

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 833**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/57** (2006.01)  
**C07K 14/81** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C12N 15/62** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2010 E 10784451 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2504027**

54 Título: **Aceleración de la cicatrización de heridas mediante un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) unido a anclajes de glucosilfosfatidilinositol (GPI)**

30 Prioridad:

**24.11.2009 EP 09014652**

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

**11.07.2016**

73 Titular/es:

**GMG BERATUNGS- UND BETEILIGUNGS  
VERWALTUNGS GMBH (50.0%)**

**Kirchplatz 1  
82049 Pullach, DE y  
NELSON, PETER JON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NELSON, PETER JON**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 576 833 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

Aceleración de la cicatrización de heridas mediante un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) unido a anclajes de glucosilfosfatidilinositol (GPI)

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a construcciones de fusión de TIMP para acelerar la cicatrización de heridas.

10 **Antecedentes de la invención**El papel de los TIMP en medicina regenerativa

15 Un área significativa en el campo de la medicina regenerativa se ocupa del proceso de cicatrización de heridas. La cicatrización de heridas se refiere a una respuesta restauradora natural a lesión tisular e implica una compleja cascada de acontecimientos celulares que, en última instancia, genera la renovación superficial, reconstitución y restauración de la resistencia a la tracción de tejido lesionado. Este proceso generalmente implica el reclutamiento y la proliferación de diferentes tipos de células, una elaboración de la matriz celular y un incremento de la vigilancia inmunitaria.

20

La cicatrización de heridas es un complejo proceso fisiológico que implica la orquestación de una serie de acontecimientos celulares y bioquímicos que, en última instancia, impulsan la cicatrización. La cicatrización de heridas cutáneas puede dividirse en una serie de fases solapantes que incluyen la formación del coágulo de fibrina, la respuesta inflamatoria, formación de tejido de granulación que incorpora reepitelialización y angiogénesis y finalmente, formación y remodelación de la matriz. Las metaloproteasas de la matriz (MMP) son una familia de proteasas cuya biología está vinculada con el proceso de cicatrización de heridas. Las MMP regulan la inflamación, influyen en las interacciones célula-célula, degradan la matriz extracelular para facilitar la migración de células, y remodelan la nueva MEC. Sin embargo, se piensa que la actividad de MMP excesiva contribuye al desarrollo de heridas crónicas. Las actividades de la mayoría de MMP son bajas en tejido normal pero se regulan positivamente rápidamente durante la inflamación y la remodelación tisular. El control selectivo de la actividad de MMP puede demostrar ser un valioso enfoque terapéutico para promover la cicatrización de heridas.

25

30

La cicatrización de heridas continúa de una manera secuencial y oportuna y puede dividirse en cuatro fases generales: inflamación, granulación, reepitelialización y remodelación tisular. Cada fase del proceso de cicatrización de heridas está regulada por rutas de transducción de señales especiales. Durante la cicatrización de heridas, se produce un incremento de la expresión de factores de crecimiento y citoquinas; en particular, se han descrito incrementos de los niveles de TNF, IL-1 e IL-6. Durante la fase de inflamación inicial, que implica las proteínas efectoras IL-1, TNF- $\alpha$  y CSF, se reclutan tanto macrófagos como neutrófilos para formar un coágulo de fibrina. Durante la fase de granulación, los fibroblastos proliferan, migran a la herida, y secretan MEC. Las proteínas efectoras implicadas en esta última fase incluyen MMP, PDGF, FGF, EGF y VEGF. La tercera fase en la cicatrización de heridas, la reepitelialización, se caracteriza por la proliferación de queratinocitos, que migran al interior de la herida, y también por un incremento de los miofibroblastos, que son responsables de la contracción de la herida. El resultado de esta fase, que implica las proteínas efectoras MMP, KGF, TGF, GM-CSF, EGF y uPA y tPA, es la reepitelialización de la superficie de la herida, la disección de escaras, y la formación de una barrera. Finalmente, durante la fase de remodelación tisular, los fibroblastos producen una matriz de colágeno que causa la formación de tejido cicatricial, apoptosis de fibroblastos, y un cambio de la activación a la diferenciación de los queratinocitos. Las proteínas efectoras conocidas implicadas en esta última fase de cicatrización de heridas incluyen TGF- $\beta$ 1, MMP y TIMP.

35

40

45

Por lo tanto, las células efectoras responsables de la mayoría de aspectos de la cicatrización de heridas son los fibroblastos y los queratinocitos, y MMP que desempeñan un importante papel tanto en la migración de fibroblastos (MMP-1, -2, -3 y -13) como de queratinocitos (MMP-1, -2, -3, y -10) (Singer y Clark, 1999) además de la formación de cicatrices. Cada una de las MMP tiene una especificidad por sustrato diferente dentro de la MEC, y desempeña un importante papel en la degradación y renovación de la MEC. La familia de MMP incluye, entre otras, colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), estromelisininas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), matrilisina (MMP-7), metaloelastasa (MMP-12) y una serie de metaloproteinasas de la matriz unidas a la membrana (MT-MMP). Dado que la función de las MMP es descomponer proteolíticamente la MEC circundante, es necesario mantener de forma óptima un equilibrio entre esta actividad proteasa y el depósito de MEC durante la cicatrización de heridas, es decir, reconstrucción del tejido lesionado. El control de la actividad de MMP está modulado por las proteínas TIMP, que son producidas por la mayoría de las células, y actúan para inhibir las MMP en una relación 1:1.

50

55

60

Por lo tanto, existe una necesidad de controlar o influir en el equilibrio fisiológico entre la actividad proteasa y el depósito de la MEC durante el proceso de cicatrización de heridas.

65 El documento WO2007/039109 desvela TIMP unido a un anclaje de GPI para uso en aplicaciones en heridas. Se ha notificado que el tratamiento de células de fibroblastos dérmicos activados in vitro con TIMP-1-GPI efectuó diversos

aspectos de su biología. El tratamiento en superficie de estos miofibroblastos causa una reducción de su proliferación, migración y activación. Sorprendentemente, se ha descubierto que las construcciones de TIMP no solamente pueden suprimir la fibrosis, sino que también pueden acelerar el cierre de heridas en tratamiento activando la proliferación y migración de queratinocitos dérmicos. Ante una coyuntura similar, se ha descubierto que el tratamiento con TIMP-1-GPI puede inducir migración y proliferación de células mesoteliales primarias, lo que sugiere que el agente puede mostrar eficacia en cicatrización de heridas generales.

Tal como se ha desvelado previamente, las construcciones de fusión de TIMP proporcionan un agente regenerativo eficaz para el tratamiento de afecciones definidas por un equilibrio alterado entre actividad proteasa de MMP y depósito de MEC como, por ejemplo, en cicatrización patológica de queloides o heridas crónicas, que están asociadas habitualmente con niveles de MMP incrementados. Adicionalmente, las construcciones de fusión de la presente invención proporcionan un agente regenerativo eficaz que puede reducir, minimizar o inhibir la formación de cicatrices durante el proceso de cicatrización de heridas.

## 15 Sumario de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La invención se refiere a una construcción de fusión, que comprende una secuencia de aminoácidos de un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) o un fragmento biológicamente activo del mismo que inhibe las metaloproteinasas de la matriz activas, en la que dicho TIMP o fragmento biológicamente activo del mismo está unido a un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI), para la preparación de un medicamento para acelerar la cicatrización de heridas.

Por acelerar la cicatrización de heridas, se entiende que el proceso de cicatrización de heridas se produce al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 veces más rápido o dentro de un intervalo de cualquiera de los valores mencionados anteriormente (por ejemplo, 1,1-2,0, 1,3-1,9, 1,4-1,8, 1,5-2,0, etc.) que la cicatrización de heridas sin ningún tratamiento o un tratamiento sin ninguna sustancia activa.

El proceso de cicatrización de heridas puede medirse determinando el cambio (retracción) del volumen de la herida con el paso del tiempo. El ejemplo 1 desvela un método para medir el volumen de la herida. Como alternativa, puede usarse un ensayo *in vitro* como en los ejemplos 2 o 5. Como alternativa y preferentemente, pueden medirse la proliferación y migración de células mesoteliales primarias humanas o queratinocitos. El intervalo de tiempo preferido para determinar el cambio el volumen de la herida *in vivo* o *in vitro* o la proliferación y migración de células mesoteliales primarias humanas o queratinocitos puede ser de 7, 6, 5, 4 o 3 días.

El sujeto a tratar puede ser un animal o un mamífero y preferentemente un ser humano.

El TIMP puede seleccionarse entre el grupo que consiste en TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4. La construcción de fusión puede contener una o más secuencias señal de GPI para dirigir el anclaje de GPI. El anclaje de GPI puede derivarse del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-3), o una parte del mismo.

La construcción de fusión puede administrarse a una concentración de 0,005 a 0,1 µg/ml, 0,002 a 0,1 µg/ml, 0,002 a 0,015 µg/ml, 0,003 a 0,015 µg/ml, 0,004 a 0,015 µg/ml, 0,005 a 0,015 µg/ml, 0,005 y 0,010 µg/ml.

La composición farmacéutica puede usarse junto con una sustancia detergente, sellante o portadora.

La invención también puede referirse a un método de medición de la influencia de construcciones de TIMP sobre queratinocitos y células mesoteliales primarias. El método puede comprender administrar una composición farmacéutica que comprende una secuencia de aminoácidos de un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) o un fragmento biológicamente activo del mismo que inhibe metaloproteinasas de la matriz activas, en el que dicho TIMP o fragmento biológicamente activo del mismo está unido a un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI). El método puede ser un método *in vitro* en el que dicha secuencia de aminoácidos se añade a células aisladas. El método *in vitro* puede usarse para ensayar la eficiencia de las construcciones de TIMP. Las células aisladas pueden ser queratinocitos y células mesoteliales primarias.

El ensayo *in vitro* puede realizarse junto con controles, esto significa que no se añaden construcciones de TIMP a las células de control. La proliferación y/o movilización de las células que recibieron las construcciones puede medirse, a continuación, en comparación con las células que no recibieron la construcción. El proceso de cicatrización de heridas puede medirse midiendo el cambio (retracción) el volumen de la herida con el paso del tiempo. El ejemplo 1 desvela un método para medir el volumen de la herida. Como alternativa, puede usarse un ensayo *in vitro* como en los ejemplos 2 o 5. Como alternativa y preferentemente, puede medirse la proliferación y migración de células mesoteliales primarias humanas o queratinocitos. El intervalo de tiempo preferido para medir el cambio el volumen de la herida *in vivo* o *in vitro* o la proliferación y migración de células mesoteliales primarias humanas o queratinocitos puede ser de 7, 6, 5, 4 o 3 días.

El sujeto a tratar puede ser un animal o un mamífero y preferentemente un ser humano.

El TIMP puede seleccionarse entre el grupo que consiste en TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4. La construcción de fusión puede contener una o más secuencias señal de GPI para dirigir el anclaje de GPI. El anclaje de GPI puede derivarse del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-3), o una parte del mismo.

La construcción de fusión puede administrarse a una concentración de 0,005 a 0,1 µg/ml, 0,002 a 0,1 µg/ml, 0,002 a 0,015 µg/ml, 0,003 a 0,015 µg/ml, 0,004 a 0,015 µg/ml, 0,005 a 0,015 µg/ml, 0,005 a 0,010 µg/ml.

La composición farmacéutica puede usarse junto con una sustancia detergente, sellante o portadora. El detergente puede estar presente en una concentración entre el 0,01 % y el 0,05 %. El detergente puede estar presente en una concentración entre el 0,02 % y el 0,03 %. El detergente puede estar presente en una concentración del 0,025 %. El detergente de la composición puede ser Triton X-100. La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende de 0,005 a 0,1 µg/ml, 0,002 a 0,1 µg/ml, 0,002 a 0,015 µg/ml, 0,003 a 0,015 µg/ml, 0,004 a 0,015 µg/ml, 0,005 a 0,015 µg/ml, 0,005 a 0,010 µg/ml de un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) o un fragmento biológicamente activo del mismo que inhibe metaloproteinasas de la matriz activas, en la que dicho TIMP o fragmento biológicamente activo del mismo está unido a un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI).

El TIMP puede estar suspendido en agua o PBS. Para una posible formulación adicional de TIMP, consultar el documento EP 1764372.

La invención se caracteriza por que las construcciones de TIMP definidas anteriormente efectúan la proliferación y movilización de queratinocitos y/o células mesoteliales en heridas.

También se desvela una construcción de fusión (TIMP-GPI) que comprende una secuencia de aminoácidos de un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) o un fragmento biológicamente activo del mismo, en la que dicho TIMP o fragmento biológicamente activo del mismo está unido a una secuencia de aminoácidos de un dominio de mucina seguido por una secuencia de aminoácidos de un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI).

Se desvela que el extremo 3' de TIMP está fusionado directamente a una secuencia enlazadora de GPI.

El TIMP, tal como se usa en el presente documento, se deriva preferentemente de un mamífero; es más preferido un ser humano (los cuatro TIMP se revisan en el documento Mannello F *et al.*, 2001). Los ejemplos de proteínas de TIMP que pueden usarse de acuerdo con la presente invención comprenden TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4 y sus variantes correspondientes en otros organismos tales como ratón, conejo, perro, gato, oveja y vaca.

El anclaje de GPI, tal como se usa en la presente invención, se deriva preferentemente del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-3), o una parte del mismo, e incluye una secuencia señal de GPI que media en la asociación a la membrana.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico, tal como ARN o ADN, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la construcción de TIMP anclada a GPI de la invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, la molécula de ácido nucleico de la invención está contenida en un plásmido de expresión, un vector o una célula huésped para expresión de la molécula de ácido nucleico de la invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, las construcciones de fusión de TIMP-GPI de la invención están contenidas en una composición farmacéutica o medicamento.

En una realización adicional, la presente invención proporciona agentes novedosos para uso en métodos para acelerar la cicatrización de heridas.

### Definiciones

Con el término "TIMP", tal como se usa en el presente documento, se entiende un inhibidor tisular de metaloproteinasas endógeno, que se sabe que está implicado en funciones fisiológicas/biológicas que incluyen la inhibición de metaloproteinasas de la matriz activas, la regulación de la activación del proMMP, el crecimiento celular y la modulación de la angiogénesis. La "familia de TIMP" humana contiene cuatro miembros, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Un miembro preferido usado en la presente invención, TIMP-1, es una proteína secretada que puede detectarse en la superficie de la célula a través de su interacción con proteínas de la superficie (Bode y Maskos, 2003).

Las expresiones "construcción de fusión", "construcción de TIMP" o "construcción de fusión de TIMP", tal como se usan en el presente documento, se refieren tanto a la molécula de ácido nucleico como a la molécula de aminoácido codificada por ella.

La invención también se refiere específicamente a ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos que incluye la secuencia definida por las SEQ ID NO: 1 a 3, o un homólogo de la misma, o fragmentos únicos de la misma. En la presente invención, la secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína resultante se considera homóloga a una segunda molécula de ácido nucleico si la secuencia de nucleótidos de la primera molécula de ácido nucleico es al menos aproximadamente el 70 % homóloga, preferentemente al menos aproximadamente el 80 % homóloga, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % homóloga a la secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico. La homología entre dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse fácilmente usando el algoritmo BLASTN conocido (Altschul, *et al.*, 1990) con ajustes por defecto. Como ejemplo adicional, otro ensayo conocido para valorar la homología de dos secuencias de ácido nucleico es si hibridan en condiciones de hibridación normales, preferentemente en condiciones de hibridación rigurosas.

Dada la secuencia de ácido nucleico desvelada en el presente documento, el experto en la materia puede diseñar fácilmente estructuras de ácido nucleico que tengan funciones particulares en diversos tipos de aplicaciones. Por ejemplo, el experto puede construir oligonucleótidos o polinucleótidos para uso como cebadores en procedimientos de amplificación de ácido nucleico, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la reacción en cadena de reparación (RCR), ensayo de ligamiento de oligonucleótidos por PCR (PCR-OLA), y similares. Pueden construirse oligonucleótidos útiles como sondas en estudios de hibridación, tales como hibridación *in situ*. Numerosos métodos para marcar dichas sondas con radioisótopos, marcadores fluorescentes, enzimas y moléculas de unión (por ejemplo, biotina) se conocen, por lo tanto las sondas de la invención pueden adaptarse fácilmente para fácil detectabilidad.

También pueden diseñarse y fabricarse oligonucleótidos para otros fines. Por ejemplo, la invención permite el diseño de oligonucleótidos antisentido, y oligonucleótidos que forman triples hélices para uso en el estudio de relaciones estructura/función. Puede implementarse recombinación homóloga mediante adaptación del ácido nucleico descrito en el presente documento para uso como medio de dirección.

La proteína codificada por el ácido nucleico de la presente invención incluye, además, homólogos funcionales. Una proteína se considera un homólogo funcional de otra proteína para una función específica, tal como se describe a continuación, si el homólogo tiene la misma función que la otra proteína. El homólogo puede ser, por ejemplo, un fragmento de la proteína, o un mutante de sustitución, adición o delección de la proteína.

La determinación de si dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente homólogas se basa, para el fin de la presente invención, en búsquedas FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman (1988). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una primera proteína se considera homóloga a la de una segunda proteína si la secuencia de aminoácidos de la primera proteína tiene al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos aproximadamente el 80 % de identidad, y más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % de identidad, con la secuencia de la segunda proteína.

La posibilidad de sustituir un aminoácido en una secuencia con un aminoácido equivalente es bien conocida. Grupos de aminoácidos que se sabe que son equivalentes incluyen:

- (a) Ala(A), Ser(S), Thr(T), Pro(P), Gly(G);
- (b) Asn(N), Asp(D), Glu(E), Gln(Q);
- (c) His(H), Arg(R), Lys(K);
- (d) Met(M), Leu(L), Ile(I), Val(V); y
- (e) Phe(F), Tyr(Y), Trp(W).

Pueden realizarse sustituciones, adiciones y/o deleciones en las secuencias de aminoácidos, siempre que la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención siga cumpliendo los criterios funcionales descritos en el presente documento. Una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente igual que otra secuencia, pero que difiere de la otra secuencia por medio de una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones, se considera que es una secuencia equivalente.

Preferentemente, menos del 20 %, más preferentemente menos del 10 %, y aún más preferentemente menos del 5%, del número de residuos de aminoácidos en una secuencia son sustituidos, añadidos a, o delecionados de la proteína codificada por el ácido nucleico de la invención.

Con el término "MMP", tal como se usa en el presente documento, se entiende una metaloproteinasa de la matriz que pertenece a la superfamilia de MMP según lo representado mediante al menos 26 metaloendopeptidasas que degradan la matriz extracelular que están actuando durante el desarrollo y la diferenciación tisular, infiltración celular, cicatrización de heridas y como moderadores de la respuesta inmunitaria.

Con el término "GPI", tal como se usa en el presente documento, se entienden fosfolípidos de glucoinositol, en particular, glucosilfosfatidilinositol tal como se describe en Medof *et al.*, 1996. Estos anclajes similares a fosfolípidos tienen una estructura común para fijación a la membrana independientemente de la función de la proteína. Las unidades de anclaje de GPI están compuestas por un glucano lineal que contiene una fosfoetanolamina, tres

residuos de manosa, y una glucosamina no acetilada unida a un fosfolípido de inositol. La secuencia de GPI contiene las señales que dirigen el anclaje de GPI.

5 Una construcción de fusión "TIMP-GPI", tal como se usa en el presente documento, se refiere a TIMP que está fusionado directamente a una secuencia de enlace a GPI. La construcción de fusión TIMP-GPI se diseña sustituyendo la secuencia del extremo de ARNm o ADNc 3' de proteínas ancladas a GPI de forma natural (es decir, una secuencia que contiene las señales que dirigen el anclaje de GPI) para la secuencia del extremo de ARNm o ADNc 3' de TIMP endógeno.

10 El término "regeneración" se refiere, en general, a restaurar la integridad de tejido traumatizado o lesionado de otro modo. Este término puede incluir los procesos de cicatrización de heridas, reparación de tejido y otros tipos de actividades restauradoras que se producen en la ubicación donde se ha producido una agresión fisiológica y el consiguiente daño al tejido.

## 15 Descripción detallada de la invención

### La familia de TIMP e ingeniería de proteínas de superficies celulares

20 Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMP) son conocidos como los principales inhibidores celulares de la subfamilia de metaloproteinasas de la matriz (MMP), mostrando grados variables de eficacia contra diferentes miembros de MMP, así como diferentes patrones de expresión tisular y modos de regulación. Los TIMP normalmente modulan la actividad de MMP solubles, unidas a la matriz y asociadas a células. Los cuatro TIMP de mamífero tienen muchas similitudes amplias, pero muestran características estructurales, propiedades bioquímicas y patrones de expresión distintivos, lo que sugiere que cada TIMP tiene una función in vivo particular.

25 La proteína TIMP-1 es el miembro más ampliamente expresado y estudiado de la familia de TIMP. Otros miembros de la familia de TIMP incluyen TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Las proteínas TIMP no solamente comparten características estructurales comunes, incluyendo una serie de residuos de cisteína conservados que forman puentes disulfuro esenciales para la conformación de la proteína nativa (Brew *et al.*, 2000), sino que también tienen actividades biológicas ampliamente solapantes. La región N-terminal conservada de las proteínas TIMP es necesaria para actividades inhibitorias funcionales, mientras que se piensa que las regiones C-terminales divergentes modulan la selectividad de inhibición y la eficiencia de unión de agentes a las MMP (Maskos y Bode, 2003). Sin embargo, aparte de su capacidad para actuar como inhibidores de MMP, los diversos miembros de la familia de TIMP también pueden mostrar actividades biológicas adicionales, incluyendo la regulación de la proliferación y la apoptosis además de la modulación de respuestas angiogénica e inflamatoria.

35 Se ha descubierto que el TIMP-1 inhibe la mayoría de las MMP (excepto MMP-2 y -14), y preferentemente inhibe MMP-8. El TIMP-1 es producido y secretado en forma soluble por diversos tipos celulares y está ampliamente distribuido por todo el cuerpo. Es una proteína ampliamente glucosilada con una masa molecular de 28,5 kDa. El TIMP-1 inhibe las formas activas de MMP, y se compleja con la proforma de MMP9. Como MMP9, la expresión de TIMP-1 es sensible a muchos factores. La síntesis incrementada de TIMP-1 es causada por una amplia variedad de reactivos que incluyen: TGF beta, EGF, PDGF, FGFb, PMA, ácido todo-trans-retinoico (RA), IL1 e IL11.

40 El TIMP-2 es una glucoproteína de 21 kDa que es expresada por diversos tipos celulares. Forma un complejo estequiométrico no covalente, con MMP tanto latentes como activas. El TIMP-2 muestra una preferencia por la inhibición de MMP-2.

45 El TIMP-3 está normalmente unido a la MEC e inhibe la actividad de MMP-1, -2, -3, -9, y 13. TIMP-3 muestra un 30 % de homología de aminoácidos con TIMP-1 y un 38 % de homología con TIMP-2. El TIMP-3 ha mostrado promover el desprendimiento de células transformadas de la MEC y acelerar cambios morfológicos asociados con la transformación celular.

50 Debido a su unión de alta afinidad a la MEC, el TIMP-3 es único entre los TIMP. El TIMP-3 ha demostrado promover el desprendimiento de células transformadas de la MEC y acelerar los cambios morfológicos asociados con la transformación celular. El TIMP-3 contiene un dominio de unión a glucosaminoglucano (GAG) que comprende seis aminoácidos (Lys30, Lys26, Lys22, Lys42, Arg20, Lys45) que se cree que son responsables de una asociación con la superficie celular. El TIMP-3 es el único TIMP que normalmente inhibe TACE (enzima convertora de TNF- $\alpha$ -), otra metaloproteasa que libera TNF soluble y es responsable del procesamiento del receptor de IL-6 para desempeñar, de este modo, una parte fundamental en el proceso de cicatrización de heridas.

55 El TIMP-4 inhibe todas las MMP conocidas, y preferentemente inhibe MMP-2 y -7. El TIMP4 muestra un 37 % de identidad de aminoácidos con TIMP1 y un 51 % de homología con TIMP2 y TIMP3. El TIMP4 es secretado por vía extracelular, de forma predominante en tejido cardíaco y cerebral y parece funcionar de forma específica del tejido con respecto a la homeostasis de la matriz extracelular (MEC).

65

La ingeniería de proteínas de las superficies celulares es una tecnología potencialmente potente a través de la cual la composición de proteínas de superficie de las células puede manipularse sin transferencia de genes. Sustituyendo la región carboxilo terminal de una proteína de interés por la secuencia de ARNm derivado de ADNc de una proteína unida a GPI que contiene el dominio de señal de GPI, es posible generar una construcción de fusión que codifica un dominio unido a GPI.

Este enfoque ofrece múltiples ventajas respecto a enfoques de transferencia de genes más tradicionales. Por ejemplo, el método es aplicable a células que son difíciles o imposibles de transfectar (por ejemplo endotelio microvascular primario, células diana primarias, etc.). La cantidad de proteína añadida a la superficie celular puede controlarse y cuantificarse (mediante FACS o inmunofluorescencia). Además, múltiples proteínas ancladas a GPI pueden insertarse secuencial o concurrentemente en las mismas células. A través de ingeniería molecular, es posible expresar un marcador epitópico adicional que ayuda a la purificación de proteínas así como la monitorización de reactivo durante experimentos. El agente puede inyectarse directamente en el tumor o el área peritumoral y el efecto de reclutamiento de leucocitos selectivos sobre el crecimiento tumoral o apoptosis inducida por FAS se determina.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "aislado/a y/o purificado/a" se refieren al aislamiento in vitro de una molécula de ADN o polipéptido de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula, tales como ácido nucleico o polipéptidos, de modo que pueda secuenciarse, replicarse y/o expresarse. Por ejemplo, "secuencia de enlace a GPI aislada" es ARN o ADN que contiene más de 9, preferentemente 36, y más preferentemente 45 o más, bases de nucleótidos secuenciales que codifican al menos una parte de una secuencia de enlace, o una variante de la misma, o un ARN o ADN complementario a ella, que es complementario o híbrida, respectivamente, con ARN o ADN que codifica la secuencia de enlace y permanece unida de forma estable en condiciones rigurosas, tal como se definen mediante métodos bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, el ARN o ADN está "aislado" ya que está libre de al menos un ácido nucleico contaminante con el que está normalmente asociado en la fuente natural del ARN o ADN y está preferentemente sustancialmente libre de cualquier otro ARN o ADN de mamífero.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico recombinante" por ejemplo, "secuencia de ADN recombinante" se refiere a un ácido nucleico, por ejemplo, a ADN, que se ha derivado o aislado de cualquier fuente de tejido apropiada, que puede posteriormente alterarse químicamente in vitro, de modo que su secuencia no sea de origen natural, o corresponda a secuencias de origen natural que no están posicionadas como estarían posicionadas en un genoma que no ha sido transformado con DNA exógeno. Un ejemplo de ADN "derivado" de una fuente, sería una secuencia de ADN que se identifica como un fragmento útil dentro de un organismo dado, y que se sintetiza a continuación químicamente en forma esencialmente pura. Un ejemplo de dicho ADN "aislado" de una fuente sería una secuencia de ADN útil que se escinde o elimina de dicha fuente mediante medios químicos, por ejemplo, mediante el uso de endonucleasas de restricción, de modo que pueda manipularse adicionalmente, por ejemplo, amplificarse, para uso en la invención, mediante la metodología conocida de ingeniería genética.

A diferencia de anclajes polipeptídicos convencionales, que tienen diferentes secuencias transmembrana y se conectan a extensiones citoplasmáticas específicas, estos anclajes similares a fosfolípidos usan una estructura común como mecanismo general para fijación a la membrana independientemente de la función de la proteína. Las unidades de anclaje de GPI están compuestas por un glucano lineal que contiene una fosfoetanolamina, tres residuos de manosa, y una glucosamina no acetilada unida a un fosfolípido de inositol. Son prefabricadas en el retículo endoplasmático (ER) y se añaden a productos de traducción primarios en el momento de su translocación a través de la membrana del ER. Los productos modificados con GPI se glucosilan a continuación en el ER y el aparato de Golgi, y son transportados posteriormente a la superficie de la célula.

Secuencias enlazadoras a GPI preferidas que pueden usarse en la presente invención se derivan de anclajes de GPI que se aíslan de, por ejemplo, enzimas tales como fosfatasa alcalina, acetilcolinesterasa, 5' nucleotidasa (CO73); moléculas de adhesión tal como antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-3; CD58), molécula de adhesión a células neurales (NCAM); proteínas reguladoras del complemento tales como factor acelerante de la degradación (DAF o CD55), u otros tales como el receptor Fcγ de tipo III B (Fcγ-RIII o CD16b), Thy-1 (CD90), Qa-2, Ly-6A, inhibidor de membrana de lisis reactiva (MIRL o CD59). Para el fin de la presente invención, el antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-3) se prefiere. El experto en la materia reconocerá que también cualquier otro de los anclajes de GPI conocidos puede usarse para la puesta en práctica de la presente invención.

Para la construcción de TIMP-GPI, puede usarse la secuencia de longitud completa de TIMP en la construcción de fusión o una parte funcionalmente activa de la misma, que conserva la actividad de TIMP. Del mismo modo, puede usarse una parte de la secuencia de GPI, siempre que la parte permita la incorporación de la proteína TIMP en la superficie de la membrana celular de células cancerosas.

En lo sucesivo, se describen una pluralidad de realizaciones que se refieren a las construcciones de fusión de TIMP, con lo que las construcciones se produjeron y proporcionaron para el tratamiento del cáncer y como agentes en el campo de la medicina regenerativa. En una primera realización, la molécula de TIMP se selecciona entre el grupo que consiste en TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, y está preferentemente fusionada a una secuencia de GPI.

En otra realización preferida, la secuencia de GPI tiene 36 aminoácidos de longitud.

En una realización adicional, la proteína TIMP que se selecciona entre el grupo que consiste en TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4 y está fusionada a la secuencia de GPI, o fusionada a un dominio de mucina o dominio fractalcina seguido por la secuencia de GPI, está truncada en el extremo C. En una realización preferida, dicha molécula de TIMP está truncada a los primeros 50, 50-100 o 50-152 residuos de aminoácidos N-terminales. Más preferentemente, la molécula de TIMP está truncada a los primeros 152 residuos de aminoácidos N-terminales y es la molécula de TIMP-1. El término "truncado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de TIMP que contiene menos que el número completo de bases de ácido nucleico o residuos de aminoácidos descubiertos en una secuencia de ácido nucleico o proteína de TIMP nativa o a una secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de la que se han deletado secuencias no deseadas.

En una realización adicional más, la construcción de fusión de TIMP se define mediante una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.

La construcción obtenida puede expresarse a continuación en cualquier línea celular o célula huésped adecuada para obtener el polipéptido o la proteína de TIMP funcional. Para este fin, cualquiera de los vectores o plásmidos conocidos adecuados puede usarse para expresar las proteínas de TIMP ancladas a GPI de la presente invención. Tal como se describe con más detalle a continuación, células cancerosas diana tratadas con proteína TIMP-GPI (y como control con proteína rhTIMP-1) fueron reconocidas por las construcciones de proteína y, como consecuencia, destruidas debido a apoptosis mediada por FAS.

En una realización preferida, y a modo de ejemplo, un vector usado para la expresión de las construcciones de fusión de la presente invención contiene el promotor para el factor de elongación 1 alfa seguido por un sitio de clonación múltiple y un sitio de unión ribosómico interno que permite la expresión bicistrónica de la construcción y dihidrofolato reductasa (DHFR) usada como marcador de selección (Mack, et al., P.N.A.S. Estados Unidos 92: 7021, 1995). El extremo 3' (carboxilo terminal) de la proteína TIMP puede fusionarse directamente a una secuencia de enlace a GPI (por ejemplo derivada del antígeno asociado a la función de linfocitos-3 (LFA-3)). Las construcciones de fusión resultantes son transfectadas en células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en dihidrofolato reductasa (DHFR) y la selección se realiza tal como se describe (Mack, et al., P.N.A.S. Estados Unidos 92: 7021-7025, 1995). En una realización preferida, los transfectantes pueden exponerse a metotrexato para incrementar la tasa de expresión mediante amplificación génica.

Aunque el uso de TIMP-1 (Bode y Maskos, 2003) para la preparación de proteína TIMP anclada a GPI se prefiere en la presente invención, el experto en la materia reconocerá que también puede usarse otras proteínas TIMP para la puesta en práctica de la presente invención. Ejemplos adicionales de TIMP humanos que son útiles son TIMP-2, TIMP-3, y TIMP-4 (Mannello F, et al., 2001). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia de TIMP-1 derivada de un animal tal como un perro, gato, ratón, conejo, vaca u oveja, y ave puede usarse para la construcción de una construcción de fusión TIMP-GPI de la presente invención.

#### **Las construcciones de fusión de TIMP para uso en medicina regenerativa**

Además, las construcciones de fusión de la presente invención son adecuadas para uso en medicina regenerativa, particularmente en el área de la cicatrización de heridas. Tal como se ha descrito anteriormente, las proteínas TIMP que se fusionan a GPI o a mucina-GPI se incorporan eficazmente a la membrana de la superficie celular, donde enfocan dominios funcionales en aquellas superficies celulares independientemente de las interacciones proteína-proteína. Las construcciones de fusión de TIMP de la presente invención son normalmente bastante estables y presentan bioactividades amplificadas y novedosas.

Tal como se ha descrito anteriormente, tanto MMP como TACE desempeñan un papel crucial en el proceso de cicatrización de heridas. Los niveles de MMP incrementados están asociados con diversos trastornos de cicatrización de heridas, entre otros, presencia de heridas crónicas. Dado que los TIMP son inhibidores naturales de MMP, las construcciones de fusión de la presente invención también pueden emplearse como agentes terapéuticos eficaces para acelerar el proceso de cicatrización de heridas, por ejemplo, en medicina regenerativa. Se descubrió en la presente invención que la cicatrización de heridas incrementa la proliferación y migración de queratinocitos dérmicos.

Una respuesta de cicatrización de heridas típica se caracteriza por el movimiento de células especializadas en el sitio de la herida. Las plaquetas y las células inflamatorias son, generalmente, las primeras células en llegar al lugar de la lesión y estas moléculas proporcionan importantes funciones y señales químicas, incluyendo citoquinas que son necesarias para el flujo hacia dentro de células de tejido conectivo y otros factores de cicatrización. El término "herida" significa una alteración de la estructura y la función fisiológicas normales. Por lo tanto, el proceso de cicatrización de heridas se refiere a la compleja y dinámica secuencia de acontecimientos que, en última instancia, dan como resultado la restauración de continuidad y función fisiológicas.

Por lo tanto, la presente invención ofrece agentes regenerativos eficaces para acelerar el proceso de cicatrización de heridas y/o para tratar disfunciones asociadas comúnmente con la cicatrización de heridas. Específicamente, las construcciones de fusión de la presente invención pueden utilizarse para controlar, alterar, inhibir o incluso prevenir eficazmente estos procesos indeseables. Las construcciones de fusión de la presente invención pueden formularse como un producto farmacéutico y administrarse en el sitio de lesión. En una realización, el sitio de lesión es creado mediante cirugía, una quemadura, una inyección, una mordedura, una vacunación, un traumatismo, cirugía o infección. En otra realización, la construcción de fusión usada para la preparación del medicamento a aplicar al sitio de lesión se selecciona entre el grupo que consiste en TIMP-1-GPI, TIMP-2-GPI, TIMP-3-GPI, TIMP-4-GPI o mutantes de los mismos.

#### Formulación de las construcciones de TIMP y vías de administración

Composiciones farmacéuticas basadas en las construcciones de TIMP de la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Las técnicas y formulaciones pueden encontrarse en general en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa. Para los fines de inyección, los compuestos de la invención pueden formularse en una solución líquida, preferentemente en un tampón fisiológicamente compatible tal como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse, o suspenderse inmediatamente antes de usarlo. También son adecuadas formas liofilizadas.

Además de estas formulaciones, los compuestos también pueden formularse como una preparación de depósito. Estas formulaciones de depósito de acción a largo plazo pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante inyección. Por lo tanto, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o como una resina de intercambio iónico, o como un derivado moderadamente soluble, tal como una sal moderadamente soluble. Otros sistemas de administración adecuados incluyen microesferas, que ofrecen la posibilidad de una administración local y no invasiva de fármacos durante un periodo de tiempo prolongado. Esta tecnología particular utiliza microesferas que tienen un tamaño precapilar que puede inyectarse mediante un catéter coronario en cualquier parte seleccionada de un tejido, por ejemplo el corazón u otros órganos, sin causar una inflamación o isquemia resultante. El producto terapéutico administrado se libera lentamente a partir de estas microesferas y es captado fácilmente por células presentes en el tejido circundante (por ejemplo células lesionadas o cancerosas).

Para administración tópica, los oligómeros de la invención pueden formularse en pomadas, bálsamos, geles o cremas conocidas en general en la técnica. Una solución de lavado que contiene el oligómero puede usarse localmente para tratar una lesión o inflamación o para acelerar en general el proceso de cicatrización.

Las construcciones de TIMP de la presente invención pueden combinarse cuando se prepara un medicamento, de modo que el medicamento resultante comprenda más de uno, preferentemente dos, y aún más preferentemente tres construcciones de TIMP diferentes. Con este enfoque, las bioactividades amplificadas y novedosas de los diferentes miembros de la familia de TIMP pueden combinarse preferentemente y dirigirse a la superficie celular, lo que puede causar un efecto sinérgico. Por ejemplo, las construcciones de fusión de TIMP-1 inhiben la mayoría de MMP, excepto MMP-2 y MMP-14. Por lo tanto, cualquiera de las construcciones de TIMP-1 puede combinarse con cualquiera de las construcciones de TIMP-2 o TIMP-4 que inhiben ambas preferentemente MMP-2. Por lo tanto, por medio de esta combinación, puede conseguirse una combinación más completa de la familia de MMP.

En una realización, las formulaciones de la presente invención comprenden, por lo tanto, una construcción de TIMP-1, o una construcción de TIMP-2 y/o TIMP-4. En una realización preferida, la formulación comprende una construcción de TIMP-1 seleccionada entre el grupo que consiste en un TIMP-1-GPI truncado, tal como la codificada por la SEQ ID NO: 1, y una construcción de TIMP-2 y/o TIMP-4. Preferentemente, la construcción de TIMP-2 es codificada por la SEQ ID NO: 3.

En una realización adicional, la formulación comprende una construcción de TIMP-3 de la presente invención, preferentemente la codificada por la SEQ ID NO: 3, que inhibe TACE junto con al menos una de las construcciones de TIMP seleccionadas entre el grupo que consiste en un TIMP-1-GPI truncado, como la codificada por la SEQ ID NO: 1, una construcción de TIMP-2 y TIMP-4. Preferentemente, las construcciones de TIMP-1 y TIMP-2 son codificadas por las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 respectivamente.

#### Breve descripción de las figuras

##### Figura 1. Efecto de la proteína TIMP-1-GPI sobre la cicatrización de heridas.

Imágenes representativas (a) muestran cicatrización de heridas en ratones tratados con tampón rhTIMP-1, rhTIMP-1, o TIMP-1-GPI. Las heridas se fotografiaron en los momentos indicados, de los días 0-10. Barra de escala = 4 mm. El volumen de la herida (b) y la tasa de cierre de la herida (c) en tratamiento con TIMP-1-GPI con respecto al conseguido mediante aplicación de tampón rhTIMP-1 ( $\$p < 0,05$ ) o rhTIMP-1 (\*\* $p < 0,05$ ). \* $p < 0,05$ , # $p < 0,05$  (ambos frente a control).

**Figura 2. El tratamiento con TIMP-1 anclado a GPI estimula la proliferación celular de queratinocitos**

Para evaluar el efecto de la ingeniería de superficie con TIMP-1 sobre la proliferación de queratinocitos humanos primarios, se realizaron ensayos con MTT. Los queratinocitos tratados con TIMP-1-GPI muestran un incremento dependiente de la dosis de la proliferación (a 24, 48 y 72 h, reflejado en las tres columnas). A continuación se midió la absorbancia a 550 nm usando el lector de ELISA GENios plus TECAN. Para cada experimento, se analizaron al menos seis pocillos por condición experimental y punto temporal. PI (fosfatidilinositol (anclaje de GPI)).

**Figure 3. Un ensayo de cicatrización de heridas in vitro muestra un cierre de heridas incrementado después de la aplicación de TIMP-1-GPI.**

Se muestra el efecto de TIMP-1-GPI sobre una monocapa de queratinocitos humanos primarios, tal como se observa en microscopía óptica.

Un ensayo de cicatrización de heridas in vitro usando un sistema disponible en el mercado (Ibidi, Martinsried) se usó para ensayar el efecto del tratamiento con TIMP-1-GPI sobre la migración y la proliferación de queratinocitos dérmicos humanos. En este ensayo, las células se cultivaron sobre plástico en una cámara. Cuando la cámara se retiró, esto causó la generación de una herida uniforme en la monocapa de queratinocitos. La "cicatrización" de esta herida se observó a continuación durante 48 horas. Los resultados muestran que el tratamiento con vehículo o TIMP-1 de control no causa un cierre de heridas mejorado. En contraste, TIMP-1-GPI a 12 ng/ml muestra un cierre pronunciado a las 24 horas después del tratamiento. Cuanto más elevada sea la concentración de TIMP-1-GPI, más rápido se cierra la "herida" (la "herida" es claramente visible el día 0).

**Figura 4. TIMP-1-GPI estimula la proliferación de células mesoteliales primarias.**

Se muestra el efecto de TIMP-1-GPI sobre la proliferación de células mesoteliales primarias cultivadas. El vehículo es 1xPBS 0,05 % TritonX100.

Para evaluar el efecto de ingeniería de superficie con TIMP-1 sobre la proliferación de células mesoteliales primarias humanas, se realizaron ensayos con MTT. Las células mesoteliales tratadas con TIMP-1-GPI muestran un incremento de proliferación dependiente de la dosis (a las 24, 48 y 72 h). A continuación se midió la absorbancia a 550 nm usando el lector de ELISA GENios plus TECAN. Para cada experimento, se analizaron al menos seis pocillos por condición experimental y punto temporal.

**Figura 5. Zimografía. Influencia de TIMP-1-GPI sobre la secreción de MMP2 y MMP9.**

Se cultivaron células de fibroblastos humanos primarios en una placa de 24 pocillos (5\_104 células/pocillo). El medio se cambió durante 24 h con medio libre de suero que contenía rhTIMP-1 o cantidades crecientes de TIMP-1-GPI y se incubó durante 24, 48 y 72 h. Los sobrenadantes celulares se analizaron mediante zimografía con gelatina usando geles de SDS-poliacrilamida al 10 % (Invitrogen, Groningen, Países Bajos; N.º EC61755BOX) tal como se describe (Djafarzadeh et al., 2004). Se usó enzima MMP-9 recombinante (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia; N.º RPN2634) como control positivo.

**Figura 6. La movilización y proliferación de células mesoteliales se incrementa mediante TIMP-1-GPI.**

Se muestra el efecto de TIMP-1-GPI sobre una monocapa de células mesoteliales primarias humanas tal como se observa en microscopía óptica.

Un ensayo de cicatrización de heridas in vitro usando un sistema disponible en el mercado (Ibidi, Martinsried) se usó para ensayar el efecto del tratamiento con TIMP-1-GPI sobre la migración y la proliferación de células mesoteliales primarias humanas. En este ensayo, las células se cultivaron como una monocapa sobre plástico usando una cámara de heridas Ibidi. Cuando la cámara se retiró, esto causó la generación de una herida uniforme en la monocapa de células mesoteliales. La "cicatrización" de esta herida se observó a continuación durante 48 horas. Los resultados muestran que el tratamiento con vehículo o TIMP-1 de control no causa un cierre de heridas mejorado. En contraste, TIMP-1-GPI a 14 ng/ml muestra un cierre pronunciado a las 24 horas después del tratamiento. Cuanto más elevada sea la concentración de TIMP-1-GPI, más rápido se cierra la "herida" (la "herida" es claramente visible a la hora 0).

**EJEMPLOS****Ejemplo 1****Efecto de TIMP-1-GPI sobre la cicatrización de heridas *in vivo***

Para determinar el efecto de TIMP-GPI sobre la cicatrización de heridas in vivo, se empleó un modelo de heridas por escisión murino. Se anestesiaron ratones C57BL/6 con ketavet (100 mg/kg de peso corporal de ratón) y xilazina (5 mg/kg de peso corporal de ratón) seguida por premedicación con sulfato atropina.

Después de que la superficie dorsal de cada ratón se había desinfectado con un hisopo con alcohol, una herida por escisión de grosor completo (0,8 cm de diámetro) se creó en la espalda dorso-medial de cada animal, usando un punzón de biopsia cutánea estándar (Stiefel® Laboratorium GmbH, Alemania). Inmediatamente después de la cirugía, así como los días 3, 5 y 7 seguidamente, tampón rhTIMP-1, o rhTIMP-1, o TIMP-1-GPI en una cantidad que era suficiente para cubrir la herida, generalmente entre 50 y 200 µl, se aplicaron encima de la herida creada.

La medición del tamaño de la herida se realizó los días 0, 3, 5, 7 y 10. El área de la herida (mm<sup>2</sup>) se calculó, usando la fórmula de una elipse, la tasa de cierre de la herida se expresó como una relación del área herida en cada punto temporal dividida por el área de la herida original a tiempo 0. Ésta es una fórmula que puede usarse durante toda la

aplicación para determinar la tasa de cierre de la herida. El día 14 posoperatorio, los animales se sacrificaron. Los resultados se presentan en la figura 1.

5 El área de la herida y la tasa de cierre de la herida se expresan como la media  $\pm$  SD. Los datos se analizaron usando el test t de Student para datos emparejados. Los análisis se computaron usando el paquete estadístico en Microcal Origin versión 6.0 (Microcal Software, MA, Estados Unidos) con  $p < 0,05$  considerado como significativo.

10 Los resultados demuestran una tasa de cierre de la herida significativamente acelerada el día tres después del inicio del tratamiento con TIMP-1-GPI en un modelo en ratón. Esto se demostró mediante la medición del volumen de la herida así como el porcentaje de cierre de la herida (figura 1). En ensayos *in vitro*, se descubrió que la aplicación de TIMP-1 anclado a GPI induce proliferación y movilización de queratinocitos, causando una cicatrización de heridas más rápida (figura 2). El cierre completo se observa con 12 ng/ml a las 48 h.

15 Esto es contrario a lo que se describió previamente para fibroblastos dérmicos donde el tratamiento suprimía la proliferación, la migración y la activación (véase el documento WO2007039109).

## Ejemplo 2

### 20 La movilización y proliferación de queratinocitos dérmicos se incrementa mediante TIMP-1-GPI

En heridas dérmicas, después de la respuesta inflamatoria, se requiere movilización de queratinocitos, dado que las células migran al interior de la herida para iniciar el cierre. Se usó un modelo de cicatrización de heridas *in vitro* para estudiar el efecto de TIMP-1-GPI sobre la actividad de queratinocitos. Una monocapa de queratinocitos humanos primarios se cultivó en un inserto proporcionado por Ibidi (Múnich, Alemania). La retirada del inserto proporcionó una "herida" uniforme a la monocapa. El cierre de la herida se determinó a continuación en el contexto de tratamiento con TIMP durante tres días (figura 3). El tratamiento con niveles crecientes de TIMP-1-GPI causó el rápido cierre de la herida. rhTIMP-1 de control, TIMP-1-GPI desnaturalizado o fosfatidilinositol no tenían ningún efecto significativo sobre el cierre de la herida. En paralelo, se descubrió que el tratamiento incrementa de manera dependiente de la dosis, la proliferación de queratinocitos.

## 30 Ejemplo 3

### 35 El tratamiento con TIMP-1-GPI incrementaba la proliferación y migración de células mesoteliales primarias humanas, sugiriendo que éste mostrará eficacia en la reparación mesotelial

El mesotelio es un revestimiento epitelial plano de las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica. Proporciona una superficie deslizante, no adhesiva, y regula el tráfico de moléculas y células entre la circulación y estos compartimentos corporales. Dada su ubicación estratégica, es probable que el revestimiento mesotelial participe activamente en la regulación del tráfico de leucocitos entre la circulación, el fluido peritoneal y las paredes de la cavidad peritoneal.

45 El mesotelio peritoneal ha estado implicado en el desarrollo a largo plazo de fallo de ultrafiltración en pacientes de diálisis peritoneal. La presencia de concentraciones de glucosa supra-fisiológica, acidez y productos de degradación de glucosa en fluidos de diálisis peritoneal contribuyen a la fibrosis del mesotelio peritoneal, mediante transición epitelial-mesenquimática o proliferación incrementada de fibroblastos existentes. Un peritoneo fibrosado da como resultado el paso incrementado de solutos a través del peritoneo y fallo de ultrafiltración. Hemos demostrado previamente que el tratamiento con TIMP-1-GPI puede reducir la activación, proliferación y migración de fibroblastos. Similar a lo que se mostró anteriormente para queratinocitos dérmicos, y al contrario a lo que se mostró para los fibroblastos, se descubrió que el tratamiento de células mesoteliales primarias humanas con TIMP-1-GPI estimula su proliferación, sugiriendo que TIMP-1-GPI puede ayudar a reparar el mesotelio dañado (figura 4).

50 El tratamiento de células mesoteliales con TIMP-1-GPI causa una estimulación dependiente de la dosis de la proliferación. Esto es contrario a lo que se descubrió para fibroblastos activados. Las células mesoteliales ( $30 \times 10^3/100 \mu\text{l}$  de medio) se cultivaron en placa de microvaloración de 96 pocillos durante 24 h en condiciones estándar para producir células fijadas firmemente y de crecimiento estable. Después de desechar los sobrenadantes,  $50 \mu\text{l}$  de medio que contenía TIMP-1-GPI, tampón, o rhTIMP-1 se añadieron a las células y se incubaron durante de 24 a 72 h. A continuación, se añadieron  $50 \mu\text{l}$  de una solución 1 mg/ml de (bromuro de 3,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) MTT (SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, Alemania N.º M2128). Después de 3 h de incubación a 37 °C, los cristales de formazán se disolvieron mediante la adición de  $100 \mu\text{l}$  de isopropanol y HCl 0,04 N. A continuación se midió la absorbancia a 590 nm usando el lector de ELISA GENios plus TECAN. Para cada experimento se analizaron al menos 6 pocillos por condición experimental y punto temporal (figura 4).

## Ejemplo 4

### 65 Zimografía

El tratamiento de células mesoteliales con cantidades crecientes de TIMP-1-GPI causó a un bloqueo dependiente de la dosis de la secreción de MMP2 y MMP9 en el medio de cultivo.

Las células mesoteliales se cultivaron en placas de 24 pocillos (5 x 10<sup>4</sup> células/pocillo). El medio se intercambiaba durante 24 h con medio libre de suero que contenía rhTIMP-1, u otros controles y cantidades crecientes de TIMP-1-GPI y se incubaron durante 24 h, 48 h y 72 h. Los sobrenadantes celulares se analizaron mediante zimografía en gelatina usando geles de SDS-poliacrilamida al 10 % (Invitrogen, Groningen, Países Bajos, N.º EC61755BOX) tal como se describe (Djafarzadeh, 2004). Se usó enzima MMP-9 recombinante (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia, N.º RPN2634) como control positivo (figura 5).

## Ejemplo 5

### Cicatrización de heridas in vitro

En la reparación del mesotelio, después de la respuesta inflamatoria, se requiere migración mesotelial. Se usó un modelo de cicatrización de heridas in vitro para estudiar el efecto de TIMP-1-GPI sobre la actividad mesotelial. Una monocapa de células mesoteliales primarias humanas se cultivó en un inserto proporcionado por Ibidi (Múnich, Alemania). La retirada del inserto produjo una "herida" uniforme a la monocapa. El cierre de la herida se determinó a continuación en el contexto del tratamiento con TIMP durante 46 h.

El tratamiento con niveles crecientes de TIMP-1-GPI causó el rápido cierre de la herida (figura 6).

### Materiales y métodos

#### Reactivos celulares y cultivo tisular

Queratinocitos humanos primarios y células de fibroblastos dérmicos humanos primarios se obtuvieron de PromoCell (Heidelberg, Alemania N.º C-12300) se cultivaron según las instrucciones de las compañías.

#### Purificación de proteína TIMP-1-GPI

La proteína TIMP-1-GPI se produjo y se purificó tal como se ha descrito anteriormente (Djafarzadeh, *et al.* 2004). En resumen, se clonó TIMP-1 humano a partir de ADNc usando cebadores específicos de hTIMP-1, fusionados sin un codón de terminación de la traducción a la secuencia señal de GPI clonada a partir de LFA-3 (Kirby *et al.*, 1995; Medof *et al.*, 1996) y subclonada en pEF-DHFR e introducida de forma estable en células de ovario de hámster chino (CHO) deficientes en DHFR y se seleccionaron tal como se describe (Mack *et al.*, 1995). La proteína de fusión TIMP-1-GPI se purificó a partir de las células de CHO mediante extracción con detergente Triton X-100 seguida por purificación en columna usando DEAE, heparina sefrosa y exclusión molecular (Djafarzadeh *et al.*, 2004).

#### ELISA para TIMP-1

Se usó un ELISA específico de TIMP-1 humano usando el protocolo aplicado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MAB970, R&D Systems) para monitorizar niveles de TIMP-1 en solución. El mAB anti-TIMP-1 humano de revestimiento (MAB970), el mAB de detección anti-TIMP-1 humano biotinilado (BAF970) y la proteína rhTIMP-1 (970-TM) se adquirieron de R&D Systems GmbH (Wiesbaden, Alemania).

#### Escisión del anclaje de GPI mediante fosfolipasa C

Se incubaron células (5-10 x 10<sup>6</sup> células/ml) con 200 o 700 ng de TIMP-1-GPI o proteína rhTIMP-1 en medio libre de suero durante 1 h a 37 °C mediante CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron a continuación tres veces con PBS frío y se trataron con 60 ng/ml de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, Alemania N.º 661-9) en medio libre de suero durante 30 minutos a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron tres veces, se recogieron todos los sobrenadantes.

#### Proliferación

Queratinocitos primarios y células mesoteliales (30 x 10<sup>3</sup>/100 µl de medio) se cultivaron en placas de microvaloración de 96 pocillos durante 24 h en condiciones estándar para dar células fijadas firmemente y de crecimiento estable. Después de desechar los sobrenadantes, 50 µl de medio que contenía TIMP-1-GPI, tampón, o rhTIMP-1 se añadieron a las células y se incubaron durante de 24 a 72 h. A continuación, 50 µl de una solución 1 mg/ml de (bromuro de 3,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) MTT (SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, Alemania N.º M2128) se añadieron. Después de 3 h de incubación a 37 °C, los cristales de formazán se disolvieron mediante la adición de 100 µl de isopropanol y HCl 0,04 N. A continuación se midió la absorbancia a 550 nm usando un lector de ELISA GENios plus TECAN. Para cada experimento al menos 3 pocillos se analizaron por condición experimental y punto temporal.

**Zimografía**

Células mesoteliales se cultivaron en placas de 24 pocillos ( $5 \times 10^4$  células/pocillo). El medio se intercambió durante 24 h con medio libre de suero que contiene rhTIMP-1 o cantidades crecientes de TIMP-1-GPI y se incubó durante 24 h, 48 h y 72 h. Los sobrenadantes celulares se analizaron mediante zimografía en gelatina usando geles de SDS-poliacrilamida al 10 % (Invitrogen, Groningen, Países bajos, N.º EC61755BOX) tal como se describe (Djafarzadeh *et al.*, 2004). Se usó enzima MMP-9 recombinante (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia, N.º RPN2634) como control positivo.

**Transferencia de Western**

Se usó transferencia de Western para la detección de MMP en medios de cultivo libres de suero. Los anticuerpos anti-MMP usados se han descrito anteriormente (análisis FACS). Los patrones de transferencia de Western para MMP humano recombinante se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, Estados Unidos) e incluían; MMP-1 (WBC024), MMP-2 (WBC025), MMP-3 (WBC015), MMP-8 (WBC017), MMP-12 (WBC019) y MMP-13 (WBC020). También se usó transferencia de Western para la detección de BCL-2, BAX (véase anteriormente para los mAb) y  $\beta$ -actina (Acris Hiddenhausen, Alemania, N.º ab8227). Todas las proteínas se detectaron usando un kit de análisis de transferencia de Western comercial, sistema de inmunodetección por quimioluminiscencia (*Chemiluminescent Immunodetection System*) (Invitrogen, Groningen, Países Bajos).

**REFERENCIAS**

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ahonen, M., Poukkula, M., Baker, A.H., Kashiwagi, M., Nagase, H., Eriksson, J.E. y Kahari, V.M. (2003). *Oncogene*, 22, 2121-34.
- Baker, A.H., George, S.J., Zaltsman, A.B., Murphy, G. y Newby, A.C. (1999). *BrJCancer*, 79, 1347-55.
- Baker, A.H., Zaltsman, A.B., George, S.J. y Newby, A.C. (1998). *JClin Invest*, 101, 1478-87. Barnstable, C.J., Jones, E.A. y Crumpton, M.J. (1978). *BrMedBull*, 34, 241-6.
- Bigda, J., Beletsky, I., Brakebusch, C., Varfolomeev, Y., Engelmann, H., Holtmann, H. y Wallach, D. (1994). *JExpMed*, 180, 445-60.
- Bloomston, M., Shafii, A., Zervos, E.E. y Rosemurgy, A.S. (2002). *JSurgRes*, 102, 39-44. Bode, W. y Maskos, K. (2003). *BiolChem*, 384, 863-72.
- Bond, M., Murphy, G., Bennett, M.R., Newby, A.C. y Baker, A.H. (2002). *JBiol Chem*, 277, 13787-95.
- Brand, K. (2002). *Curr Gene Ther*, 2, 255-71.
- Brew, K., Dinakarandian, D. y Nagase, H. (2000). *Biochim Biophys Acta*, 1477, 267-83.
- Brown, O., Cowen, R.L., Preston, C.M., Castro, M.G. y Lowenstein, P.R. (2000). *Gene Ther*, 7, 1947-53.
- Djafarzadeh, R., Mojaat, A., Vicente, A.B., von Lutichau, I. y Nelson, P.J. (2004). *Biol Chem*, 385, 655-63.
- Dunn, G.P., Old, L.J. y Schreiber, R.D. (2004). *Annu Rev Immunol*, 22, 329-60.
- Egeblad, M. y Werb, Z. (2002). *Nat Rev Cancer*, 2, 161-74.
- Frost, P., Caliliw, R., Beldegrun, A. y Bonavida, B. (2003). *IntJ Oncol*, 22, 431-7.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. y Parks, W.P. (1973). *JNatl CancerInst*, 51, 1417-23.
- Gong, J.H., Maki, G. y Klingemann, H.G. (1994). *Leukemia*, 8, 652-8.
- Hemmerlein, B., Johanns, U., Halbfass, J., Bottcher, T., Heuser, M., Radzun, H.J. y Thelen, P. (2004). *IntJ Oncol*, 24, 1069-76.
- Igney, F.H. y Krammer, P.H. (2002). *Nat Rev Cancer*, 2, 277-88.
- Itoh, Y. y Nagase, H. (2002). *Essays Biochem*, 38, 21-36.
- Johnson, J.P., Stade, B.G., Hupke, U., Holzmann, B. y Riethmuller, G. (1988). *Immunobiology*, 178, 275-84.
- Kagi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Burki, K., Depraetere, V., Nagata, S., Hengartner, H. y Golstein, P. (1994). *Science*, 265, 528-30.
- Kirby, A.C., Hill, V., Olsen, I. y Porter, S.R. (1995). *Biochem Biophys Res Commun*, 214, 200-5.
- Klier, C.M., Nelson, E.L., Cohen, C.D., Horuk, R., Schlondorff, D. y Nelson, P.J. (2001). *Biol Chem*, 382, 1405-10.
- Lang, R., Braun, M., Sounni, N.E., Noel, A., Frankenne, F., Foidart, J.M., Bode, W. y Maskos, K. (2004). *JMolBiol*, 336, 213-25.
- Maskos K. y Bode W. (2003) *Mol Biotechnol* 25: 241-266.
- Mack, M., Riethmuller, G. y Kufer, P. (1995). *Proc NatlAcadSci Estados Unidos*, 92, 7021-5.
- Majid, M.A., Smith, V.A., Easty, D.L., Baker, A.H. y Newby, A.C. (2002). *BrJ Ophthalmol*, 86, 97-101.
- Mannello F., Gazzanelli, G. (2001), *Apoptosis*, 6(6): 479-82.
- Medof, M.E., Nagarajan, S. y Tykocinski, M.L. (1996). *FASeb J*, 10, 574-86.
- Milani, V., Frankenberger, B., Heinz, O., Brandl, A., Ruhland, S., Issels, R.D. y Noessner, E. (2005). *Int Immunol*.
- Moniaux N., Adrianifahanana M., Brand R.E., Batra S.K. (2004), *British Journal of Cancer*, 91, 1633-1638
- Nagase, H. y Woessner, J.F., Jr. (1999). *JBiolChem*, 274, 21491-4.
- Nagata, S. (1999). *Annu Rev Genet*, 33, 29-55. Parham, P. y Brodsky, F.M. (1981). *Hum Immunol*, 3, 277-99.
- Rigg, A.S. y Lemoine, N.R. (2001). *Cancer Gene Ther*, 8, 869-78.
- Pearson WR y Lipman DJ. (1988). *Proc Natl Acad Sci Estados Unidos* 85: 2444-2448 Robertson, M.J., Cochran,

K.J., Cameron, C., Le, J.M., Tantravahi, R. y Ritz, J. (1996). *Exp Hematol*, 24, 406-15.  
 Sayers, T.J., Brooks, A.D., Lee, J.K., Fenton, R.G., Komschlies, K.L., Wigginton, J.M., Winkler-Pickett, R. y Wiltrout, R.H. (1998). *J Immunol*, 161, 3957-65.  
 5 Schendel, D.J., Frankenberger, B., Jantzer, P., Cayeux, S., Noessner, E., Willimsky, G., Maget, B., Pohla, H. y Blankenstein, T. (2000). *Gene Ther*, 7, 2007-14.  
 Schendel, D.J., Gansbacher, B., Oberneder, R., Kriegmair, M., Hofstetter, A., Riethmuller, G. y Segurado, O.G. (1993). *J Immunol*, 151, 4209-20.  
 Schendel, D.J., Oberneder, R., Falk, C.S., Jantzer, P., Kressenstein, S., Maget, B., Hofstetter, A., Riethmuller, G. y Noessner, E. (1997). *JMolMed*, 75, 400-13.  
 10 Seki, N., Brooks, A.D., Carter, C.R., Back, T.C., Parsonault, E.M., Smyth, M.J., Wiltrout, R.H. y Sayers, T.J. (2002). *J Immunol*, 168, 3484-92.  
 Singer A. y Clark R. (1999). *N. Engl. J. Med.*, 341, 738-746.  
 Smith, M.R., Kung, H., Durum, S.K., Colburn, N.H. y Sun, Y. (1997). *Cytokine*, 9, 770-80.  
 15 Span, P.N., Lindberg, R.L., Manders, P., Tjan-Heijnen, V.C., Heuvel, J.J., Beex, L.V. y Sweep, C.G. (2004). *JPathol*, 202, 395-402.  
 Trapani, J.A., Davis, J., Sutton, V.R. y Smyth, M.J. (2000). *Curr Opin Immunol*, 12, 323-9. Vogelzang, N.J. y Stadler, W.M. (1998). *Lancet*, 352, 1691-6.  
 Zacchigna, S., Zentilin, L., Morini, M., Dell'Eva, R., Noonan, D.M., Albini, A. y Giacca, M. (2004). *Cancer Gene Ther*, 11, 73-80.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Nelson, Peter Jon Ludwig-Maximilians-Universitat München
- 25 <120> Aceleración de la cicatrización de heridas mediante un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) unido a anclajes de glucosilfosfatidilinositol (GPI)
- <130> 109-005P
- 30 <150> EP09014652.3  
<151> 24-11-2009
- <160> 3
- 35 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1  
<211> 582  
<212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> TIMP-1 truncado humano fusionado con secuencia de GPI
- 45 <400> 1

ES 2 576 833 T3

```

gaattcatgg ccccccttga gcccctggct tctggcatcc tgttgttgcg gtggttgata      60
gccccagca gggcctgcac ctgtgtccca ccccaccac agacggcctt ctgcaattcc      120
gacctcgtca tcagggccaa gttcgtgggg acaccagaag tcaaccagac caccttatac      180
cagcgttatg agatcaagat gaccaagatg tataaagggt tccaagcctt aggggatgcc      240
gctgacatcc ggttcgtcta ccccccgcc atggagagtg tctgcggata ctccacagg      300
tcccacaacc gcagcgagga gtttctcatt gctggaaaac tgcaggatgg actcttgcac      360
atcactacct gcagtttgt ggctccctgg aacagcctga gcttagctca ggcggggggc      420
ttaccaaga cctacactgt tggtgtgag gaatgcacag tgtctagaac aacctgtate      480
ccaagcagcg gtcattcaag acacagatat gcacttatac ccataccatt agcagtaatt      540
acaacatgta ttgtgctgta tatgaatgta ttatgagtcg ac                          582

```

5 <210> 2  
 <211> 599  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> TIMP-2 humano fusionado con secuencia de GPI  
 <400> 2

```

gaattcatgg caaccctaga gaggatccag tatgagatca agcagataaa gatggtcaaa      60
gggcctgaga aggatataga gtttatctac acggccccct cctcggcagt gtgtggggtc      120
tcgctggacg ttggaggaaa gaaggaatat ctcatcgcag gaaaggccga gggggacggc      180
aagatgcaca tcaccctctg tgacttcatc gtgccctggg acaccctgag caccaccag      240
aagaagagcc tgaaccacag gtaccagatg ggctgcgagt gcaagatcac gcgctgcccc      300
atgatcccg tctacatctc ctccccggac gagtgcctct ggatggactg ggtcacagag      360
aagaacatca acgggcacca ggccaagttc ttgcctgca tcaagagaag tgacggctcc      420
tgtgctggt accgcggcgc ggcgcccccc aagcaggagt ttctcgacat cgaggacca      480
tctagaacaa cctgtatccc aagcagcggc cattcaagac acagatatgc acttataccc      540
ataccattag cagtaattac aacatgtatt gtgctgtata tgaatgtatt atagtcgac      599

```

15 <210> 3  
 <211> 758  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> TIMP-3 mutado humano fusionado con secuencia de GPI  
 <400> 3

ES 2 576 833 T3

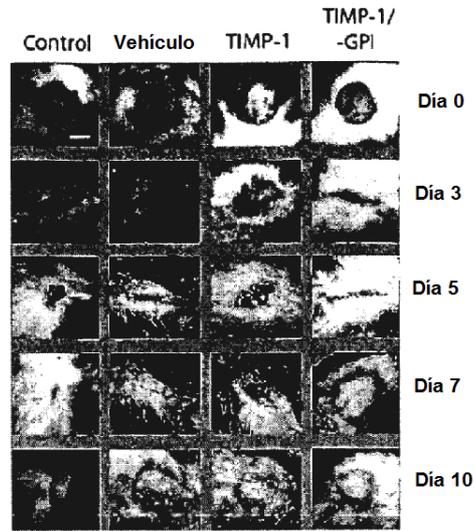
gaattcatga ccccttggct cgggctcatc gtgctcctgg gcagctggag cctgggggac	60
tggggcgccg aggcgtgcac atgctcgccc agccaccccc aggacgcctt ctgcaactcc	120
gacatcgtga tcgcggccgc ggtggtgggg gcgaagctgg tagcggaggg gcccttcggc	180
acgctggtct acaccatcgc gcagatggcg atgtaccgag gcttcaccaa gatgccccat	240
gtgcagtaca tccatacggg agcttccgag agtctctgtg gccttaagct ggaggccaac	300
aagtaccagt acctgctgac aggtcgcgctc tatgatggca agatgtacac ggggctgtgc	360
aacttcgtgg agagggtggg ccagctcacc ctctcccagc gcaaggggct gaactatcgg	420
tatcacctgg gttgtaactg caagatcaag tctgctact acctgccttg ctttgtgact	480
tccaagaacg agtgtctctg gaccgacatg ctctccaatt tcggttacc tggctaccag	540
tccaaacact acgcctgcat ccggcagaag ggcggctact gcagctggta ccgaggatgg	600
gcccccccg ataaaagcat catcaatgcc acagaccct ctagaacaac ctgtatccca	660
agcagcggtc attcaagaca cagatatgca cttataccca taccattagc agtaattaca	720
acatgtattg tgctgtatat gaatgtatta tagtcgac	758

## REIVINDICACIONES

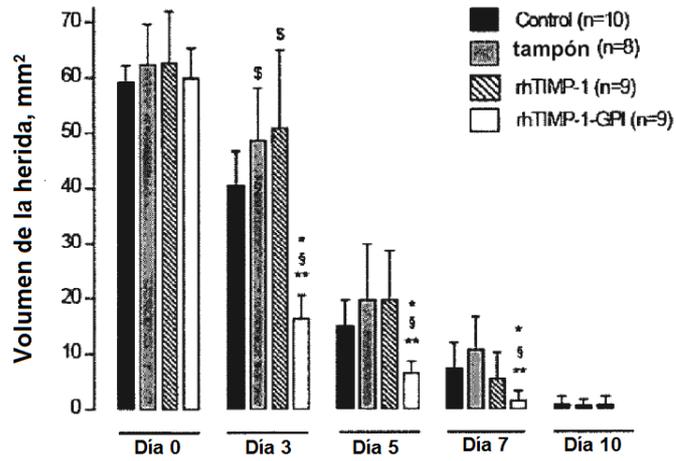
- 5 1. Una construcción de fusión, que comprende una secuencia de aminoácidos de un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) o un fragmento biológicamente activo del mismo que inhibe las metaloproteinasas de la matriz activas, en donde dichos TIMP o fragmento biológicamente activo del mismo están unidos a un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI), para acelerar el tratamiento para el cierre de heridas activando la proliferación y la migración de queratinocitos dérmicos, o para efectuar la proliferación y la movilización de queratinocitos y/o de células mesoteliales en heridas.
- 10 2. La construcción de fusión para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho TIMP se selecciona entre el grupo que consiste en TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4.
- 15 3. La construcción de fusión para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, en la que dicho TIMP es TIMP humano.
4. La construcción de fusión para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, en donde dicha construcción de fusión contiene una o más secuencias señal de GPI para dirigir el anclaje de GPI.
- 20 5. La construcción de fusión para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que dicho anclaje de GPI se deriva del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-3), o una parte del mismo.
6. La construcción de fusión para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en donde dicha construcción de fusión se administrará a una concentración de 0,005 a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , preferentemente de 0,005 a 0,015  $\mu\text{g/ml}$ .
- 25 7. La construcción de fusión para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en donde la construcción de fusión está comprendida en una composición farmacéutica que se usa junto con una sustancia detergente, sellante o portadora.
- 30 8. Un método *in vitro* para ensayar la eficacia de construcciones de TIMP, comprendiendo el método añadir a queratinocitos primarios o células mesoteliales en cultivo una construcción de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) o un fragmento biológicamente activo del mismo que inhibe las metaloproteinasas de la matriz activas, en donde dicho TIMP o fragmento biológicamente activo del mismo está unido a un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI) y medir la movilización de dichas células.
- 35 9. El método de la reivindicación 8, en el que dicho TIMP se selecciona entre el grupo que consiste en TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 o TIMP-4.
- 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 9, en el que dicho TIMP es TIMP-1 humano.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 10, en el que dicha construcción de fusión contiene una o más secuencias señal de GPI para dirigir el anclaje de GPI.
- 45 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 11, en el que dicho anclaje de GPI se deriva del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA-3), o una parte del mismo.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 12, en el que dicha construcción de fusión se administrará a una concentración de 0,005 a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , preferentemente de 0,005 a 0,015  $\mu\text{g/ml}$ .
- 50 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 - 13, en el que la construcción de fusión está comprendida en una composición farmacéutica que se usa junto con una sustancia detergente, sellante o portadora.
- 55 15. Una composición farmacéutica que comprende de 0,005 a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , preferentemente de 0,005 a 0,015  $\mu\text{g/ml}$  de un inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) o un fragmento biológicamente activo del mismo que inhibe las metaloproteinasas de la matriz activas, en donde dichos TIMP o fragmento biológicamente activo del mismo están unidos a un anclaje de glucosilfosfatidilinositol (GPI).

Fig. 1

a



b



c

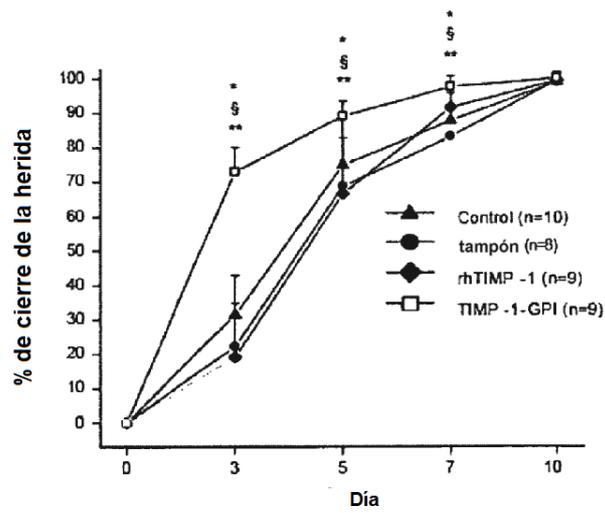
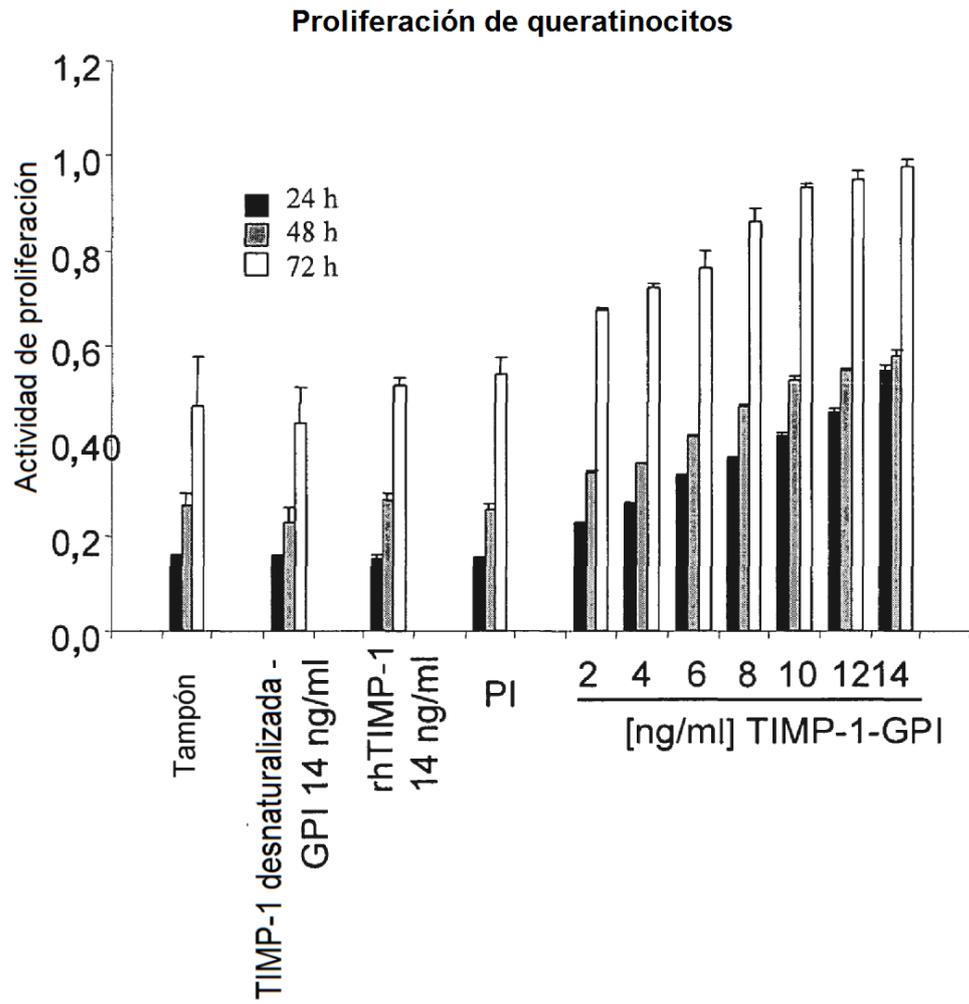


Fig. 2



**Fig. 3**

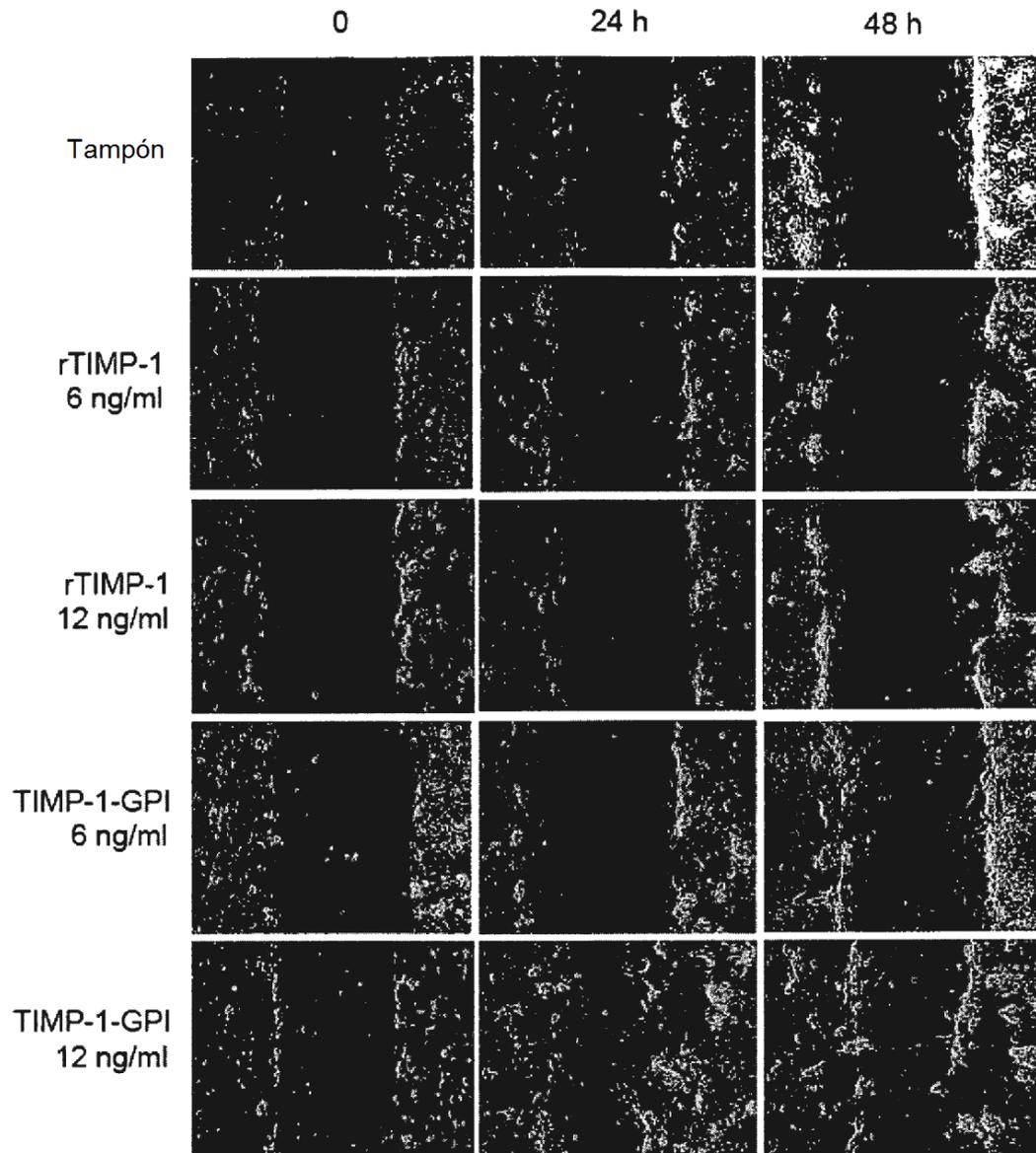
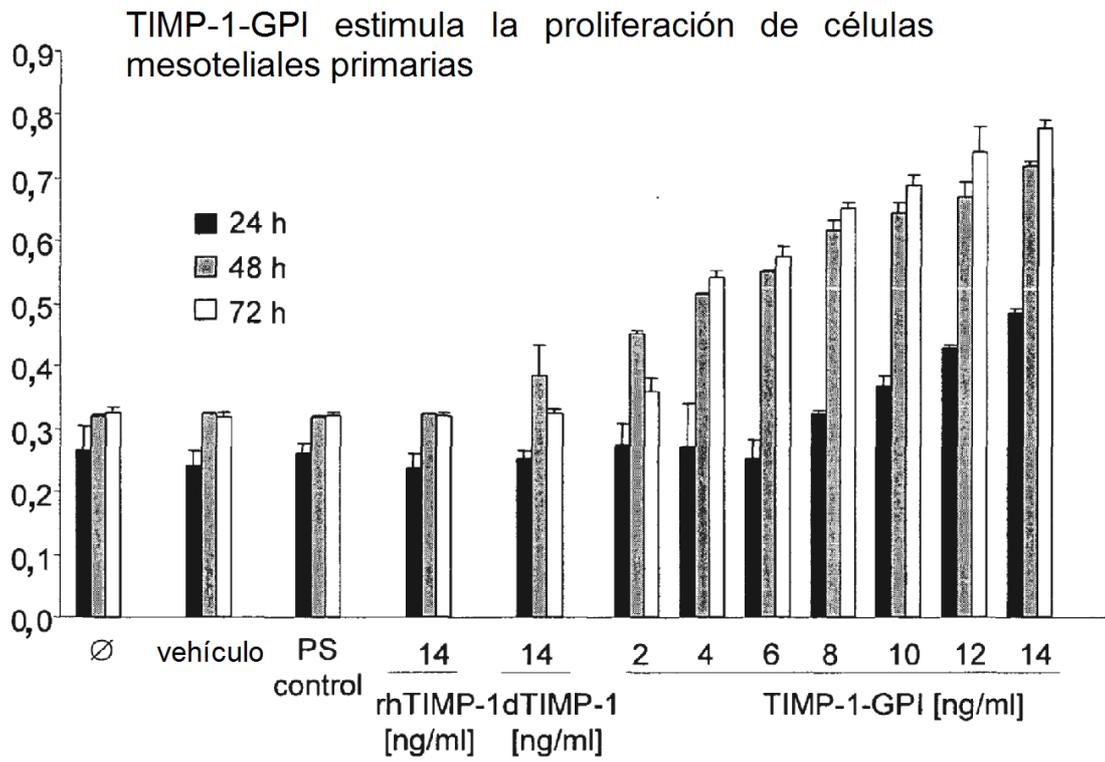


Fig. 4



**Fig. 5**

TIMP-1-GPI bloquea la secreción de MMP2 y MMP9 por células mesoteliales primarias

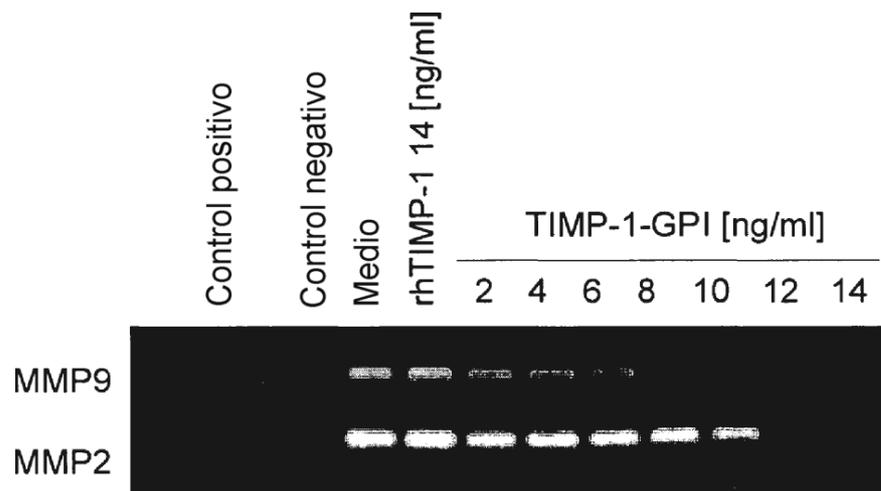


Fig. 6

