidos. Estas alteraciones están dirigidas a proporcionar agentes de unión a FGF2 que tengan propiedades terapéuticas, diagnósticas y/o farmacocinéticas similares (si no mejoradas).

40 Por ejemplo, cuando el péptido es propenso a ruptura mediante peptidasas tras inyección al sujeto, la sustitución de un enlace peptídico particularmente sensible con un mimético de péptido no rompible puede proporcionar un péptido más estable y, por tanto, más funcional como agente terapéutico. De forma similar, la sustitución de un residuo de L-aminoácido es un modo estándar para hacer al péptido menos sensible a la proteólisis, y finalmente más similar a compuestos orgánicos diferentes a los péptidos. También son útiles los grupos bloqueantes amino-terminales tales como t-butiloxicarbonilo, acetilo, succinilo, metoxisuccinilo, suberilo, adipilo, azelailo, dansilo, benciloxicarbonilo, fluorenilmetoxicarbonilo, metoxiazelailo, metoxiadipilo, metoxisuberilo y 2,4,-dinitrofenilo. En la técnica se conocen muchas otras modificaciones que proporcionan una mayor eficacia, una actividad prolongada, facilidad de purificación y/o una mayor vida media.

50 Las propiedades de los péptidos de la invención pueden mantenerse, o incluso potenciarse, en péptidos mutantes. Los péptidos mutantes incluyen secuencias de aminoácidos en donde uno o más residuos de aminoácido han sido sustituidos de forma conservativa, siempre que presenten la misma actividad biológica que caracteriza a la presente invención en niveles equivalentes o superiores, según se determina mediante los medios conocidos en la técnica o descritos en los Ejemplos incluidos a continuación.

De acuerdo con la presente invención, los cambios preferidos en los péptidos mutantes son conocidos comúnmente como sustituciones "conservativas" o "seguras". Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas con aminoácidos que tienen propiedades químicas suficientemente similares, con el objetivo de preservar la estructura y la función biológica de la molécula. La bibliografía proporciona muchos modelos sobre los cuales se puede realizar la selección de sustituciones de aminoácidos conservativas en base a estudios estadísticos y físico-químicos sobre la secuencia y/o la estructura de la proteína natural.

Los péptidos mutantes pueden resultar de una técnica de mutagénesis sito-dirigida convencional del ADN codificador, de tecnologías combinatorias a nivel de secuencia de ADN codificadora (tales como barajado de ADN, presentación/selección de fago) o de aminoácidos, de estudios de diseño asistido por ordenador, o mediante cualquier otra técnica conocida adecuada, que dan lugar a un conjunto finito de péptidos mutados sustancialmente correspondientes que pueden obtenerse de forma rutinaria y ser evaluados por un especialista en la técnica usando las enseñanzas presentadas en la técnica anterior y en los Ejemplos de la presente descripción.

Los péptidos de unión a FGF2 que son péptidos de fusión y/o quiméricos comprenden la secuencia de aminoácidos del péptido de Fórmula (I) o cualquiera de sus mutantes/derivados tal como se han definido anteriormente, y una secuencia de aminoácidos que pertenece a una secuencia proteínica diferente a PTX3, proporcionando propiedades adicionales sin perjudicar considerablemente a la actividad de unión a FGF2. Se pueden elegir otras secuencias proteínicas adicionales que pueden ser comprendidas en proteínas de fusión y/o quiméricas entre secuencias ligadas a membrana, regiones extracelulares de proteínas ligadas a membrana, regiones constantes de inmunoglobulina, dominios de multimerización, proteínas extracelulares, proteínas que contienen péptido señal, proteínas que contienen señal de exportación.

Las propiedades adicionales presentadas por los polipéptidos o péptidos de fusión y/o quiméricos son una capacidad de purificación más sencilla, una mayor vida media en fluidos corporales, o la localización extracelular. Esta última característica es de particular importancia para definir un grupo específico de proteínas de fusión o quiméricas incluido en la anterior definición, ya que permite que los péptidos de la invención sean localizados en el espacio, donde no solo se facilita el aislamiento y la purificación de dichos péptidos, sino también donde PTX3 y FGF2 interactúan de forma natural.

La elección de una o más de las secuencias que va a ser fusionada al péptido de unión a FGF2 depende del uso específico de dicho péptido.

Como procedimiento general, las proteínas de fusión pueden producirse generando segmentos de ácido nucleico que las codifiquen, usando técnicas de ingeniería genética habituales, y clonando en un vector replicable de origen plásmido o vírico que se usa para modificar una célula hospedante Procariótica o Eucariótica, usando vectores episomales o no-/ integrados homológamente, así como tecnologías basadas en transformación, infección o transfección. Estos vectores deberían permitir la expresión de la proteína de fusión que incluye el agente de unión a FGF2 en la célula hospedante procariótica o eucariótica bajo el control de sus propias secuencias reguladoras transcripcionales de inicio/terminación, que se eligen para ser constitutivamente activas o inducibles en dicha célula. A continuación se puede aislar una línea celular para proporcionar una línea celular estable. En particular, siempre que las células modificadas para expresar agentes de unión a FGF2 de la invención son usadas o administradas directamente, las células preferidas son células humanas, que normalmente expresan PTX3. Cuando la secuencia proteínica adicional, como en el caso de la secuencia de proteínas extracelulares, de exportación de señal o que contienen péptido señal, permite que el dominio de unión a FGF2 sea secretado en el espacio extracelular, el agente puede ser recolectado y purificado más fácilmente a partir de las células cultivadas con vistas a un procesamiento adicional o, alternativamente, las células se pueden usar o administrar directamente.

Cuando la proteína adicional, como en el caso de la secuencia de proteínas ligadas a membrana, permite la inmovilización del agente de unión a FGF2 sobre la superficie de la célula, el agente puede recolectarse y purificarse menos fácilmente a partir de las células cultivadas con vistas a un procesamiento adicional, pero las células pueden usarse o administrarse directamente proporcionando el agente una forma correspondiente a la de la PTX3 natural, posiblemente mejorando sus propiedades.

Los péptidos de unión a FGF2 de la invención se pueden identificar también mediante los métodos de diseño de fármacos asistido por ordenador, que hacen uso de la estructura y/o la secuencia de los péptidos de la invención, o los correspondientes mutantes activos tal como se ha definido anteriormente. Los péptidos de la invención pueden usarse para estudiar la interacción entre PTX3 y FGF2 con una mayor eficacia usando tecnologías de modelado por ordenador. Dicho análisis asistido por ordenador puede aprovecharse para desarrollar fármacos miméticos de péptidos o no de péptidos en la forma de moléculas orgánicas o péptidos sintéticos (por ejemplo, de 4-20 aminoácidos de longitud). Una vez que estos compuestos han sido escrutados y se ha observado que son capaces de unirse a FGF2, a continuación se evaluará su uso en células o en modelos de animales.

Los polipéptidos de la invención pueden estar en la forma de conjugados o complejos activos con un resto heterólogo, que puede seleccionarse entre agentes citotóxicos, marcas (p.ej., biotina, etiquetas fluorescentes), fármacos u otros agentes terapéuticos, ligados covalentemente o no, tanto directamente como a través del uso de agentes de acoplamiento o ligandos. Los conjugados o complejos útiles se pueden generar usando moléculas y

métodos conocidos en la técnica (marcas radioactivas o fluorescentes, biotina, agentes citotóxicos, fármacos u otros agentes terapéuticos). Los agentes citotóxicos incluyen agentes quimioterapéuticos, toxinas (p.ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado). Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de la toxina de la difteria, la cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Se dispone de una variedad de radionucleidos para la producción de proteínas radioconjugadas. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

También se pueden generar conjugados o complejos útiles para mejorar los agentes en términos de eficacia de administración. Para este propósito, los péptidos de la invención pueden estar en la forma de conjugados o complejos activos con moléculas tales como polietilén glicol y otros polímeros naturales o sintéticos (Harris JM y Chess RB, Nat Rev Drug Discov. (2003), 2(3): 214-21; Greenwald RB et al., Adv Drug Deliv Rev. (2003), 55(2): 217-50; Pillai O y Panchagnula R, Curr Opin Chem Biol. (2001), 5(4): 447-51). A este respecto, la presente invención contempla péptidos modificados químicamente como se describe en la presente memoria, en los que el péptido está ligado a un polímero. Típicamente, el polímero es soluble en agua de tal modo que el conjugado no precipita en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Los conjugados usados para terapia pueden comprender restos poliméricos solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua incluyen polietilén glicol (PEG), monometoxi-PEG, mono-alcoxi-(C1-C10)-PEG, ariloxi-PEG, poli-(N-vinil pirrolidona) PEG, tresil monometoxi PEG, PEG propionaldehído, bis-succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilén glicol, un copolímero de polióxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (p.ej., glicerol), polivinil alcohol, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. El PEG adecuado puede tener un peso molecular entre aproximadamente 600 y aproximadamente 60.000, que incluye, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado también puede comprender una mezcla de dichos polímeros solubles en agua.

Los ejemplos de conjugados comprenden los péptidos de la invención y un resto de óxido de polialcilo unido al extremo N de dicho resto de polipéptido. El PEG es un óxido de polialquilo adecuado. A modo ilustrativo, los péptidos de la presente invención pueden ser modificados con PEG, un proceso conocido como "PEGilación". LA PEGilación se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. Por ejemplo, la PEGilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilén glicol reactiva. En una estrategia alternativa, los conjugados se forman condensando PEG activado, en el que un grupo hidroxilo o amino terminal del PEG ha sido reemplazado por un ligando activado.

Otro objetivo de la invención está representado por un ácido nucleico que codifica los péptidos de unión a FGF2 de la invención, ácidos nucleicos que se hibridan con el anterior ácido nucleico, o que incluyen una secuencia degenerada del mismo. La invención también incluye vectores de expresión de origen vírico o plásmido que permiten la expresión del ácido nucleico de la invención y de células hospedantes procarióticas o eucarióticas transformadas con dichos vectores y líneas celulares estables derivadas de las mismas, que expresan el agente de unión a FGF2, que puede ser secretado o expresado sobre la superficie de la membrana. Los ejemplos son células B humanas.

Los péptidos de unión a FGF2 de la invención se pueden producir mediante un método en el que las células hospedantes descritas anteriormente son cultivadas en un medio de cultivo apropiado y se recolecta el agente de unión a FGF2.

La secuencia de ADN que codifica para los péptidos de la invención puede insertarse y ligarse en un vector adecuado. Una vez formado, el vector de expresión se introduce en una célula hospedante adecuada, que a continuación expresa el péptido.

La expresión de cualquiera de los péptidos recombinantes de la invención como se ha mencionado en la presente memoria puede efectuarse en células eucarióticas (p.ej., levaduras, células de insecto o de mamífero) o en células procarióticas, usando los vectores de expresión apropiados. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica.

A fin de ser capaz de expresar la proteína deseada, un vector de expresión también debería comprender secuencias de nucleótido específicas que contengan información reguladora transcripcional y traduccional ligada al ADN que codifica la proteína deseada, de tal modo que permita la expresión génica y la producción de la proteína. En primer lugar, para que el gen sea transcrito, debe estar precedido de un promotor reconocible por ARN polimerasa, al cual se une la polimerasa e inicia así el proceso de transcripción.

Existe una variedad de tales promotores en uso, que actúan con diferentes eficacias (promotores fuertes y débiles).

Para los hospedantes eucarióticos, se pueden emplear diferentes secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales, dependiendo de la naturaleza del hospedante. Pueden derivar de fuentes víricas, tales como

- adenovirus, virus de papiloma bovino, virus de Simio o similares, donde las señales reguladoras están asociadas a un gen particular que tiene un nivel elevado de expresión. Los ejemplos son el promotor TK del virus del Herpes, el promotor temprano SV40, el promotor de gen gal4 de levadura, etc. Se pueden seleccionar señales reguladoras de inicio transcripcional que permitan la represión y la activación, de tal modo que se pueda modular la expresión de los genes.
- La molécula de ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de la invención se inserta en el(los) vector(es), que tiene(n) señales reguladoras transcripcionales y traduccionales ligadas operativamente, que es(son) capaz(capaces) de integrar las secuencias génicas deseadas en la célula hospedante.
- Las células que han sido transformadas de forma estable por el ADN introducido pueden seleccionarse también introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de células hospedantes que contienen el vector de expresión. El marcador también puede proporcionar fototrofia a un hospedante auxotrópico, resistencia a biocidas, p.ej. inhibidores, o a metales pesados tales como cobre, o similares. El gen marcador seleccionable puede estar ligado directamente a las secuencias génicas de ADN a expresar, o pueden introducirse en la misma célula mediante co-transfección.
- Elementos adicionales de los vectores también pueden ser útiles para obtener una producción óptima de proteínas de la invención, en particular para seleccionar una célula particular que contenga plásmido o vector vírico; la facilidad con la que las células receptoras, que contienen el vector, pueden ser reconocidas y seleccionadas entre las células receptoras que no contienen el vector; el número de copias del vector que se desea en un hospedante particular; y si es deseable ser capaz de "transportar" el vector entre células hospedantes de especies diferentes.
- Una vez que el(los) vector(es) o la secuencia de ADN que contiene la(s) construcción(es) han sido preparados para expresión, la(s) construcción(es) de ADN puede(n) introducirse en una célula hospedante apropiada mediante cualquiera de una serie de medios adecuados: transformación, transfección, conjugación, fusión de protoplasto, electroporación, precipitación de fosfato cálcico, microinyección directa, etc.
- Las células hospedantes pueden ser procarióticas o eucarióticas. Se prefieren los hospedantes eucarióticos, p.ej. células de mamífero, tales como células humanas, de mono, de ratón y de Ovario de Hámster Chino (CHO), debido a que proporcionan modificaciones post-traduccionales a las moléculas proteínicas, que incluyen un plegamiento correcto o una glicosilación en los sitios correctos. También las células de levadura pueden llevar a cabo modificaciones post-traduccionales de péptidos que incluyen la glicosilación. Existe una serie de estrategias de ADN recombinante que utilizan secuencias promotoras fuertes y un elevado número de copias de plásmidos que pueden utilizarse para la producción de las proteínas deseadas en levaduras. Las levaduras reconocen secuencias líder en productos génicos de mamífero clonados y secretan péptidos que portan secuencias líder (es decir, pre-péptidos).
- Tras la introducción de el(los) vector(es), las células hospedantes se cultivan en un medio selectivo, que selecciona para el crecimiento de células que contienen vector. La expresión de la(s) secuencia(s) génica(s) clonada(s) da como resultado la producción de muchas proteínas deseadas.
- Muchos libros y artículos de revisión proporcionan información sobre cómo clonar y producir proteínas recombinantes con vectores y células hospedantes Procarióticas o Eucarióticas, tales como algunos títulos de la serie "A Practical Approach" publicada por Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).
- Los ejemplos de tecnologías de síntesis química, que están más indicados para producir el agente de unión a FGF2 de la invención cuando se encuentra en la forma de péptido o de mimético de péptido, son la síntesis en fase sólida y la síntesis en fase líquida. Como síntesis en fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C del péptido que va a sintetizarse es ligado a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y mediante una repetición alternativa de reacciones, una en la que los aminoácidos con sus grupos amino y grupos funcionales de cadena lateral protegidos son condensados uno a uno por orden desde el extremo C hasta el extremo N, y una en la que los aminoácidos ligados a la resina o el grupo protector de los grupos amino de los péptidos son liberados, se extiende de esta manera la cadena peptídica.
- Los métodos de síntesis en fase sólida se clasifican de forma general en el método tBoc y el método Fmoc, dependiendo del tipo de grupo protector usado. Los grupos protectores usados típicamente incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzhidrilo), Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (tritilo), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Cl₂-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO₂ (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidino; y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo). Tras la síntesis del péptido deseado, éste es sometido a la reacción de desprotección y separado del soporte sólido. Dicha reacción de separación del péptido del soporte se puede llevar a cabo con fluoruro de hidrógeno o con ácido tri-fluorometano sulfónico para el método Boc, y con TFA para el método Fmoc.
- Los agentes de unión a FGF2 obtenidos mediante tecnologías de ADN recombinante o de síntesis química finalmente son sometidos a una o más etapas de purificación. La purificación se puede llevar a cabo mediante una cualquiera de los métodos conocidos para este fin, es decir, cualquier procedimiento convencional que implique

extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o similares. Por ejemplo, se puede usar HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). La elución se puede llevar a cabo usando un disolvente basado en agua-acetonitrilo empleado comúnmente para la purificación de proteínas. La invención incluye preparaciones purificadas de los agentes de unión a FGF2 de la invención. Las preparaciones purificadas, tal como se usan en la presente memoria, se refieren a las preparaciones que tienen al menos un 1%, preferiblemente al menos un 5%, en peso seco de los compuestos de la invención.

Los compuestos de la invención descritos anteriormente (proteínas, péptidos) se pueden usar como medicamento. Preferiblemente como un agente anti-enfermedad producida por una angiogénesis alterada. Más preferiblemente, la angiogénesis alterada es provocada por una activación alterada del factor de crecimiento FGF2. Incluso más preferiblemente la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad artrítica, metástasis tumoral, retinopatía diabética, soriasis, inflamación crónica, arteriosclerosis o tumor. Preferiblemente, el tumor se selecciona del grupo de: sarcoma, carcinoma, carcinoide, tumor óseo o tumor neuroendocrino.

Los compuestos de la invención descritos anteriormente (proteínas, péptidos) pueden usarse como agentes anti-enfermedad asociados a la proliferación no controlada dependiente de FGF2 de fibroblastos o células de músculo liso, cicatrización ligada a una respuesta fibroblástica excesiva, y restenosis tras angioplastia.

De hecho, los péptidos de unión a FGF2 de la invención, una vez ligados a FGF2, actúan como inhibidores de FGF2. Efectivamente, los péptidos son capaces de inhibir la proliferación inducida por FGF2 de células endoteliales o de células de músculo liso. Por lo tanto, el potencial terapéutico de dicha molécula es la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades en los que la inhibición de FGF2 es beneficiosa. Este último efecto también se puede usar para reducir la población de células que expresan FGF2.

Los péptidos de unión a FGF2 de la invención se pueden usar como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades producidas por una angiogénesis alterada, en las que la angiogénesis alterada es provocada por una activación alterada de FGF2. Los ejemplos de dichas enfermedades son: enfermedad artrítica, metástasis tumoral, retinopatía diabética, soriasis, inflamación crónica, arteriosclerosis o tumor, en donde tumor es, por ejemplo, sarcoma, carcinoma, carcinoide, tumor óseo o tumor neuroendocrino.

Los agentes de unión a FGF2 de la invención también pueden usarse como ingredientes activos en composiciones farmacéuticas para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades asociadas a la proliferación no controlada dependiente de FGF2 de fibroblastos o células de músculo liso, tal como cicatrización ligada a una respuesta fibroblástica excesiva, y la restenosis tras angioplastia.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido de fórmula I y diluyentes y/o excipientes y/o adyuvantes adecuados. La composición farmacéutica puede ser útil para la profilaxis y/o el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente. Estas composiciones farmacéuticas pueden formularse en combinación con vehículos, excipientes, estabilizantes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dependiendo de las propiedades del agente, la composición farmacéutica puede ser útil para enfermedades relacionadas con células T CD4+ tales como enfermedades autoinmunes, inflamaciones o infecciones.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos de unión a FGF2 de la presente invención incluyen todas las composiciones en las que dicho compuesto está contenido en una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir, una cantidad efectiva para alcanzar el resultado médicamente deseable en el animal tratado. Las composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, vehículos biológicamente compatibles adecuados para administración a un animal (por ejemplo, salino fisiológico) y que eventualmente comprenden agentes auxiliares (como excipientes, estabilizantes o diluyentes) que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en cualquier modo aceptable para satisfacer las necesidades del modo de administración. En bibliografía se describe el uso de biomateriales y otros polímeros para administración de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo específico de administración. También serían útiles modificaciones de los compuestos de la invención para mejorar la penetración de la barrera hematoencefálica.

Se puede usar cualquier modo de administración aceptado y puede ser determinado por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, la administración puede ser a través de varias rutas parenterales tales como las rutas subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, transdérmica, oral o bucal. La administración parenteral puede ser mediante inyección de bolo o mediante perfusión gradual con el tiempo. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener agentes auxiliares o excipientes conocidos en la técnica, y pueden prepararse de acuerdo a métodos rutinarios. Adicionalmente, se puede administrar la suspensión de los compuestos activos, en forma de suspensiones de inyección oleaginosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados

incluyen aceites grasos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, por ejemplo, etiloleato o triglicéridos.

Las suspensiones de inyección acuosa que pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyen, por ejemplo, carboximetil celulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes. Las composiciones farmacéuticas incluyen disoluciones adecuadas para la administración por inyección, y contienen entre 0,01 y 99 por ciento, preferiblemente entre aproximadamente 20 y 75 por ciento de compuesto activo junto con el excipiente. Las composiciones que pueden administrarse rectalmente incluyen supositorios.

Se entiende que la dosis administrada dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, del tipo de tratamiento concurrente, si existe, de la frecuencia del tratamiento, y de la naturaleza del efecto deseado. La dosis se ajustará para el sujeto individual, como pueden entender y determinar los especialistas en la técnica. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse como múltiples dosis o en una única dosis. La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse sola o en combinación con otros compuestos terapéuticos dirigidos a la afección, o dirigidos a otros síntomas de la afección. Normalmente, una dosis diaria de ingrediente activo está comprendida entre 0,01 y 100 miligramos por kilogramo de peso corporal.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse al paciente intravenosamente en un vehículo farmacéutico aceptable tal como salino fisiológico.

Se pueden usar métodos estándar para la administración intracelular de péptidos, p.ej. administración con liposomas. Dichos métodos son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Las formulaciones de esta invención son útiles para la administración parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

Como es bien conocido en las artes médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, el área superficial del cuerpo, la edad, el compuesto particular que va a administrarse, el sexo, el tiempo y la ruta de administración, la salud general, y otros fármacos que estén administrando concurrentemente.

Una vez entendidas las características de los métodos y productos descritos en la presente memoria, la necesidad y el tipo de etapas adicionales pueden deducirse fácilmente revisando la técnica anterior, así como las siguientes figuras y ejemplos no limitativos que describen los detalles básicos y algunas aplicaciones de la invención.

Descripción de las Figuras

Figura 1. Inhibición de la actividad mitogénica de FGF2 por N_{term} -PTX3 transducida por retrovirus. (A) Análisis de transferencia western blot del medio acondicionado de células endoteliales aórticas de ratón (MAE) infectadas con retrovirus de EGFP, PTX3 humana de longitud completa, C_{term} -PTX3, o N_{term} -PTX3. Las dos bandas inmunorreactivas presentes en la calle de la sC_{term} -PTX3 corresponden a la forma glicosilada y no glicosilada de la proteína recombinante¹⁰. (B) Las células MAE infectadas por retrovirus fueron estimuladas con FGF2 (0,55 nM). Tras 48 h, las células fueron tripsinizadas y sometidas a recuento. Los datos se expresan como porcentaje de la proliferación observada en células tratadas con FGF2 infectadas falsas (0,8 duplicados de población celular). (C) Las células GM7373 fueron incubadas con el medio acondicionado a partir de células MAE infectadas y se trataron inmediatamente con FGF2 0,5 nM. Tras 24 h, las células fueron tripsinizadas y sometidas a recuento. Los datos están expresados como porcentaje de la proliferación observada en células GM7373 incubadas en medio fresco más FGF2 (1,0 duplicados de población celular). En B y C, los datos son la media \pm SD de 3 experimentos independientes por triplicado.

Figura 2. Inhibición de la interacción FGF2/PTX3 por N_{term} -PTX3 recombinante. (A) Se expresaron N_{term} -PTX3 y C_{term} -PTX3 marcadas con 6xHis y se purificaron a partir de células de *E. coli* transformadas (la figura interior muestra la tinción con plata de un gel de SDS-PAGE cargado con las proteínas purificadas). A continuación, se incubaron pocillos recubiertos con FGF2 con PTX3 de longitud completa, N_{term} -PTX3 o C_{term} -PTX3 (todas a 44 nM) durante 30 minutos a 37°C. La cantidad relativa de proteína ligada a FGF2 inmovilizado fue inmunodetectada mediante incubación con un anticuerpo anti-PTX3 policlonal de conejo, como se describe en Materiales y Métodos. (B) Se incubaron pocillos recubiertos de FGF2 con PTX3 biotinilada (bPTX3, 22 nM) en ausencia o en presencia de un exceso molar 10 a 1 de PTX3 de longitud completa, N_{term} -PTX3 o C_{term} -PTX3. La cantidad de bPTX3 ligada a FGF2 inmovilizada se determinó a continuación y los datos se expresaron como porcentaje respecto a la unión medida en ausencia de cualquier competidor. Todos los datos son la media \pm SD de 3 experimentos independientes por triplicado.

Figura 3. Mapeado de epítipo de PTX3. (A) PTX3 de longitud completa, N_{term} -PTX3 y C_{term} -PTX3 (200 ng/calle) fueron analizadas mediante análisis de transferencia western blot usando los anticuerpos monoclonales mAb-MNB4 y mAb-16B5. (B) Se dispusieron 128 péptidos solapantes de 13 unidades que se extienden por toda la secuencia de PTX3 humana sobre membranas de celulosa mediante la técnica de SPOT-síntesis. A continuación, las membranas fueron probadas con anticuerpos mAb-MNB4 (barras negras) y mAb-16B5 (barras grises) y se cuantificaron los inmunocomplejos mediante análisis densitométrico de las membranas. Las secuencias de aminoácidos de los

péptidos PTX3 reconocidos por los dos anticuerpos se muestran en cursiva subrayadas en el código de una única letra.

Figura 4. El mAb-MNB4 dificulta la interacción FGF2/PTX3. (A) Se incubaron pocillos recubiertos con FGF2 con bPTX3 22 nM en ausencia o en presencia de PTX3 de longitud completa, mAb-MNB4 o mAb-16B5 (todos a 220 nM). La cantidad de bPTX3 ligada a FGF2 inmovilizada se determinó a continuación y los datos se expresaron como porcentaje respecto a la unión medida en ausencia de cualquier competidor. (B) Se incubaron células GM7373 con FGF2 (0,55 nM) más PTX3 (220 nM) en ausencia o en presencia de mAb-MNB4 o mAb-16B5 (ambos a 2,2 μ M). Tras 24 h, las células fueron tripsinizadas y sometidas a recuento. Los datos están expresados como porcentaje respecto a la proliferación observada en células GM7373 incubadas solo con FGF2. Todos los datos son la media \pm SD de 3 experimentos independientes por triplicado.

Figura 5. Inhibición de la interacción FGF2/PTX3 por péptidos PTX3 sintéticos. (A) Representación esquemática de extremo N de PTX3 humana y péptidos PTX3 sintéticos relacionados. (B) Se añadió FGF2 (80 nM) a pocillos recubiertos con los péptidos PTX3 indicados (200 μ g/pocillo) y se evaluó la cantidad de FGF2 ligada. Los datos, expresados como el porcentaje de la cantidad de FGF2 ligada a los pocillos recubiertos con PTX3, son la media \pm SD de 3 experimentos independientes por triplicado. (C) Panel superior: se inyectó FGF2 (0,8 μ M) sobre chips sensores BIAcore recubiertos de gelatina o recubiertos con PTX3. Panel inferior: representación de sensograma que muestra la unión de cantidades crecientes de FGF2 (0,1, 0,5, 0,8 y 1,1 μ M) a PTX3 inmovilizada. La respuesta (en UR, Unidades de Resonancia) fue registrada en función del tiempo. D) Se inyectó FGF2 (0,8 μ M) sobre chip sensor BIAcore recubierto con PTX3 en presencia de concentraciones crecientes de PTX3 de longitud completa (■) o péptidos sintéticos PTX3(82-110) (•), mezcla de PTX3(82-110) (○), o PTX3(57-85) (□). Se registró la respuesta al final de la inyección y se representó en función de la concentración de antagonista. Para cada péptido, se obtuvieron resultados similares en 2-3 experimentos independientes. (E) Se incubaron células GM7373 con FGF2 (0,55 nM) en ausencia o en presencia de PTX3 (220 nM) o de los péptidos PTX3 indicados (todos a 66 μ M). Los datos, expresados como porcentaje respecto a la proliferación observada en células GM7373 incubadas solo con FGF2, son la media \pm SD de 3 experimentos independientes por triplicado.

Figura 6. Péptido PTX3(97-110) como antagonista de FGF2. (A) Representación esquemática de péptidos en expansión PTX3(82-110). (B) Se incubó con FGF2 (80 nM) pocillos recubiertos con los péptidos PTX3 indicados (200 μ g/pocillo) y se evaluó la cantidad de FGF2 ligada. Los datos, expresados como el porcentaje de la cantidad de FGF2 ligada a los pocillos recubiertos con PTX3, son la media \pm SD de 3 experimentos independientes por triplicado. (C) Se inyectó FGF2 (0,8 μ M) sobre un chip sensor BIAcore recubierto con PTX3 en presencia de concentraciones crecientes de PTX3(82-110) (•), PTX3(97-110) (○), PTX3(82-101) (■) o PTX3(82-96) (A). Se registró la respuesta al final de la inyección y se representó en función de la concentración de antagonista. Para cada péptido, se obtuvieron resultados similares en 2-3 experimentos independientes. (D) Se incubaron células GM7373 con FGF2 (0,55 nM) en ausencia o en presencia de los péptidos PTX3 indicados (todos a 66 μ M). Los datos, expresados como porcentaje respecto a la proliferación observada en células GM7373 incubadas solo con FGF2, son la media \pm SD de 3 experimentos independientes por triplicado. (E) Se inyectó FGF2 (0,8 μ M) sobre un chip sensor BIAcore recubierto de PTX3 en presencia de concentraciones crecientes de PTX3(97-110) (•), PTX3(100-110) (●), PTX3(97-104) (▲) o PTX3(97-107) (▼), PTX3(104-113) (◆), PTX3(100-113) (▲), PTX3(100-104) (□). Se registró la respuesta al final de la inyección y se representó en función de la concentración de antagonista. Para cada péptido, se obtuvieron resultados similares en 2-3 experimentos independientes.

Figura 7. Actividad anti-angiogénica del péptido PTX3(82-110). Se fotografiaron en el día 14 membranas corioalantoicas de embrión de pollo (CAM) implantadas en el día 11 mediante partículas de alginato que contenían vehículo (a) ó 16 pmoles de FGF2 en ausencia (b) o en presencia (c) de 3 nmoles de PTX3(82-110). Aumentos originales, x 5.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Compuestos químicos

Se expresó FGF2 recombinante humana (número de acceso 09038) y PTX3 (número de acceso swiss-prot P26022) en *E. coli* y en células de ovario de hámster chino, respectivamente, y se purificaron como se ha descrito previamente^{10,19}. Los péptidos sintéticos humanos PTX3(31-60), PTX33(57-85) y PTX3(107-132) fueron proporcionados por Primm (Milán, Italia), siendo proporcionados el resto de péptidos por Tecnogen (Piana di Monteverna, Caserta, Italia) (pureza en HPLC \geq 95%). Para todos los péptidos, se muestra la secuencia en la Tabla 1 en el código de letra única y la numeración comienza desde el residuo de metionina de la posición 1 de la secuencia líder de PTX3.

Tabla 1. Péptidos sintéticos que se expanden desde el extremo N de PTX3.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:
PTX3(31-60)	DNEIDNGLHPTEDPTPCDCGQEHSEWDKLF	8
PTX3(57-85)	DKLFIMLENSQMRERMLLQATDDVLRGEL	9
PTX3(82-110)	RGELQRLREELGRLAESLARPCAPGAPAE	10
PTX3(82-110) remezclada	EGLRGELRGSREAELLRQAARAPACPLPE	11
PTX3(107-132)	ARAEARLTSALDELLQATRDAGRRLA	12
PTX33(82-96)	RGELQRLREELGRLA	13
PTX3(82-101)	RGELQRLREELGRLAESLAR	14
PTX3(97-110)	ESLARPCAPGAPAE	5
PTX3(97-104)	ESLARPCA	15
PTX3(97-107)	ESLARPCAPGA	6
PTX3(100-104)	ARPCA	7
PTX3(100-110)	ARPCAPGAPAE	16
PTX3(82-99)	RGELQRLREELGRLAESL	1
PTX3(105-110)	PGAPAE	2
PTX3(97-99)	ESL	3
PTX3(105-107)	PGA	4

Los anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra PTX3 humana purificada se han descrito previamente ^{10,20} (MNB1 n° de cat. ALX-804-463, n° de cat. MNB4 ALX-804-464, Alexis Biochemicals).

5 Cultivos Celulares

Se cultivaron células GM7373 endoteliales aórticas bovinas²¹ en MEM de Eagle que contiene suero fetal de ternero al 10% (FCS). Se cultivaron células de empaquetamiento de riñón embrionario humano (EcoPack2-293) (Clontech, CA, EE.UU.) en DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) que contiene FCS al 10%. Se obtuvieron células endoteliales aórticas de ratón Balb/c 22106 (células MAE) de R. Auerbach (Universidad de Wisconsin, Madison, WI) y se cultivaron en DMEM con FCS al 10%.

10 Infección retroviral

Los ADNcs que codifican para PTX3 humana y para la proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) fueron obtenidos como se ha descrito previamente ¹⁷. Se generaron ADNcs que codifican para el fragmento N-terminal PTX3(1-178) (N_{term}-PTX3) y el fragmento C-terminal PTX3(179-381) fusionados a la secuencia líder para secreción de PTX3(1-17) (sC_{term}-PTX3) a partir de pLX-PTX3 ¹⁷ mediante PCR y técnicas de clonación estándar. Todos los ADNcs se clonaron en el vector retroviral pBABE, generando de este modo pBABE-PTX3, pBABE-N_{term}-PTX3, pBABE-sC_{term}-PTX3 y pBABE-EGFP que fueron usadas para transfectar las células de empaquetamiento EcoPack2-293 en presencia de Lipofectamina ¹⁷. Se seleccionaron las células transducidas con puromicina (1 µg/mL, Sigma) durante 2 semanas. Se usaron los clones con un título viral superior a 10⁶ cfu/mL para continuar con la experimentación. A continuación se incubaron cultivos confluentes de células MAE durante 24 horas con el medio

acondicionado de células de empaquetamiento pBABE-PTX3, pBABE-N_{term}-PTX3, pBABE-sC_{term}-PTX3 o pBABE-EGFP en presencia de polibreno (8 µg/mL, Sigma). Las poblaciones de células infectadas fueron seleccionadas durante 7 días con puromicina. La observación de las células infectadas con EGFP mediante microscopía de epifluorescencia (microscopio Axiovert S100, x10/0,25; Zeiss, Göttingen, Alemania) demostró que la eficacia de infección retroviral fue superior al 80%. Para determinar los niveles de expresión de proteína transgénica y la liberación por parte de las células infectadas, se cultivaron cultivos celulares en condiciones libres de suero durante 2 días. A continuación se recolectaron los medios acondicionados, se clarificaron mediante centrifugación, se concentraron en una relación de 10 a 1 usando filtros Centricon YM-10 (Millipore), y se evaluaron alícuotas de 100 µL mediante análisis de transferencia Western.

10 Ensayo de proliferación celular

Se llevó a cabo un ensayo de proliferación celular con células endoteliales como se ha descrito anteriormente²². Resumidamente, se sembraron células GM7373 o MAE en platos de 96 pocillos a una concentración de 75.000 células/cm² o 25.000 células/cm², respectivamente. Después de 16 h, las células fueron incubadas en medio fresco que contenía un 0,4% de FCS más FGF2 (0,55 nM) en ausencia o en presencia de diferentes antagonistas. Después de 24 ó 48 h, respectivamente, las células fueron tripsinizadas y contabilizadas en una cámara Burker.

Expresión de *E. coli* y purificación de fragmentos recombinantes marcados con 6xHis de PTX3

Se amplificaron ADNcs de N_{term}-PTX3 y C_{term}-PTX3 a partir de pLX-PTX3 mediante PCR con cebadores que contenían nucleótidos adicionales

PTX3-N:

20 (+) CACCGAGAACTCGGATGATTATGA 8 (SEQ ID 17);

(-) TTAACCTGCCGGCAGCCAGCTCC (SEQ ID 18);

PTX3-C:

(+) CACCTGTGAAACAGCTATTTTA (SEQ ID 19);

(-) TTATGAAACATACTGAGCTCC (SEQ ID 20).

25 Estos ADNcs fueron clonados en el vector pENTR TOPO (Kit de clonación pENTR Directional TOPO, Invitrogen) y se secuenciaron. Usando la tecnología Gateway© (Invitrogen), se clonaron entonces los ADNcs de N_{term}-PTX3 y C_{term}-PTX3 del vector pENTR TOPO en el vector pDEST17, lo que permite la inserción de una etiqueta de 6xHis en el extremo C de las proteínas recombinantes. A continuación se transformaron células BL21 de *E. coli* (Invitrogen) con los dos plásmidos recombinantes y se cultivaron a 37°C en medio LB que contenía 100 µg/mL de ampicilina. Se indujo la expresión de proteína recombinante mediante incubación de una noche a 30°C en presencia de un 0,2% de L-arabinosa. Tras la inducción, las células fueron re-suspendidas en tampón de unión (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, pH 7,4) y se lisaron mediante ultrasonidos. Los sobrenadantes clarificados fueron filtrados a través de un filtro de 0,45 µm y se cargaron en una Columna de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC) HiTrap de 3,0 mL (Amersham Biosciences) con níquel para purificación. LA columna se lavó con imidazol 100 mM en tampón de unión y las proteínas ligadas fueron eluidas con imidazol 300 mM según las instrucciones del fabricante. Las fracciones fueron evaluadas para determinar la presencia de la proteína recombinante mediante inmunotinción, y las fracciones positivas fueron recogidas y desaladas mediante cromatografía de filtración de gel (columna Sephadex G25 PD10, Amersham) en PBS. La pureza de las proteína recombinantes fue superior al 90%, determinado mediante SDS-PAGE seguido de tinción con plata del gel (véase la Figura 2A, panel interior).

40 Ensayo de unión en fase sólida

Se incubaron microplacas ELISA durante 16 horas a 4°C con 100 µL/pocillo de NaHCO₃ 100 mM, pH 9,6 (tampón de recubrimiento) que contenía FGF2 (270 nM). A continuación, los pocillos fueron cubiertos durante 2 horas a temperatura ambiente con leche en polvo al 5% en tampón de recubrimiento. A continuación, se incubaron alícuotas de 100 µL de PBS que contenían PTX3 de longitud completa, N_{term}-PTX3 o C_{term}-PTX3 recombinantes (todas a 44 nM) durante 30 minutos a 37°C en los pocillos recubiertos con FGF2. A continuación, los pocillos fueron incubados secuencialmente durante 1 hora a 37°C con un anticuerpo anti-PTX3 policlonal de conejo (dilución 1:2000) que reconoce ambos fragmentos de PTX3 con eficacia similar en análisis de transferencia Wester y ELISA, un anticuerpo biotinilado anti-conejo (1:2000), y 100 µL de estreptavidina-peroxidasa de rábano (1:5000, Amersham) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 100 µL/pocillo del sustrato cromógeno ácido 2,29-azinobis(3-etilbenzotiazolinasulfónico). Los valores de absorbancia fueron leídos a 405 nm en un lector ELISA automático. En algunos experimentos, se incubaron alícuotas de 100 µL de PBS que contenía PTX3 marcada con biotina (bPTX3) (22 nM) durante 30 minutos a 37°C en pocillos recubiertos de FGF2 con o sin competidores. A continuación se lavaron los pocillos y se evaluó la cantidad de bPTX3 ligada como se ha descrito previamente¹⁷. De forma alternativa, los péptidos PTX3 sintéticos fueron inmovilizados en pocillos de microplaca ELISA (200 µg/pocillo) como se ha descrito anteriormente. A continuación, se añadió FGF2 (80 nM) y se analizó el FGF2 ligado a péptidos

inmovilizados mediante 1 hora de incubación a 37°C con un anticuerpo anti-FGF2 policlonal de conejo (1:7000) seguido de la detección del inmunocomplejo como se ha descrito anteriormente.

Mapeado de epítipo de PTX3

5 Para identificar la secuencia de aminoácidos de los epítipos que se unen a anticuerpos anti-PTX3 monoclonales, se dispusieron 128 péptidos sobre membranas de celulosa mediante tecnología de síntesis SPOT²³. Los péptidos
 10 tenían una longitud de 13 aminoácidos con un desplazamiento de estructura de 3 aminoácidos. Las membranas fueron bloqueadas con un 2% de leche en Tween-TBS (MBS) durante 16 horas a 4°C. Después de un lavado, las membranas fueron incubadas durante 90 minutos a 37°C con los anticuerpos monoclonales mAb MNB4 o mAb 16B5 (ambos a una dilución 1:1000 en MBS) y después se incubaron durante 90 minutos a 37°C con IgG anti-rata conjugada a fosfatasa alcalina de conejo (1:30.000, Sigma) en MBS. Se desarrolló color en la reacción como ha descrito previamente²³ y se evaluó la intensidad de la señal mediante análisis densitométrico de la membrana.

Ensayo de unión BIAcore

15 Se usó un aparato BIAcore X (BIAcore Inc, Piscataway, NJ). Se utilizó resonancia de plasmón superficial para medir cambios en el índice refractivo producidos por la capacidad del FGF2 para unirse a PTX3 inmovilizada sobre un chip sensor BIAcore. Con este fin, se dejó reaccionar PTX3 (2,2 µM) con una celda de flujo de un chip sensor CM4 que
 20 había sido activada previamente con 50 µL de una mezcla de hidrócloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida 0,2 M e hidroxisuccinimida 0,05 M. Estas condiciones experimentales permitieron la inmovilización de 5.000 unidades de resonancia (URs), que corresponden aproximadamente a 0,1 pmoles de PTX3. Se obtuvieron resultados similares para la inmovilización de gelatina, usada aquí como control negativo y para sustracción del blanco. A continuación se inyectaron concentraciones crecientes de FGF2 con o sin péptidos PTX3 sintéticos en tampón de dilución (PBS más 0,005% de tensioactivo P20, 5,0 µg/mL de CaCl₂ y MgCl₂) sobre la superficie del PTX3 durante 4 minutos (para permitir su asociación con PTX3 inmovilizado) y a continuación se lavó hasta que se observó disociación.

Ensayo de membrana corioalantoica de embrión de pollo (CAM)

25 Se prepararon bolitas de alginato (5 µL) que contenían vehículo o 16 pmoles de FGF2 con o sin péptidos PTX3 sintéticos como se ha descrito previamente²⁴ y se colocaron encima de CAM de huevos de pollo White Leghorn fertilizados en el día 11 de incubación (10 huevos por grupo experimental). Después de 72 horas, se contabilizaron los vasos sanguíneos que convergían de un modo doblemente ciego en un estereomicroscopio (STEMI-SR, x2/0,12; Zeiss).

30 Resultados

La región N-terminal de PTX3 se une a FGF2

35 La proteína PTX3 se caracteriza por un dominio C-terminal de 203 aminoácidos (C_{term}-PTX3) que comparte homología con las pentraxinas cortas clásicas CRP y SAP, y por una extensión N-terminal de 178 aminoácidos (N_{term}-PTX3) que no muestra ninguna homología significativa con ninguna otra proteína conocida⁸. En un intento de identificar el(los) dominio(s) antiangiogénico(s) de unión a FGF2 del PTX3, se evaluaron las dos porciones C_{term} o N_{term}-PTX3 para determinar su capacidad para interactuar con FGF2.

40 Observaciones previas habían mostrado que la sobreexpresión de PTX3 de longitud completa da como resultado la inhibición de la proliferación dependiente de FGF2 en células endoteliales debido a la unión de PTX3 liberada al factor de crecimiento exógeno y su secuestro en el medio extracelular¹⁷. En base a esto, se infectaron células endoteliales aórticas de ratón (MAE) con retrovirus que albergaban la PTX3 de longitud completa humana, la extensión N-terminal de PTX3 N_{term}-PTX3, o el extremo C de la PTX3 fusionado a la secuencia líder de PTX3 para secreción (sC_{term}-PTX3). Las células de control fueron infectadas con un retrovirus que albergaba EGFP. Las células infectadas sobreexpresaron y liberaron las correspondientes proteínas en cantidades similares (Figura 1A) y mostraron un velocidad similar de crecimiento en condiciones basales. Sin embargo, la sobreexpresión de N_{term}-PTX3 provocó una reducción significativa de la capacidad de las células infectadas para proliferar en respuesta a FGF2 exógeno, similar a la sobreexpresión de PTX3 de longitud completa (Figura 1B). En su lugar no se ejerció ninguna inhibición por la sobreexpresión de sC_{term}-PTX3 en comparación con las células de control infectadas con EGFP.

50 Para determinar mejor la capacidad de N_{term}-PTX3 para actuar como antagonista de FGF2, se evaluaron medios condicionados de células MAE infectadas para determinar su capacidad para afectar a la proliferación dependiente de FGF2 de células GM7373 endoteliales (Figura 1C). Como se ha adelantado, la incubación de células GM7373 con FGF2 en presencia del medio condicionado de células MAE infectadas con N_{term}-PTX3 o PTX3 produjo una inhibición significativa de la actividad mitogénica del factor de crecimiento, mientras que el medio condicionado de células MAE infectadas con sC_{term}-PTX3 y EGFP fue ineficaz (Figura 1C). Ninguno de los medios condicionados produjo una inhibición significativa de la proliferación celular de GM7373 activada por FCS al 10%, confirmando de este modo la especificidad del efecto.

Para confirmar que la actividad antagonista de FGF2 de N_{term}-PTX3 era debida a su capacidad para interactuar directamente con el factor de crecimiento, se expresó N_{term}-PTX3 y se purificó a partir de células transformadas de *E. coli* como proteína recombinante marcada con 6xHis; se usó la C_{term}-PTX3 recombinante marcada con 6xHis purificada como control (Figura 2A, panel interior). Cuando se evaluó para determinar la interacción con FGF2, la PTX3 de longitud completa y el fragmento N_{term}-PTX3 recombinante mostraron la capacidad de unirse a FGF2 inmovilizado sobre plástico de cultivo no tisular. Por otro lado, no se observó interacción con C_{term}-PTX3 recombinante (Figura 2A). Por consiguiente, un exceso molar de 10 a 1 de N_{term}-PTX3 recombinante o de PTX3 de longitud completa, pero no de C_{term}-PTX3, previno la unión de PTX3 biotinilada (bPTX3) al FGF2 inmovilizado (Figura 2B).

Considerados en conjunto, estos resultados implican la región N-terminal de la PTX3 en la interacción con FGF2.

Inhibición de la interacción FGF2/PTX3 mediante un anticuerpo anti-N_{term}-PTX3 monoclonal

El escrutinio de un conjunto de anticuerpos monoclonales de rata activados contra PTX3 humana de longitud completa identificó los anticuerpos mAb-MNB4²⁰ (MNB4 n° cat. ALX-804-464, Alexis Biochemicals) y mAb-16B5¹⁰ (MNB1 n° cat. ALX-804-463, Alexis Biochemicals) que se unen selectivamente a N_{term}-PTX3 y C_{term}-PTX3 recombinantes, respectivamente, en un análisis de transferencia Western (Figura 3A).

Para mapear los epítomos de PTX3 reconocidos por los dos anticuerpos, los autores aprovecharon la técnica de síntesis SPOT²³ mediante la cual 128 péptidos solapantes de 13 unidades que se extienden desde la secuencia de PTX3 humana completa fueron dispuestos sobre una membrana de celulosa. Cuando la membrana fue evaluada con los dos anticuerpos monoclonales, la detección de inmunocomplejos reveló que el mAb-MNB4 reconoce el epítomo PTX3(87-99) presente en la extensión N-terminal de PTX3, mientras que el mAb-16B5 reconoce el epítomo PTX3(306-312) localizado en la región C-terminal de PTX3 (Figura 3B).

Cuando se evaluó para determinar la capacidad de afectar a la interacción FGF2/PTX3, el mAb-MNB4, pero no el mAb-16B5, previene la capacidad de la bPTX3 para unirse a FGF2 inmovilizado, de forma similar a un exceso molar de PTX3 no marcada libre (Figura 4A). Por consiguiente, el mAb-MNB4 elimina la capacidad de la PTX3 de longitud completa para inhibir la actividad mitogénica ejercida por el FGF2 en células GM7373 endoteliales, mientras que el mAb-16B5 es ineficaz (Figura 4B). Por lo tanto, el mAb-MNB4 que reconoce el epítomo N-terminal PTX3(87-99) neutraliza la interacción FGF2/PTX3.

Péptidos sintéticos relacionados con N_{term}-PTX3 como antagonistas de FGF2

Para definir adicionalmente la región de unión a FGF2 de la extensión N-terminal de la PTX3, los autores evaluaron la actividad antagonista de FGF2 del péptido sintético PTX3(82-110), que contiene el epítomo PTX3(87-99) reconocido por el mAb-MNB4 neutralizante (ver arriba), junto con tres péptidos sintéticos distintos PTX3(31-60), PTX3(57-85) y PTX3(107-132) que extienden parcialmente la secuencia de aminoácidos de la N_{term}-PTX3 (Figura 5A).

En un primer conjunto de experimentos, se evaluó la capacidad de los cuatro fragmentos de PTX3 sintéticos para interactuar con FGF2 en un ensayo de unión en fase sólida. Tal como se muestra en la Figura 5B, el FGF2 libre se une a PTX3(82-110) inmovilizado sobre plástico de cultivo no tisular, pero no a PTX3(31-60) o PTX3(57-85) inmovilizados, presentando solo una interacción limitada con PTX3(107-132) inmovilizado.

A continuación, se utilizó resonancia de plasmón superficial para determinar la capacidad de los cuatro péptidos para afectar a la interacción FGF2/PTX3. Los resultados muestran que el FGF2 (0,8 μM) se une a PTX3 inmovilizada sobre un chip sensor BIAcore con una alta capacidad (350-400 UR al final de la fase de inyección) (Figura 5C, panel superior). La especificidad de la interacción se demuestra por la falta de unión a un chip sensor recubierto de gelatina. Asimismo, se inyectaron concentraciones crecientes de FGF2 (de 0,1 a 1,1 μM , Figura 5C, panel inferior) sobre la superficie de PTX3 para evaluar los parámetros cinéticos de la interacción FGF2/PTX3. Los datos de unión demuestran que la interacción se produce con una constante cinética de disociación (k_{off}) de $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y una constante cinética de asociación (k_{on}) de $0,2 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, dando como resultado un valor K_d igual a $0,3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. En base a esto, los cuatro péptidos PTX3 sintéticos fueron evaluados para determinar su capacidad para secuestrar FGF2 en la fase móvil, previniendo de este modo su interacción con el chip sensor de PTX3. Tal como se muestra en la Figura 5D, PTX3(82-110) inhibe la unión de FGF2 a la superficie de PTX3 de un modo dependiente de la dosis con una potencia 30 veces inferior a la mostrada por la PTX3 de longitud completa (ID_{50} igual a 1,0 μM y 30 μM para PTX3 libre y péptido PTX3(82-110), respectivamente). En las mismas condiciones experimentales, sin embargo, no se ejerció ningún efecto inhibitorio con los péptidos PTX3(31-60), PTX3(57-85) y PTX3(107-132) (Figura 5D y otros datos recogidos). Asimismo, un péptido sintético mixto con una composición de aminoácidos igual a PTX3(82-110) [sPTX3(82-110), Tabla 1] mostró un efecto inhibitorio limitado ($\text{ID}_{50} > 3000 \mu\text{M}$) (Figura 5D), indicando de este modo que la secuencia de aminoácidos primaria en el PTX3(82-110) es importante para la interacción con FGF2.

La capacidad del péptido PTX3(82-110) para unirse a FGF2 animó a los autores a determinar su capacidad para actuar como antagonista de FGF2. Cuando se evalúan sobre células GM7373, tanto la PTX3 de longitud completa como el PTX3(82-110) inhiben la actividad mitogénica ejercida por FGF2 exógena, mientras que los péptidos mixtos

PTX33(82-110), PTX3(31-60), PTX3(57-85) y PTX3(107-132) fueron ineficaces (Figura 5E). Las curvas dosis-respuesta confirmaron que la actividad de antagonista de FGF2 de PTX3(82-110) era dependiente de la dosis (ID_{50} igual a 30 μ M y 30 nM para PTX3(82-110) y PTX3, respectivamente).

Identificación de una secuencia mínima lineal de unión a FGF2 en la extensión N-terminal de PTX3

5 Considerados en conjunto, los datos anteriores indican que la secuencia de aminoácidos lineal 82-110 de la extensión N-terminal de la PTX3 desempeña una función importante en la interacción con FGF2. En un intento por identificar una secuencia de unión a FGF2 mínima lineal, se evaluaron tres péptidos sintéticos solapantes PTX3(82-96), PTX3(82-101) y PTX3(97-110) que extienden la secuencia completa de PTX3(82-110) (Figura 6A y Tabla 1) para determinar su capacidad de interactuar con FGF2 en un ensayo de unión en fase sólida. En las mismas condiciones experimentales, el FGF2 libre se une a PTX3(97-110) inmovilizado, así como al PTX3(82-110) progenitor y a la PTX3 de longitud completa, sin interactuar con PTX3(82-96) o PTX3(82-101) (Figura 6B). Por consiguiente, PTX3(97-110) se une a FGF2 en la fase móvil, evitando de este modo su interacción con PTX3 inmovilizada sobre un chip sensor BIAcore (Figura 6C). La actividad inhibidora de PTX3(97-110) fue similar a la mostrada por el péptido progenitor PTX3(82-110), mientras que el PTX3(82-96) y el PTX3(82-101) fueron ineficaces (Figura 6C). En consonancia con estas observaciones, el PTX3(97-110), aunque no el PTX3(82-96) o el PTX3(82-101), inhibe la actividad mitogénica ejercida por el FGF2 en células GM7373 endoteliales (Figura 6D).

Para investigar adicionalmente la secuencia de unión a FGF2 lineal mínima que se extiende desde el péptido PTX3(97-110), los autores analizaron la unión de los siguientes péptidos cortos a FGF2 midiendo su interacción con PTX3 inmovilizada sobre un chip sensor BIAcore: PTX3(97-107), PTX3(97-104), PTX3(100-104) y PTX3(100-110), (Figura 6E). Los péptidos PTX3(97-107) y PTX3(100-104) mostraron una unión significativa a FGF2. Por el contrario, los péptidos PTX3(97-104) y PTX3(100-110) no evitaron la unión de FGF2 libre a PTX3 inmovilizado sobre un chip sensor BIAcore. (Figura 6E). Por tanto, parece que el PTX3(100-104) representa la secuencia de aminoácidos de unión a FGF2 lineal mínima en la extensión N-terminal de la PTX3. Por consiguiente, PTX3(100-104) inhibe la proliferación de células endoteliales inducida por FGF2.

25 Los péptidos sintéticos relacionados con N_{term} -PTX3 inhiben la actividad angiogénica del FGF2

Para determinar la capacidad de los péptidos relacionados con N_{term} -PTX3 para afectar a la neovascularización inducida por FGF2 *in vivo*, se implantaron esponjas de gelatina adsorbidas con FGF2 solo o añadido a péptidos PTX3 sobre CAMs de embrión de pollo de 11 días de edad. Tal como se muestra en la Figura 7, las bolitas de alginato adsorbidas con FGF2 (16 pmoles/embrión) ejercen una potente respuesta angiogénica en comparación con bolitas adsorbidas con vehículo (siendo los vasos macroscópicos que convergen hacia el implante iguales a 44 ± 7 y 11 ± 5 vasos/embrión para los dos grupos experimentales, respectivamente). En consonancia con las observaciones *in vitro*, la respuesta angiogénica *in vivo* dependiente de FGF2 se vio reducida significativamente (28 ± 5 vasos/embrión, $p < 0,05$ mediante ANOVA) por la adición de 3,0 nmoles de péptido PTX3(82-110) en los implantes de FGF2 (Figura 7). Por consiguiente, 80 nmoles de PTX3(97-110) produjeron una inhibición del 50% en la respuesta angiogénica activada por FGF2; por otro lado no se ejerció ningún efecto mediante PTX3(82-96).

Discusión

Los autores demuestran que la interacción con FGF2 está mediada por la extensión N-terminal sobre la PTX3. También, los experimentos llevados a cabo con anticuerpos monoclonales neutralizantes y péptidos sintéticos relacionados con PTX3 identifican la secuencia de aminoácidos lineal PTX3(97-110) como la responsable de dicha interacción. Estas conclusiones se basan en las siguientes evidencias experimentales: i) las pentraxinas cortas CRP y SAP son ligandos ineficaces de FGF2¹⁷ a pesar de su homología de secuencia con el extremo C de la PTX3⁷; ii) la transducción retroviral del fragmento N-terminal PTX3(1-178) (N_{term} -PTX3), aunque no la de sC_{term} -PTX3, inhibe la actividad mitogénica ejercida por FGF2 exógeno en células endoteliales; iii) el N_{term} -PTX3 recombinante, aunque no el C_{term} -PTX3, se une a FGF2 inmovilizada e inhibe la interacción PTX3/FGF2; iv) el anticuerpo monoclonal mAb-MNB4, que mapea el epítipo lineal PTX3(87-99), previene la interacción FGF2/PTX3 y elimina la actividad de antagonista de FGF2 de la PTX3 en células endoteliales; v) el péptido sintético PTX3(82-110) y los péptidos más cortos PTX3(97-110), PTX3(97-107) y PTX3(100-104), aunque no otros péptidos basados en regiones diferentes del extremo N de la PTX3, previenen la interacción FGF2/PTX3 mediante la unión a FGF2, inhibiendo de este modo la proliferación de células endoteliales dependientes de FGF2 *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*.

50 La PTX3 es producida por células macrófagos²⁷, fibroblastos⁹, mioblastos²⁸, microglia²⁹ y endoteliales⁸, lo que indica que puede ejercer las funciones paracrina y autocrina en el endotelio. De forma similar, diversos estímulos, que incluyen los mediadores inflamatorios IL-1 y óxido nítrico^{30,31} inducen la expresión de FGF2 en células endoteliales sometidas a un lazo autocrino de estimulación. Por tanto, las células endoteliales y otros tipos celulares pueden expresar tanto PTX3 como FGF2. Así, la PTX3 producida por células inflamatorias o por las propias células endoteliales puede afectar a la actividad autocrina y paracrina ejercida por FGF2 sobre el endotelio *in vitro* e *in vivo*. Esto debería permitir un ajuste fino de la neovascularización a través de la producción de inhibidores y estimuladores de la angiogénesis.

El FGF2 es un factor de crecimiento pleiotrópico que estimula varios tipos celulares de origen endodérmico y mesodérmico³². Por lo tanto, la función ejercida por el FGF2 en diversas afecciones patofisiológicas no se limita a su actividad angiogénica. Por ejemplo, el FGF2 estimula la migración y la proliferación de fibroblastos durante la curación de heridas y de células de músculo liso durante la aterosclerosis^{33,34} y la restenosis³⁵. Asimismo, puede favorecer la supervivencia de células neuronales y la proliferación de células gliales en el sistema nervioso central lesionado³⁶. En todas estas afecciones, la producción concomitante de PTX3^{37,38} modula la actividad ejercida por el FGF2 en dichas células. De hecho, la PTX3 inhibe la activación *in vitro* de células de músculo liso dependiente de FGF2 y el espesamiento íntimo tras lesión arterial *in vivo*¹⁸.

En conclusión, los autores demuestran por primera vez que el extremo N de la PTX3 está implicado en la interacción con FGF2. La PTX3 es un receptor de reconocimiento de patrón soluble multifuncional en la encrucijada entre la inmunidad innata, la inflamación, la deposición de matriz y la fertilidad femenina. Ejerce su actividad multifuncional a través de la interacción con numerosos ligandos con distintas propiedades moleculares.

REFERENCIAS

1. Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 337-366
2. Steel DM, Whitehead AS. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today.* 1994; 15: 81-88
- 3.- Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 1983; 34: 141-212
4. Du Clos TW. The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Mol Biol Rep.* 1996; 23: 253-260
5. Gewurz H, Zhang XH, Lint TF. Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7: 54-64
6. Nauta AJ, Daha MR, van Kooten C, Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.* 2003; 24: 148-154
7. Goodman AR, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski HG, Vilcek J. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7: 191-202
8. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1992; 267: 22190-22197
- 9.- Lee GW, Lee TH, Vilcek J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. *J Immunol.* 1993; 150: 1804-1812
- 10.- Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettore C, Gianazza E, Tagliabue A, Salmona M, Tedesco, F, Inrona M, Mantovani A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem.* 1997; 272: 32817-32823
11. Basile A, Sica A, d'Aniello E, Breviario F, Garrido G, Castellano M, Mantovani A, Inrona M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta regulation. *J Biol Chem.* 1997; 272: 8172-8178,
12. Salustri A, Garlanda C, Hirsch E, De Acetis M, Maccagno A, Bottazzi B, Doni A, Bastone A, Mantovani G, Beck Peccoz P, Salvatori G, Mahoney DJ, Day AJ, Siracusa G, Romani L, Mantovani A. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in *in vivo* fertilization. *Development.* 2004; 131: 1577-1586
13. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A. Non-redundant role of the long Pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature.* 2002; 420: 182-186
14. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine.* 2003; 21 Supl. 2: S43-47
15. Gerwins P, Skoldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 2000; 34: 185-194
16. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16: 159-178

17. Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, Indraccolo S, Amadori A, Mantovani A, Presta M. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*. 2004; 104: 92-99
18. Camozzi M, Zacchigna S, Rusnati M, Coltrini D, Ramirez-Correa G, Bottazzi B, Mantovani A, Giacca M, Presta M. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 1837-1842
19. Isacchi A, Statuto M, Chiesa R, Bergonzoni L, Rusnati M, Sarmientos P, Ragnotti G, Presta M. A six-amino acid deletion in basic fibroblast growth factor dissociates its mitogenic activity from its plasminogen activator-inducing capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 2628-2632
20. Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, Pizzetti F, Maggioni AP, Moccetti T, Metra M, Cas LD, Ghezzi P, Sipe JD, Re G, Olivetti G, Mantovani A, Latini R. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*. 2000; 102: 636-641
21. Grinspan JB, Mueller SN, Levine EM. Bovine endothelial cells transformed in vitro by benzo(a)pyrene. *J Cell Physiol*. 1983; 114: 328-338
22. Presta M, Maier JA, Rusnati M, Ragnotti G. Basic fibroblast growth factor: production, mitogenic response, and post-receptor signal transduction in cultured normal and transformed fetal bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1989; 141: 517-526
23. Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol*. 1996; 66: 149-169
24. Knoll A, Schmidt S, Chapman M, Wiley D, Bulgrin J, Blank J, Kirchner L. A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. *Microvasc Res*. 1999; 58:1-9
25. Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP. Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature*. 1994; 367: 338-345
26. Eriksson AE, Cousens LS, Weaver LH, Matthews BW. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 1991; 88: 3441-3445
27. Vouret-Craviari V, Matteucci C, Peri G, Poli G, Introna M, Mantovani A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun*. 1997; 65: 1345-1350
28. Introna M, Alles VV, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzai B, Peri G, Breviario F, Salmona M, De Gregorio L, Dragani TA, Srinivasan N, Blundell TL, Hamilton TA, Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*. 1996; 87: 1862-1872
29. Polentarutti N, Bottazzi B, Di Santo E, Blasi E, Agnello D, Ghezzi P, Introna M, Bartfai T, Richards G, Mantovani A. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 2000; 106: 87-94
30. Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. *J Immunol*. 1997; 158: 1887-1894
31. Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, Presta M. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res*. 1997; 80: 845-852
32. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol*. 1989; 109: 1-6
33. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 2890-2894
34. Peoples GE, Blotnick S, Takahashi K, Freeman MR, Klagsbrun M, Eberlein TJ. T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathologic role. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 6547-6551
35. Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation*. 1992; 86: 11143-46

36.- Logan A, Berry M. Transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor in the injured CNS. *Trends Pharmacol Sci.* 1993; 14: 337-342

5 37. Ravizza T, Moneta D, Bottazzi B, Peri G, Garlanda C, Hirsch E, Richards GJ, Mantovani A, Vezzani A. Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 2001; 105: 43-53

38. Rolph MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: e10-14

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de unión a FGF2 de fórmula I:



donde:

- 5 X_1 es un aminoácido seleccionado entre Arg y Lys;
 X_2 es un aminoácido seleccionado entre Cys y Thr;
 R_1 está ausente o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3;
 R_2 está ausente o consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4, con las siguientes condiciones:
- 10 cuando R_1 está presente, también R_2 está ausente; cuando R_1 es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, R_2 es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; cuando R_1 es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, R_2 es una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.
2. El péptido según la reivindicación 1, en donde X_1 es Arg.
- 15 3. El péptido según la reivindicación 1 ó 2, en donde X_2 es Cys.
4. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 10.
5. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido según cualquiera de las reivindicaciones previas, o que se hibrida con el anterior ácido nucleico, o que incluye una secuencia degenerada del mismo.
- 20 6. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 5.
7. Una célula hospedante transformada con el vector de expresión según la reivindicación 6.
8. La célula hospedante según la reivindicación 7, en donde el péptido es secretado o expresado sobre la superficie de membrana de la célula.
9. Un péptido de las reivindicaciones 1 a 4 para uso como medicamento.
- 25 10. Un péptido de las reivindicaciones 1 a 4 para uso contra una enfermedad producida por una angiogénesis alterada.
11. El péptido de la reivindicación 10 en el que la angiogénesis alterada está provocada por una activación alterada del factor de crecimiento FGF2.
- 30 12. El péptido de la reivindicación 10 u 11, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad artrítica, metástasis tumoral, retinopatía diabética, soriasis, inflamación crónica, arteriosclerosis o tumor.
13. El péptido de la reivindicación 12, en el que el tumor se selecciona del grupo: sarcoma, carcinoma, carcinoide, tumor óseo o tumor neuroendocrino.
14. Un péptido de las reivindicaciones 1 a 4 para uso contra una enfermedad asociada a la proliferación descontrolada dependiente de FGF2 de fibroblastos o células de músculo liso, la cicatrización ligada a una respuesta fibroblástica excesiva, y la restenosis tras angioplastia.
- 35 15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y diluyentes y/o excipientes y/o adyuvantes adecuados.

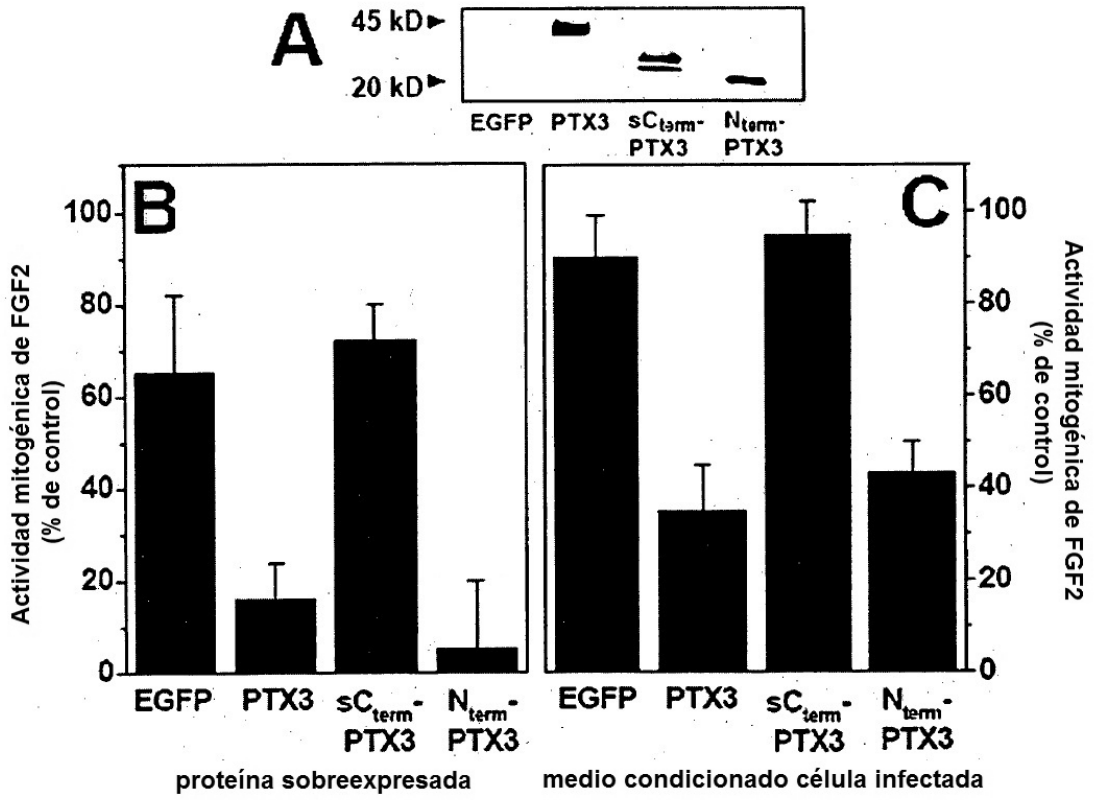


Figura 1

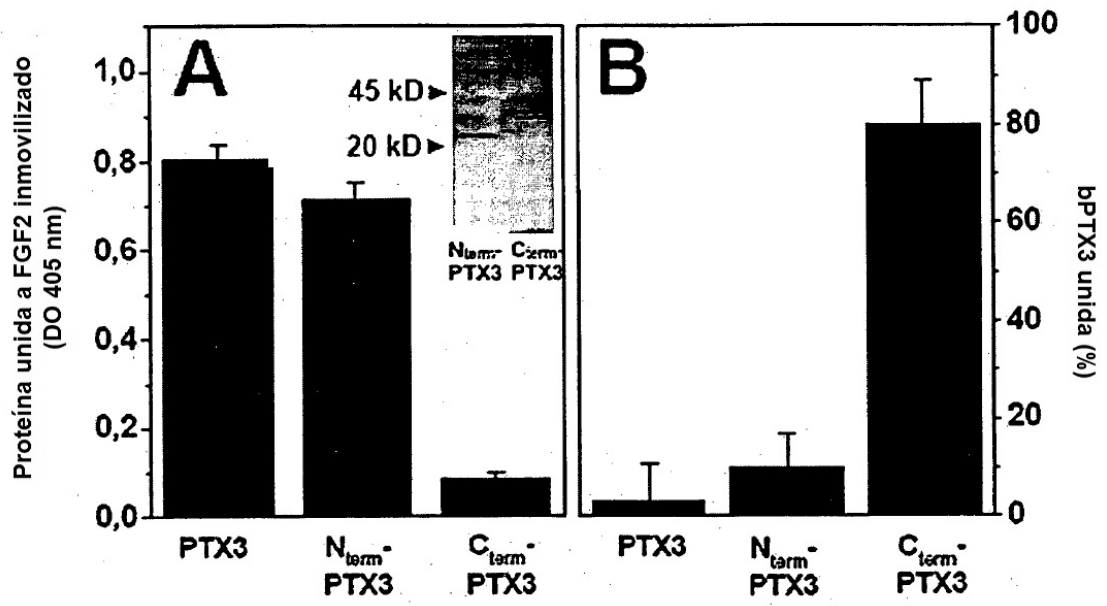


Figura 2

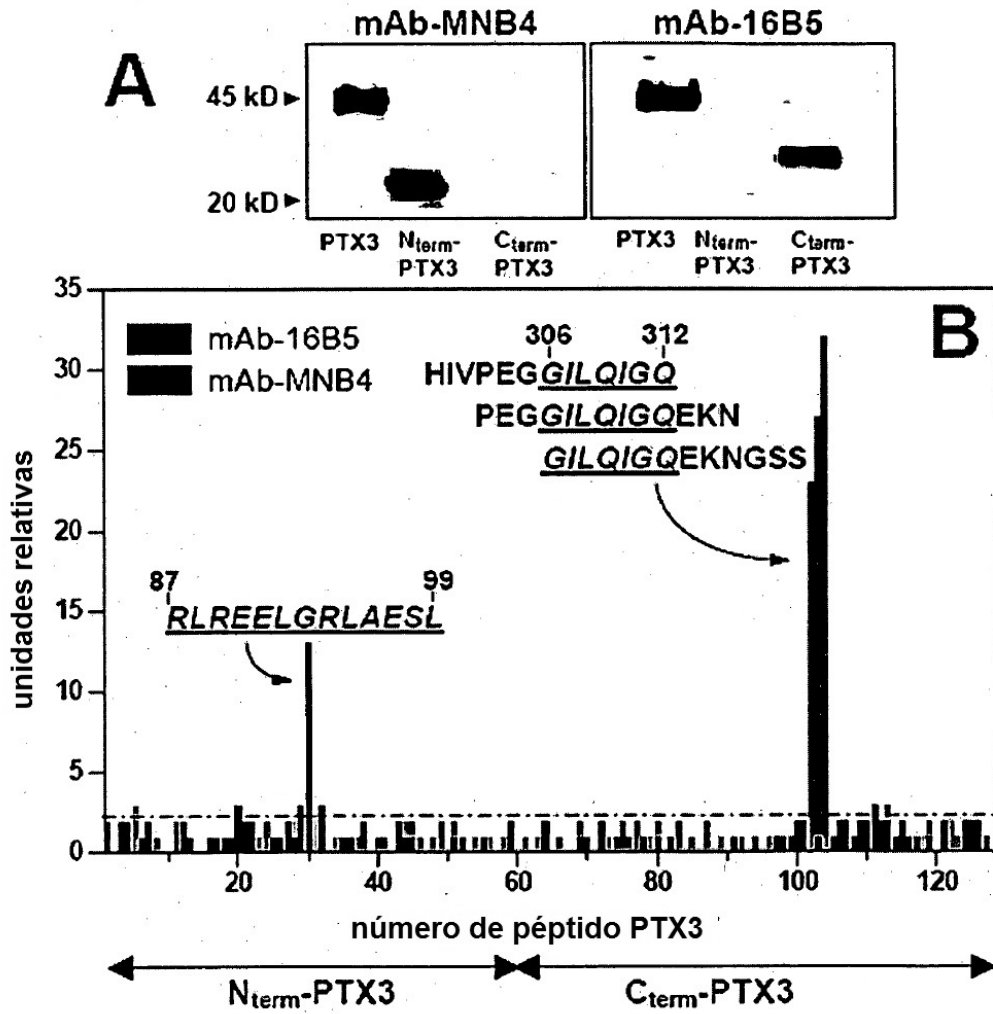


Figura 3

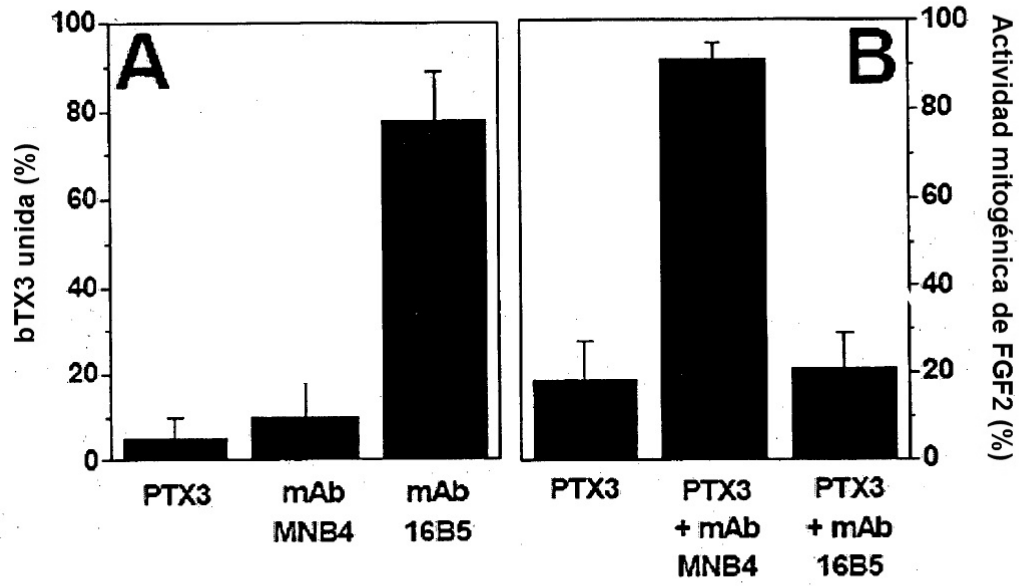


Figura 4

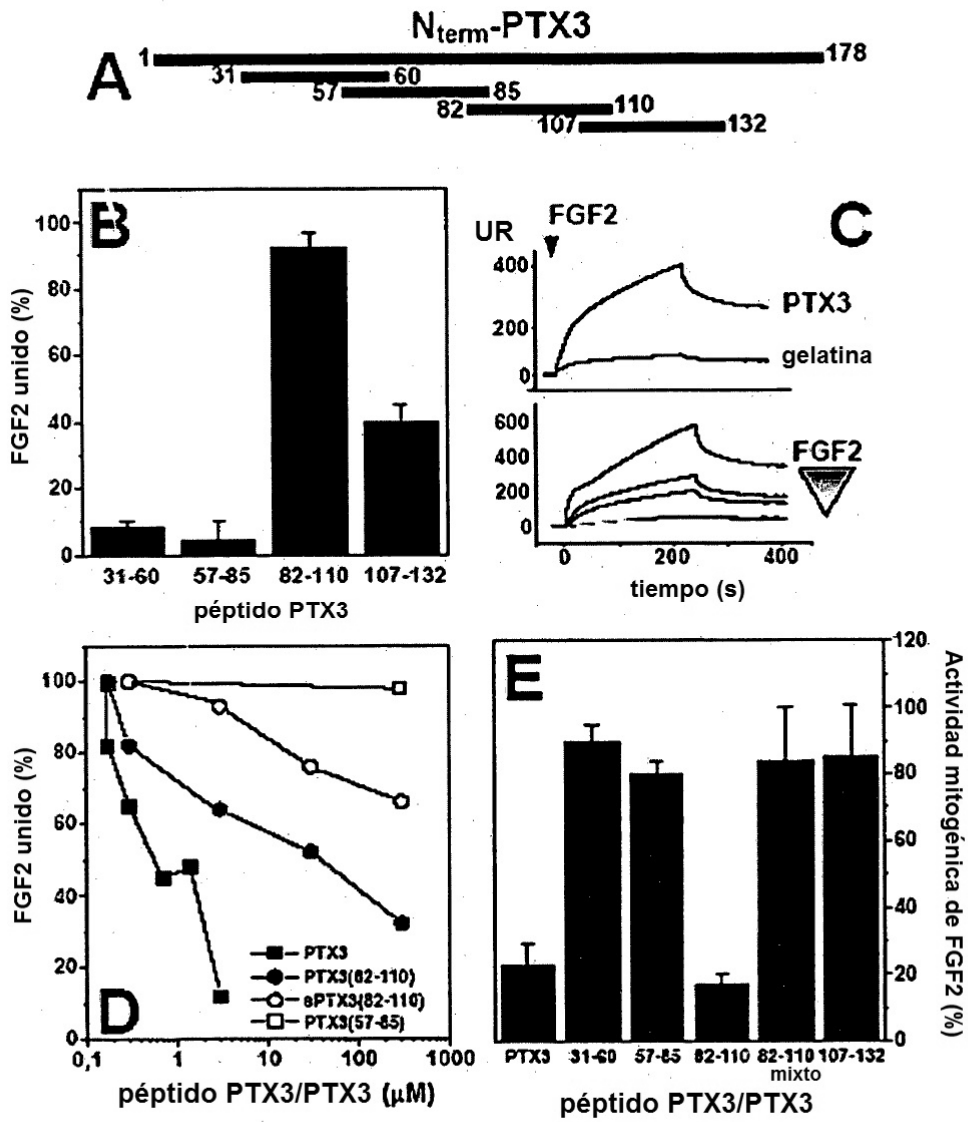
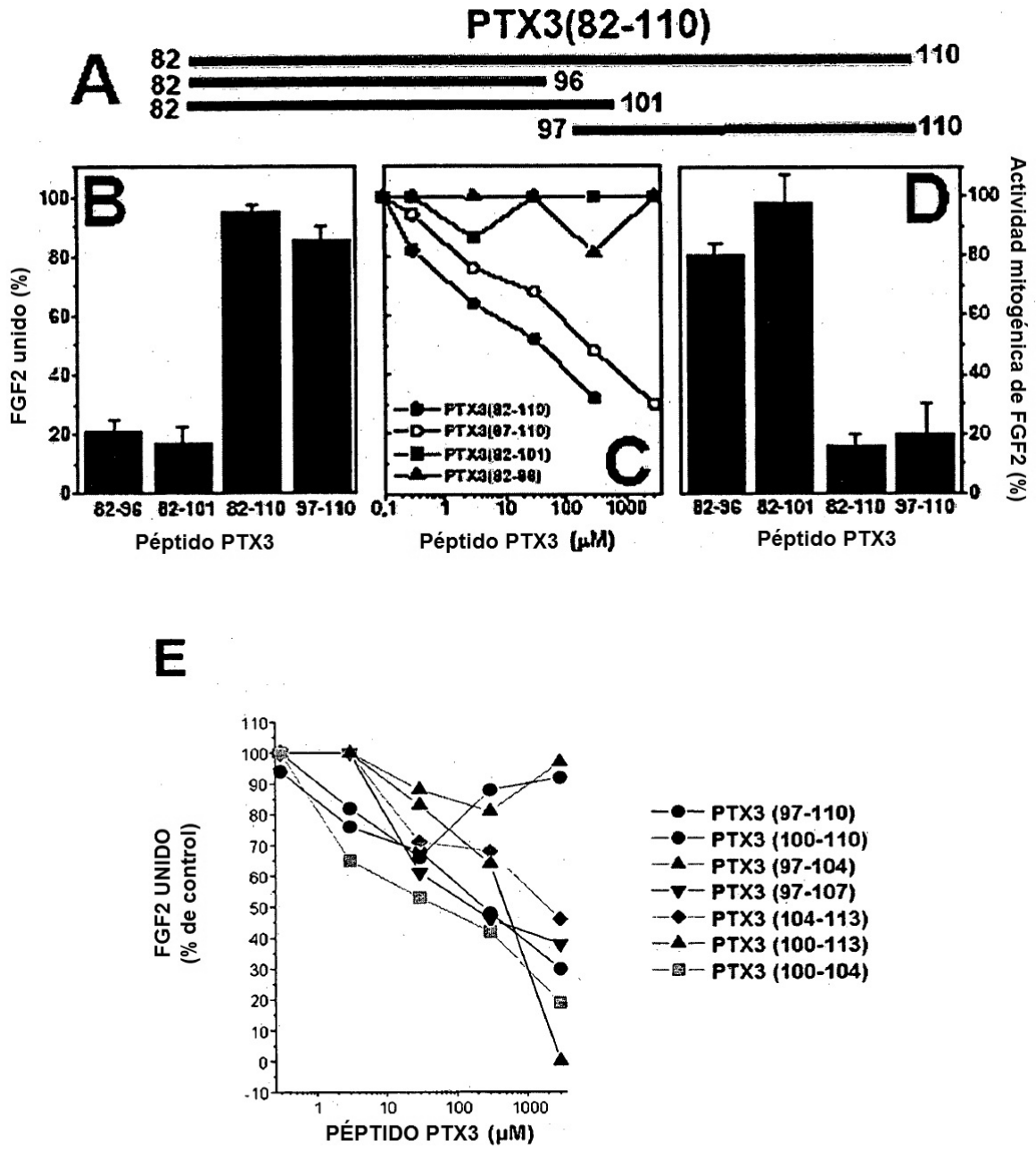


Figura 5



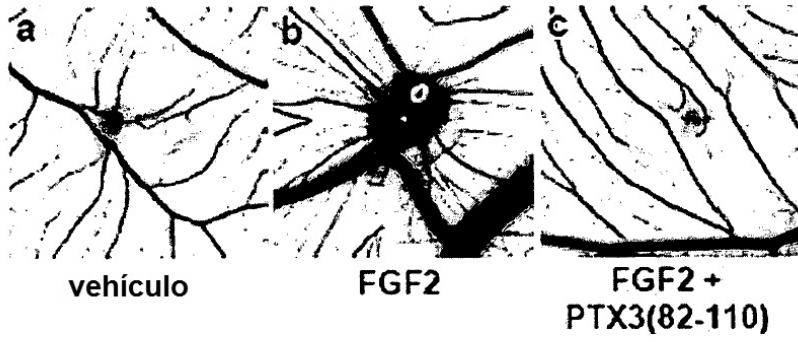


Figura 7