

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 938**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)  
**A61L 27/22** (2006.01)  
**C07K 14/50** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**C07K 14/65** (2006.01)  
**A61K 38/39** (2006.01)  
**C07K 14/485** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2010 PCT/AU2010/001613**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO2011063477**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2010 E 10832439 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2507261**

54 Título: **Quimeras de fibronectina: factor de crecimiento**

30 Prioridad:

**30.11.2009 US 627647**  
**03.06.2010 US 793386**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.06.2017**

73 Titular/es:

**FACTOR THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)**  
**Level 19, 179 Turbot Street**  
**Brisbane, QLD, AU**

72 Inventor/es:

**UPTON, ZEE y**  
**VAN LONKHUYZEN, DEREK**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 619 938 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

Quimeras de fibronectina: factor de crecimiento

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a complejos proteicos que tienen dominios respectivos que permiten la unión a y la activación tanto de un receptor del factor de crecimiento como de un receptor de la integrina para la fibronectina. En realizaciones particulares, esta invención se refiere a proteínas quiméricas que comprenden factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), el factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o los dominios de unión al receptor del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) y un dominio de unión al receptor de la integrina de la fibronectina (FN). Más particularmente, esta invención se refiere a complejos proteicos que estimulan la migración celular y a composiciones y métodos que promueven o inducen la migración y/o proliferación celular. Estas composiciones y métodos tienen uso en la curación de heridas, ingeniería de tejidos, tratamientos cosméticos y terapéuticos tales como el reemplazo de piel y la reposición de la piel y el tratamiento de quemaduras donde se requiere la migración y/o proliferación de células epiteliales. En otras realizaciones, la invención proporciona el tratamiento proporcionado por la presente invención relacionado con la prevención o inhibición de las metástasis de células cancerosas, particularmente en relación con el cáncer de mama.

## 20 Antecedentes de la invención

Se conocen varios factores de crecimiento peptídicos implicados en una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo la hiperplasia, la síntesis de ADN, la diferenciación, la progresión del ciclo celular y la inhibición de la apoptosis e incluyen los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, p.ej., IGF-I e IGF-II) (Jones & Clemmons, 1995, *Endocrine Rev.* 16 3; Wood & Yee, 2000, *J. Mammary Gland Biology and Neoplasia* 5 1), EGF (Heldin et al., 1981, *Science* 4 1 122), bFGF (Taraboletti et al., 1997, *Cell Growth. Differ.* 8 471), and KGF (Marchese et al., 1990, *J. Cell Physiol.* 144 326). Estos efectos están mediados a través de la unión a sus receptores de superficie celular unidos a tirosina-quinasa afines, el receptor de IGF tipo 1 (IGF-IR), el receptor de EGF, el receptor de bFGF y el receptor de KGF, respectivamente. El IGF también están estrictamente regulado por una familia de proteínas de unión específicas, denominadas IGFBP, cuya función principal es la de unir los IGF libres y con ello moderar su semivida, especificidad y actividad (Clemmons, 1998, *Mol. Cell. Endocrinol.* 140 19).

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva de alta masa molecular que se encuentra en todos los vertebrados. La fibronectina desempeña un papel en la adhesión celular, la morfología celular y la arquitectura de la superficie. Su función principal parece ser su participación en la migración celular durante el desarrollo, reparación de tejidos y cicatrización de heridas, regulación del crecimiento celular y diferenciación (Alitalo & Vaheri, 1982, *Adv. Cancer Res.* 37 1 1 1; Yamada, 1983, *Annu. Rev. Biochem.* 62 761; Hynes, 1985, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1 67). El polimorfismo de la fibronectina se debe a patrones de corte y empalme alternativos en tres regiones (ED-A, ED-B y IIICS) del único transcrito primario de la fibronectina (Petersen et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 137; Schwarzbauer et al., 1983, *Cell* 35 421; Kombliht et al., 1984, *Nucleic Acids Res.* 12 5853). La composición exacta de fibronectina depende del tipo de tejido y/o de las condiciones celulares. En los seres humanos, hay potencialmente 20 formas diferentes de fibronectina, la mayor parte derivadas de corte y empalme alternativo de alguno de los 3 tipos de módulos (Potts y Campbell, 1994, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6648). La expresión de las variantes de corte y empalme de la fibronectina parece estar regulada en el desarrollo y es específica del tejido

La fibronectina tiene la capacidad de unir diversas moléculas extracelulares, que incluyen heparina, colágeno y ácido hialurónico. La fibronectina organiza las interacciones célula-célula y la interacción celular con la matriz extracelular mediante la unión a los diferentes componentes de la matriz extracelular y a los receptores de fibronectina unidos a la membrana (integrinas) en las superficies celulares.

Sin embargo, las contribuciones relativas de los factores de crecimiento y la fibronectina, y sus respectivos dominios, presentes en los complejos proteicos, en términos de la estimulación de respuestas biológicas tales como la migración y/o la proliferación celular, siguen siendo difíciles de determinar.

## 55 Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que los complejos proteicos en forma de quimeras sintéticas que comprenden factores de crecimiento tales como IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF y FN estimulan la migración y/o la proliferación celular mediante la unión y co-activación sinérgica de receptores de los factores de crecimiento y receptores de integrina de unión a FN afines.

Por lo tanto, la invención se refiere en general a complejos proteicos aislados que comprenden un dominio de unión a un receptor de un dominio de un factor de crecimiento y por lo menos un dominio de fibronectina que es capaz de unirse a un receptor de integrina, en el que el complejo proteico aislado puede co-activar el receptor del factor de crecimiento y de la integrina y para provocar de esta manera una respuesta biológica.

En un primer aspecto, la invención proporciona un complejo proteico aislado en forma de una proteína química sintética que comprende una secuencia de aminoácidos de:

- (i) un factor de crecimiento, o al menos un dominio de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor del factor de crecimiento afín; y
- (ii) uno o más dominios de tipo III de FN, en el que uno o más dominios de tipo III de FN consiste en los aminoácidos 1266-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1447-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1173-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde uno o más dominios de tipo III de FN comprenden un dominio de unión a integrina.

Preferentemente, de acuerdo con los aspectos antes mencionados el factor de crecimiento es IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF.

Preferentemente, el dominio de unión a integrina es un dominio de unión a la integrina  $\alpha_1$  o un dominio de unión a la integrina  $\alpha_4$ .

Este aspecto de la invención también contempla una secuencia de aminoácidos de uno o más fragmentos de fibronectina adicionales en la proteína química sintética.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el complejo proteico aislado del primer aspecto.

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

Preferentemente, la construcción genética es una construcción de expresión.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende la construcción genética del tercer aspecto.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el complejo proteico aislado del primer aspecto y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Este aspecto de la invención puede comprender la célula hospedadora del cuarto aspecto, célula que expresa dicha proteína(s) sintética.

En un sexto aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para promover la migración celular que incluye la etapa de utilizar una proteína sintética para unirse tanto a un receptor del factor de crecimiento como a un receptor de la integrina.

Preferentemente, el receptor del factor de crecimiento es IGF-IR, el receptor de EGF, el receptor de bFGF o el receptor de KGF.

Preferentemente, el receptor de la integrina es una integrina  $\alpha_1$  o  $\alpha_4$ .

Dicha proteína sintética dicho es de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un complejo proteico aislado de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para su uso en la curación de heridas o quemaduras en un animal, preferentemente un ser humano.

Se apreciará también que el método del séptimo aspecto puede abarcar métodos de tratamiento profilácticos y terapéuticos.

En un octavo aspecto, la invención proporciona un biomaterial que comprende el complejo proteico aislado del primer aspecto.

En realizaciones particulares el biomaterial puede ser un implante quirúrgico, prótesis, andamio, apósito para heridas o quemaduras o similares adecuadamente impregnados, recubiertos o de otra manera que comprende un complejo proteico aislado de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de (A) fibronectina humana (SEQ ID NO: 1), (B) IGF-I maduro (SEQ ID NO: 2), (C) IGF-II maduro (SEQ ID NO: 3), (D) EGF maduro (SEQ ID NO: 4), (E) bFGF maduro (SEQ ID NO: 5), (F) KGF maduro (SEQ ID NO: 6) y (G) secuencias de enlace preferidas (SEQ ID NOs: 7- 12).

Figura 2. Los complejos proteicos de IGF-I, IGFBP y FN estimulan la migración de células de cáncer de mama. Las células MCF-10A fueron sembradas en soportes Transwell que habían sido recubiertos con FN (1 µg/ml) y concentraciones crecientes de IGF-I preunido en presencia de IGFBP-3 o 5. Se permitió la migración celular durante 5 horas. El número de células que atraviesan la membrana en respuesta a cada tratamiento se expresó como porcentaje de las que emigran sobre FN solamente (SFM). Los datos de MCF-10 se reúnen a partir de tres experimentos con tratamientos ensayados en cuatro pocillos en cada experimento repetido. Las barras de error indican el EEM. MSS = Medios sin suero.

Descripción detallada de la invención

La presente invención ha surgido del descubrimiento de que quimeras sintéticas que comprenden factores de crecimiento tales como IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF y FN se unen y ejercen su efecto biológico sobre la migración celular a través de sus receptores de factores de crecimiento afines y del receptor de integrina de unión a FN expresados por las células sensibles. Más particularmente, este suceso de unión doble estimula sinérgicamente la migración y/o proliferación celular. Estas moléculas quiméricas de cadena sencilla, biológicamente activas, estables comprenden al menos el dominio mínimo o región de un factor de crecimiento capaz de unirse a su receptor afín en combinación con uno o más dominios de tipo III de FN que comprenden al menos un dominio de unión a integrina de FN.

Este descubrimiento ha llevado a los presentes inventores a proporcionar un complejo proteico aislado que comprende al menos el dominio mínimo o región de IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF, por ejemplo, capaz de unirse a sus receptores afines, en combinación con el dominio de unión a integrina de FN. Aún más particularmente, se puede producir una única proteína contigua que comprende estos dominios.

Tales complejos proteicos, en forma de una única proteína sintética, unen o co-ligan coordinadamente sus receptores afines y el receptor de la integrina de unión a FN y por lo tanto son agentes útiles para promover la migración y/o la proliferación celular y la curación de heridas. Análogamente, se puede usar la prevención de la coligación del receptor de integrina de unión a FN para prevenir la metástasis de las células cancerosas.

A lo largo de toda esta memoria, a menos que se indique lo contrario, “comprende” y “que comprende” se utilizan en sentido amplio en vez de en sentido estricto, de modo que un número entero o un grupo de números enteros indicados pueden incluir uno o más de otros números enteros o grupos de enteros no indicados.

En el contexto particular de los dominios de unión al receptor del factor de crecimiento y dominios de unión a integrina, un dominio tal comprenderá una secuencia de aminoácidos del dominio, junto con otros aminoácidos, adicionales deseados.

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

Se entenderá también que un dominio de este tipo puede “consistir en” la secuencia de aminoácidos del dominio, en ausencia de cualquiera de los aminoácidos adicionales.

Para los fines de esta invención, por “aislado” se entiende material que ha sido retirado de su estado natural o de otra manera se ha sometido a manipulación humana. El material aislado puede estar sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural, o puede ser manipulado con el fin de estar en un estado artificial junto con los componentes que normalmente lo acompañan en su estado natural. El material aislado puede estar en forma nativa, de síntesis química o recombinante.

Tal como se usa en la presente memoria, por “sintético” se entiende que no ocurre de forma natural, pero que se realiza a través de la intervención técnica humana. En el contexto de las proteínas y ácidos nucleicos sintéticos, esto abarca moléculas producidas por técnicas recombinantes, de síntesis química o combinatorias como se conocen bien en la técnica.

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

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

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

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona, en un aspecto particular, un complejo proteico aislado en forma de una proteína quimérica sintética que comprende una secuencia de aminoácidos de:

(i) un factor de crecimiento, o al menos un dominio de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor del factor de crecimiento afín; y

(ii) uno o más dominios de tipo III de FN, en el que uno o más dominios de tipo III de FN consiste en los aminoácidos 1266-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1447-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1173-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde uno o más dominios de tipo III de FN comprenden un dominio de unión a integrina.

Como se usa en la presente memoria, una "proteína quimérica", comprende una secuencia contigua de aminoácidos, siendo los aminoácidos derivados de un dominio de unión al receptor de la integrina de fibronectina, opcionalmente, los dominios adicionales de la fibronectina, y un factor de crecimiento o al menos un dominio de unión al receptor de un factor de crecimiento.

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

Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a, IGF (Jones & Clemmons, 1995, Endocrine Rev. 16 3; Wood & Yee, 2000, J. Mammary Gland Biology and Neoplasia 5 1; Keiss et al., 1994, Hormone Research 41 66), tales como IGF-I (UniProtKB/Swiss-Prot: N.º P05019, proteína madura que comprende los restos de aminoácidos 49-118 de la secuencia completa) y el IGF-II (UniProtKB/Swiss-Prot: N.º P01344, proteína madura que comprende los restos de aminoácidos 25-91 de la secuencia completa), VEGF (Neufeld et al., 1999, FASEB J. 13 9-22), PDGF (Heldin, 1992, EMBO J. 11 4251-4259), EGF (Heldin et al., 1981, Science 4 1122-23; UniProtKB/Swiss-Prot: N.º P01133, proteína madura que comprende los restos de aminoácidos 971-1023 de la secuencia completa), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; Nurcombe et al., 2000, J. Biol. Chem. 275 30009-30018), bFGF (Taraboletti et al., 1997, Cell Growth. Differ. 8 471-479; UniProtKB/Swiss-Prot: N.º P09038, proteína madura que comprende los restos de aminoácidos 143-288 de la secuencia completa), osteopontina (Nam et al., 2000, Endocrinol. 141 1100), trombospondina-1 (Nam et al., 2000, supra), tenascina-C (Arai et al., 1996, J. Biol. Chem. 271 6099), PAI-1 (Nam et al., 1997, Endocrinol. 138 2972), plasminógeno (Campbell et al., 1998, Am. J. Physiol. 275 E321), fibrinógeno (Campbell et al., 1999, J. Biol. Chem. 274 30215), fibrina (Campbell et al., 1999, supra), transferrina (Weinzimer et al., 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 1806) y KGF (Marchese et al., 1990, J. Cell Physiol. 144 326-32; UniProtKB/Swiss-Prot: N.º P21781, proteína madura que comprende los restos de aminoácidos 32-194 de la secuencia completa).

Los complejos proteicos aislados en forma de proteínas quiméricas sintéticas de la invención comprenden un factor de crecimiento o al menos un dominio de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor del factor de crecimiento afín.

En este contexto, por "dominio" se entiende al menos la porción o región de un factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor del factor de crecimiento afín. Generalmente, aunque no exclusivamente, el receptor del factor de crecimiento afín se expresa por una célula y la unión o ligación de dicho receptor del factor de crecimiento afín por dicho al menos un dominio de un factor de crecimiento provoca una respuesta celular tal como el crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración celular.

Con respecto en particular al IGF-I, dicho dominio comprende adecuadamente el resto de aminoácido 24, que no es un residuo de leucina.

Generalmente, dicho resto es tirosina.

Con respecto en particular al IGF-II, dicho dominio comprende adecuadamente el resto de aminoácido 27, que no es un residuo de leucina.

Generalmente, dicho resto es tirosina.

Con respecto en particular al IGF-I, en una realización, dicho dominio consiste en los restos 1 a 70 del IGF-I.

En otra realización, dicho dominio consiste en los restos 4 a 70 del IGF-I.

También se entenderá que otro componente de los complejos proteicos aislados de la invención es uno o más dominios de tipo III de fibronectina (FN), en el que uno o más dominios de tipo III de FN consiste en los aminoácidos 1266-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1447-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1173-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde uno o más dominios de tipo III de FN comprenden un dominio de unión a integrina.

Preferentemente, el dominio de unión a integrina es un dominio de unión a integrina  $\alpha_1$  o un dominio de unión a integrina  $\alpha_4$ .

Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría en particular, se propone que las proteínas quiméricas sintéticas son capaces de co-ligar y co-activar un receptor afín de dicho factor de crecimiento y un receptor de la integrina para la fibronectina para de ese modo estimular, inducir, aumentar, o de lo contrario, promover la migración celular.

5 Una ventaja de las proteínas quiméricas de acuerdo con la invención es que se producen fácilmente por medios de síntesis química o recombinantes y se espera que sean más estables *in vivo*, ya que no se basan en el mantenimiento de las interacciones proteína-proteína que se requieren en los complejos de oligo-proteínas asociados no covalentemente.

10 En este sentido, aunque los complejos proteicos aislados que comprenden dominios de unión al receptor de IGF-I también comprenderían un IGFBP, se propone que, de acuerdo con el modo de acción antes mencionado, preferentemente un IGFBP no está presente en una quimera sintética IGF-I/FN.

15 En otras realizaciones, la invención proporciona complejos proteicos aislados, tales como en forma de proteínas quiméricas sintéticas, que comprenden IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF y uno o más dominios de tipo III de FN, en el que el uno o más dominios de tipo III de FN consiste en los aminoácidos 1266-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 1447-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1173-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde uno o más dominios de tipo III de FN comprenden un dominio de unión a integrina.

20 Preferentemente, el dominio de unión a integrina es un dominio de unión a integrina  $\alpha_1$  o un dominio de unión a integrina  $\alpha_4$ .

25 El dominio de unión a integrina de fibronectina comprende adecuadamente una secuencia RGD. La secuencia RGD está localizada en los dominios 8 a 10 de tipo III de fibronectina (aminoácidos 1266-1536 de la secuencia de fibronectina). Más específicamente, la secuencia RGD está presente en el dominio 10 de tipo III de fibronectina, definido por los aminoácidos 1447-1536 de la secuencia de fibronectina, aunque los sitios de unión de la integrina secundarios pueden estar presentes en la región del dominio 8-10 más grande.

30 En consecuencia, en una realización particular, la quimera sintética comprende un fragmento de fibronectina que comprende una secuencia RGD, en la que el fragmento comprende o consiste en los aminoácidos 1447-1536 de una secuencia de aminoácidos de fibronectina.

35 En otra realización particular, la quimera sintética comprende un fragmento de fibronectina que comprende una secuencia RGD, comprendiendo o consistiendo dicho fragmento en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1266-1536 de una secuencia de aminoácidos de fibronectina.

40 En otra realización particular más, la quimera sintética comprende un fragmento de fibronectina que comprende una secuencia de RGD de acuerdo con las realizaciones mencionadas anteriormente, en la que dicha quimera sintética comprende además al menos 10, 20, 50, 100, 200, 300, 500, 800 o 1000 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de fibronectina, por ejemplo, N-terminal del resto 1266 y/o C-terminal del resto 1536. Por lo tanto, dicha quimera sintética puede incluir los dominios de tipo I y/o tipo II de fibronectina, tal como, por ejemplo, un fragmento de fibronectina que comprende o consiste en al menos 6, al menos 10, al menos 20, al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, o la totalidad de los aminoácidos 50-273 de una secuencia de aminoácidos de fibronectina.

45 En este contexto, por "*fragmento*" se entiende un dominio, sub-secuencia o porción de la fibronectina. El fragmento constituye preferentemente menos de 500, menos de 400, menos de 300 o más preferentemente aproximadamente 80-280 aminoácidos contiguos de una secuencia de fibronectina madura. También se contemplan varios fragmentos de fibronectina.

50 En otra realización particular más, la quimera sintética comprende un fragmento de fibronectina que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1173 a 1536 de una secuencia de aminoácidos de fibronectina.

55 Se apreciará que la numeración de la secuencia de fibronectina anterior se hace con referencia a la secuencia de fibronectina mostrada en la Figura. 1. Esta secuencia de fibronectina se deriva de la base de datos de proteínas UniProtKB, número de acceso de la proteína P02751. Los dominios y regiones de la fibronectina se exponen en la Tabla I.

60 Preferentemente, las quimeras sintéticas que comprenden fibronectina o un fragmento que comprende un dominio de unión a integrina no comprenden una secuencia de aminoácidos de IGFBP.

65 Preferentemente, las proteínas quiméricas sintéticas como se han descrito anteriormente en la presente memoria comprenden adicionalmente una "*secuencia de enlazador*" situada entre y contigua con una secuencia de factor de crecimiento y una secuencia de aminoácidos de fibronectina.

En una realización, dicha secuencia de enlazador comprende uno o más restos de glicina y uno o más restos de serina.

5 Se pueden seleccionar ejemplos particulares de secuencias de enlazador entre; Gly<sub>4</sub> Ser (SEQ ID NO:7); Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> (SEQ ID NO:8); (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:9) y (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 10), aunque sin limitación a los mismos.

En otra realización, la secuencia de enlazador incluye un sitio de reconocimiento de escisión de la plasmina (Sakiyama-Elbert et al., 2001, FASEB 15 1300), tal como según la secuencia:

10 Leu Ile Lys Met Lys Pro (SEQ ID NO: 11)

En otra realización más, la secuencia de enlazador incluye un sitio de reconocimiento de escisión de la colagenasa-3 (Kim & Healy, 2003, Biomacromolecules 4 1214), tal como según la secuencia:

15 Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (SEQ ID NO: 12)

Los fragmentos biológicamente activos de las proteínas quiméricas sintéticas de la invención y/o fragmentos biológicamente activos de los dominios de unión al receptor del factor de crecimiento particulares y dominios de unión a la integrina ilustrados en la presente memoria pueden ser útiles.

20 Dicho "*fragmento biológicamente activo*" puede tener no menos de 10 %, preferentemente no menos de 25 %, más preferentemente no menos de 50 % e incluso más preferentemente no menos de 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de una actividad biológica de una proteína de la que se deriva.

25 Dicho "*fragmento biológicamente activo*" puede tener en otra alternativa no menos de 10 %, preferentemente no menos de 25 %, más preferentemente no menos de 50 % e incluso más preferentemente no menos de 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o 95 % de una secuencia de aminoácidos contigua con una proteína de la que se deriva.

También se contemplan complejos proteicos variantes de la invención.

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

35 Se apreciará que uno o más restos de aminoácidos de una secuencia de referencia, como un factor de crecimiento, un dominio de unión al receptor de un factor de crecimiento, un dominio de unión a integrina de fibronectina, IGFBP, o uno o más restos correspondientes presentes en una proteína quimérica sintética, puede ser modificado o eliminado, o añadirse secuencias adicionales, sin alterar sustancialmente la actividad biológica del complejo proteico aislado de la invención.

40 En una realización, una variante de proteína comparte al menos 70 %, preferentemente al menos 80 % o 85 % y más preferentemente al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia.

45 Preferentemente, la identidad de secuencia se mide en por lo menos 60 %, más preferentemente en al menos 75 %, más preferentemente en al menos 90 % o más preferentemente más de al menos 95 %, 98 % o sustancialmente toda la longitud de la secuencia de referencia.

50 Con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia, la alineación óptima de las secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos puede ser llevada a cabo por implementaciones informatizadas de algoritmos (programa Geneworks de Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, versión 7.0, Genetics Computer Group, WI, EE.UU.) o mediante inspección y la mejor alineación (es decir, lo que tiene como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia BLAST de programas como, por ejemplo, se divulga por Altschul et al., 1997, Nucl. Acids Res. 25 3389.

55 En otro ejemplo, "*identidad de secuencia*" puede ser entendida como el "*porcentaje de coincidencia*" calculado por el programa de ordenador DNASIS (Versión 2.5 para Windows, disponible de Hitachi Software Engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, EE.UU.).

60 Una discusión detallada del análisis de secuencias se puede encontrar en la unidad 19.3 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995- 1999).

65 La invención contempla también los derivados de un dominio de unión al receptor de un factor de crecimiento, un dominio de unión a integrina de fibronectina o un complejo proteico aislado que comprende el mismo.

Tal como se usa en la presente memoria, las proteínas “derivadas” de la invención se han modificado, por ejemplo, mediante adición, conjugación o formación de complejos con otros restos químicos o mediante técnicas de modificación post-traducción como se conocen bien en la técnica.

5 Las “adiciones” de amino ácidos pueden incluir la fusión de los polipéptidos o variantes de los mismos con otros polipéptidos o proteínas. La otra proteína puede, a modo de ejemplo, ayudar en la purificación de la proteína. Por ejemplo, estas incluyen una etiqueta de polihistidina, proteína de unión a maltosa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína A, o glutatión S-transferasa (GST).

10 Otros derivados contemplados por la invención incluyen, pero no se limitan a, modificación de las cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas y el uso de reticulantes y otros métodos que imponen restricciones conformacionales en los polipéptidos, fragmentos y variantes de la invención. Los ejemplos de modificaciones de la cadena lateral contempladas por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como mediante acilación con anhídrido acético, acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico, amidinación con metilacetimidato, carbamoilación de grupos amino con cianato, piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido de reducción con NaBK<sub>4</sub>, alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido de reducción con NaBK<sub>4</sub> y trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2, 4, 6-trinitrobenceno (TNBS).

20 El grupo carboxilo puede modificarse por activación de carbodiimida a través de la formación de O-acilisourea seguido de derivatización posterior, a modo de ejemplo, a una amida correspondiente.

El grupo guanidina de restos de arginina puede ser modificado por la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y glixal.

25 Los grupos sulfhidrilo pueden ser modificados por métodos tales como oxidación con ácido perbórico a ácido cisteico, la formación de derivados mercuriales utilizando ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, 4-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, cloruro de fenilmercurio y otros mercuriales, la formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol, la reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida, carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida y carbamoilación con cianato a pH alcalino.

30 Los restos de triptófano pueden modificarse, por ejemplo, mediante alquilación del anillo de indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfonilo o por oxidación con N-bromosuccinimida.

35 Los restos de tirosina se pueden modificar por nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

El anillo de imidazol de un residuo de histidina se puede modificar mediante N-carboxilación con pirocarbonato de dietilo o mediante alquilación con derivados de ácido yodoacético.

40 Los ejemplos de incorporación de aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de péptidos incluyen, pero no se limitan a, el uso de ácido 4-amino butírico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, t-butilglicina, norleucina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, 2-tienil alanina y/o isómeros D de aminoácidos.

45 Un ejemplo de métodos adecuados para la derivatización química de las proteínas se proporciona en el Capítulo 15 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., John Wiley & Sons NY (1995-2001).

50 Los complejos aislados de proteínas y los componentes de las proteínas individuales de los mismos, (inclusive los fragmentos, variantes, derivados, y homólogos) se pueden preparar por cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica.

55 Las proteínas de la invención pueden ser producidas por síntesis química. Las técnicas de síntesis química son bien conocidas en la técnica, aunque el experto en la materia puede referirse al Capítulo 18 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., John Wiley & Sons NY (1995-2001) para consultar ejemplos de la metodología adecuada.

Las proteínas se pueden preparar de forma alternativa como proteínas recombinantes.

60 Aunque la producción de proteínas recombinantes es bien conocida en la técnica, el experto en la materia puede consultar los protocolos estándar como se describe por ejemplo en Sambrook et al., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular, en las secciones 16 y 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular, en los capítulos 10 y 16; y CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular, en los Capítulos 1, 5 y 6.

La proteína recombinante se puede producir mediante un método que incluye las etapas de:

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

Un “vector de expresión” puede ser un vector extra-cromosómico de autorreplicación tal como un plásmido, o un vector que se integra en un genoma hospedador.

Por “unida operativamente” u “operativamente conectada” se entiende que dicha secuencia(s) de nucleótidos reguladora está/están situada(s) en relación con el ácido nucleico recombinante de la invención para iniciar, regular o controlar de otro modo la transcripción del ácido nucleico, o la traducción de una proteína codificada por el ácido nucleico.

Las secuencias de nucleótidos reguladoras serán generalmente apropiadas para la célula hospedadora usada para la expresión. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas son conocidos en la técnica para una variedad de células hospedadoras.

Generalmente, dichas una o más secuencias de nucleótidos reguladoras pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias promotoras, secuencias líder o de señal, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción, secuencias donadoras/aceptoras de corte y empalme y secuencias intensificadoras o activadoras.

Los promotores constitutivos (tales como CMV, RSV, adenovirus, SV40 y promotores del factor de elongación humano) y promotores inducibles/reprimibles (tales como promotores reprimibles por *tet* y promotores inducibles por IPTG, metalotionina o ecdisona) son bien conocidos en la técnica y se contemplan por la invención. Se apreciará también que los promotores pueden ser promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor.

La construcción de expresión también puede incluir una pareja de fusión (normalmente proporcionada por el vector de expresión) de manera que la proteína recombinante de la invención se expresa como un polipéptido de fusión con dicha pareja de fusión. La principal ventaja de las parejas de fusión es que facilitan la identificación y/o purificación de dicha proteína de fusión.

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

En algunos casos, las parejas de fusión también tienen sitios de escisión de la proteasa, como para el Factor X<sub>a</sub> o trombina, que permiten a la correspondiente proteasa digerir parcialmente la proteína de fusión de la invención y de este modo liberar el polipéptido recombinante de la invención de la misma. A continuación, la proteína liberada se puede aislar de la pareja de fusión mediante la consiguiente separación cromatográfica.

Las parejas de fusión incluyen también dentro de su alcance “etiquetas de epítipo”, las cuales son generalmente secuencias cortas de péptidos para las que está disponible un anticuerpo específico. Los ejemplos bien conocidos de etiquetas de epítipo para las cuales están fácilmente disponibles anticuerpos monoclonales específicos incluyen etiquetas c-myc, hemaglutinina y FLAG.

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

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

Con respecto a la introducción de material genético en las células hospedadoras, los términos “transformación” y “transfección” se utilizan generalmente para describir la introducción de material genético en una célula hospedadora. Hay muchos métodos bien conocidos para introducir material genético extraño en una célula hospedadora, incluyendo, pero sin limitarse a, precipitación con fosfato de calcio, electroporación, administración

con lipofectamina, lipofectina y otros agentes lipófilos, precipitación con fosfato cálcico, transfección por DEAE-dextrano, bombardeo de micropartículas, microinyección y fusión de protoplastos.

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

La expresión “ácido nucleico” como se utiliza en la presente memoria designa ARNm, ARN, ARNc, ARNi y ADN de cadena sencilla o de doble cadena, inclusive ADNc y ADN genómico y los híbridos ADN-ARN.

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

15 Una “*sonda*” puede ser un oligonucleótido o polinucleótido de cadena sencilla o de doble cadena, convenientemente etiquetado con el fin de detectar secuencias complementarias, por ejemplo, en la transferencia Northern o Southern.

20 Un “*cebador*” generalmente es un oligonucleótido de cadena sencilla, que tiene preferentemente 15-50 nucleótidos contiguos, que es capaz de hibridar con un “molde” de ácido nucleico complementario y que se extiende de una manera dependiente del molde por la acción de una ADN polimerasa tal como *Taq* polimerasa, ADN polimerasa dependiente de ARN o Sequenase™.

Los ácidos nucleicos sintéticos de la invención pueden ser producidos por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes que utilizan técnicas de amplificación de la secuencia de ácido nucleico, o una combinación de los mismos, como son bien conocidos en la técnica.

25 Los cebadores y oligonucleótidos sintetizados químicamente, los sintetizadores y tecnologías asociadas útiles de acuerdo con la presente invención están generalmente disponibles en la mayoría de laboratorios o se pueden comprar de fuentes comerciales.

30 Las técnicas de amplificación de ácido nucleico adecuadas son bien conocidas por la persona experta e incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR) como se describe por ejemplo en el capítulo 15 de Ausubel et al. *supra*; amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), como por ejemplo se describe en la patente US-5.422.252; replicación por círculo rodante (RCR), como por ejemplo se describe en Liu et al., 1996, J. Am. Chem. Soc. 118 1587, la Solicitud internacional WO 92/01813 y la Solicitud internacional WO 97/19193; amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), como se describe por ejemplo por Sooknanan et al., 1994, Biotechniques 17 1077 y amplificación por la Q-β replicasa, como se describe por Tyagi et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 5395, aunque sin limitarse a las mismas.

35 Una técnica de amplificación de la secuencia de ácido nucleico preferida es la PCR. Como se usa en la presente memoria, un “*producto de amplificación*” se refiere a un producto de ácido nucleico generado por una técnica de amplificación de ácido nucleico.

40 En la producción y expresión de ácidos nucleicos de la invención, también se apreciará que se puede aprovechar la redundancia de la secuencia de codón, de manera que los ácidos nucleicos ilustrados en la presente memoria pueden modificarse fácilmente sin cambiar una secuencia de aminoácidos codificada por el mismo.

45 En realizaciones particulares, los ácidos nucleicos se pueden optimizar de acuerdo con el “*uso de codones*” preferido de una célula hospedadora para ser utilizado para la expresión recombinante, como es bien conocido en la técnica. Esto puede “diseñar” efectivamente un ácido nucleico para la expresión óptima en un organismo particular, o células del mismo, donde el uso del codón preferencial afecta a la expresión de proteínas.

50 Por lo tanto, la invención incluye ácidos nucleicos sintéticos que son homólogos a los ácidos nucleicos ilustrados en la presente memoria.

55 En una realización, los homólogos de ácido nucleico comparten al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 90 % y aún más preferentemente al menos 95% de identidad de secuencia con un ácido nucleico que codifica una cualquiera de las construcciones de proteína quiméricas sintéticas descritas en la presente memoria.

60 Preferentemente, la identidad de secuencia se mide en al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, incluso más preferentemente al menos 90 %, 95 % o ventajosamente en sustancialmente la longitud completa del ácido nucleico que codifica de la invención.

65 En otra realización, los homólogos de ácido nucleico hibridan con un ácido nucleico que codifica una cualquiera de las construcciones de proteína quimérica sintética descritas en la presente memoria en condiciones de alta rigurosidad.

“Hibridar” e “hibridación” se usan en la presente memoria para denotar el apareamiento de secuencias de nucleótidos al menos parcialmente complementarios para producir un dúplex de ADN-ADN, ARN-ARN o ADN-ARN. Las secuencias hibridadas se producen mediante apareamiento de bases entre purinas y pirimidinas complementarias como es bien conocido en la técnica.

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

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

15 “Condiciones rigurosas” designa a aquellas condiciones en las que solo el ácido nucleico que tiene una alta frecuencia de bases complementarias se hibridará.

La referencia en la presente memoria a condiciones de alta rigurosidad incluye y abarca:

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

25 En general, el lavado se lleva a cabo a  $T_m = 69,3 + 0,41 (G + C) \% - 12$  °C. En general, el valor de  $T_m$  de un dúplex de ADN disminuye en aproximadamente 1 °C con cada incremento de 1 % en el número de bases coincidentes.

30 No obstante, las anteriores condiciones rigurosas se conocen bien en la técnica, tal como se describe en los capítulos 2.9 y 2.10 de Ausubel et al., *supra* y, en particular, en las páginas 2.9.1 a través 2.9.20.

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

40 Generalmente, dichos anticuerpos se unen a o se conjugan con un polipéptido, fragmento, variante o derivado de la invención. Por ejemplo, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos policlonales. Tales anticuerpos se pueden preparar por ejemplo mediante la inyección de un polipéptido, fragmento, variante o derivado de la invención en una especie de producción, que puede incluir ratones o conejos, para obtener antisueros policlonales. Los métodos para producir anticuerpos policlonales son bien conocidos para los expertos en la técnica. Protocolos a modo de ejemplo que pueden usarse se describen por ejemplo en Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, *supra* y en Harlow & Lane, 1988, *supra*.

50 En lugar de los antisueros policlonales obtenidos en la especie de producción, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando el método estándar como, por ejemplo, descrito por Köhler y Milstein (1975, Nature 256, 495), o por modificaciones más recientes del mismo como, por ejemplo, el descrito en Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, *supra* inmortalizando bazo u otras células productoras de anticuerpos derivados de una especie de producción que ha sido inoculada con uno o más de los polipéptidos, fragmentos, variantes o derivados de la invención.

55 Dichos anticuerpos pueden comprender fragmentos Fc o Fab de los anticuerpos policlonales o monoclonales a los que se ha hecho referencia anteriormente. Como alternativa, los anticuerpos pueden comprender anticuerpos Fv de cadena sencilla (scFv) contra las proteínas de la invención. Tales scFv se pueden preparar, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos, respectivamente, en la patente US-5.091.513, en la Patente Europea 239,400 o en el artículo de Winter y Milstein (1991, Nature 349 293).

60 Los marcadores pueden estar asociados con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

65 El marcador puede ser seleccionado de un grupo que incluye un cromógeno, un catalizador, una enzima, un fluoróforo, una molécula quimioluminiscente, un ion lantánido tales como europio (Eu<sup>34</sup>), un radioisótopo y un marcador visual directo. En el caso de un marcador visual directo, se puede usar una partícula metálica o no metálica coloidal, una partícula de colorante, una enzima o un sustrato, un polímero orgánico, una partícula de látex, un liposoma u otra vesícula que contiene una sustancia para la producción de señales y similares.

En las patentes US-4.366.241, US-4.843.000 y US-4.849.338 se divulgan un gran número de enzimas útiles como marcadores. Marcadores de enzimas útiles en la presente invención incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, b-galactosidasa, glucosa oxidasa, lisozima, malato deshidrogenasa, y similares. El marcador de enzima puede ser utilizado solo o en combinación con una segunda enzima en la solución.

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

10 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un complejo proteico aislado de la invención, incluidas las variantes y derivados del mismo.

Dicho complejo proteico aislado puede estar en cualquier forma, incluidas las proteínas quiméricas sintéticas de la invención, aunque sin limitarse a las mismas.

15 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para promover o de otra manera facilitar la migración celular, la regeneración de tejidos y la cicatrización de heridas. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse para prevenir las metástasis tumorales mediante la prevención o inhibición de la migración de células tumorales a un sitio secundario.

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

25 En este sentido, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en asociación con, o como un componente de, un biomaterial, biopolímero, material inorgánico tal como hidroxiapatita o derivados de los mismos, implantes quirúrgicos, prótesis, apósitos para heridas o quemaduras, compresas, vendajes o similares adecuadamente impregnados, recubiertos o que de otra manera comprenden la composición farmacéutica.

30 Adecuadamente, la composición farmacéutica comprende un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado.

Preferentemente, el vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración a mamíferos y más preferentemente, a los seres humanos.

35 Por "*vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable*" se entiende una carga sólida o líquida, diluyente o sustancia encapsulante que puede utilizarse de manera segura en la administración sistémica. Dependiendo de la vía particular de administración, se puede utilizar una variedad de vehículos, bien conocidos en la técnica. Estos vehículos pueden seleccionarse de un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido alginico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica y sales tales como sales de ácidos minerales incluyendo clorhidratos, bromuros y sulfatos, ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos y malonatos y agua libre de pirógenos.

40 Una referencia útil que describe vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991).

50 Cualquier ruta segura de administración puede ser empleada para proporcionar a un paciente la composición de la invención. Por ejemplo, se puede emplear la oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa, intra-articular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, por inhalación, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica, y similares.

55 Las formas farmacéuticas incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, pastillas, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas farmacéuticas pueden incluir también la inyección o implantación de dispositivos de liberación controlada diseñados específicamente para este fin u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta manera. La liberación controlada del agente terapéutico puede efectuarse mediante el recubrimiento de la misma, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y poliglicólico y ciertos derivados de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa. Además, la liberación controlada puede efectuarse mediante el uso de otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas.

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

65

Con respecto a las composiciones farmacéuticas para la cicatrización de heridas, se hace referencia en particular a la patente US-5.936.064 y a la Publicación Internacional WO 99/62536.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir vectores de expresión tales como vectores virales tales como vaccinia y vectores virales útiles en terapia génica. Estos últimos incluyen adenovirus y virus asociados a adenovirus (AAV) tales como los descritos en Braun-Falco et al. (1999, Gene Ther. 6432), vectores retrovirales y lentivirales tales como los descritos en Buchshacher et al. (2000, Blood 95 2499) y vectores derivados del virus del herpes simple y citomegalovirus. Una visión general de los vectores virales útiles en la terapia génica se proporciona en Stone et al. (2000, J. Endocrinol. 164 103).

10 La presente invención también puede utilizar los vectores de expresión específicos que dirigen la expresión de genes a las células epidérmicas, como se describe en la patente US-5.958.764 y para aplicaciones de cicatrización de heridas, como se describe en la patente US-5.962.427.

15 La invención proporciona un complejo proteico aislado para su uso en la curación de heridas o quemaduras en un animal. Esto puede incluir en particular el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de mamíferos, y más particularmente, de seres humanos.

20 Sin embargo, los usos terapéuticos de acuerdo con la invención también pueden ser aplicables a mamíferos como animales domésticos y de compañía, animales de producción, tales como caballos, camellos y galgos, animales de granja, animales de laboratorio y animales utilizados como fuente de células, órganos y tejidos para xenotrasplantes.

25 También se contemplan métodos de tratamiento cosmético donde los complejos proteicos aislados, incluidas las proteínas quiméricas sintéticas de la invención, se administran para mejorar o aumentar la calidad de la piel o el aspecto de la piel.

Tales tratamientos pueden incluir la prevención o restauración de trastornos de la piel tales como la psoriasis y la cicatrización hipertrófica que resultan de la proliferación celular de la piel aberrante.

30 Como alternativa, se contemplan métodos de tratamiento mediante los cuales se previene o inhibe la metástasis tumoral mediante el bloqueo de la migración de células tumorales a un sitio secundario. Además, también se contemplan los métodos de tratamiento del cáncer mediante el bloqueo de la proliferación celular.

35 En realizaciones particulares, los tratamientos terapéuticos y/o profilácticos pueden utilizar un complejo proteico aislado, incluidas las proteínas quiméricas sintéticas de la invención, en asociación con, o como un componente de, un biomaterial, biopolímero, material inorgánico tal como fluorohidroxiapatita, implante quirúrgico, prótesis, apósitos para heridas o quemaduras, compresas, vendajes o similares adecuadamente impregnados, recubiertos o de lo contrario que comprende el complejo proteico aislado.

40 Tales métodos incluyen la administración de las composiciones farmacéuticas como se define anteriormente y puede ser por medio de la inyección de microagujas en sitios de tejido específicos, como se describe en la Patente US-6.090.790, cremas tópicas, lociones o apósitos selladores aplicados a las heridas, quemaduras o úlceras, tales como los descritos en la Patente US-6.054.122 o implantes que liberan la composición tal como se describe en la publicación internacional WO 99/47070.

45 La terapia génica también es aplicable en este sentido, tal como de acuerdo con los métodos expuestos en la patente US-5.929.040 y US- 5.962.427.

50 También existen métodos mediante los cuales las células de la piel pueden ser genéticamente modificadas para el propósito de crear sustitutos de la piel, tales como mediante la expresión del factor de crecimiento deseado diseñado por ingeniería genética (Supp et al., 2000, J. Invest. Dermatol. 1145). Un ejemplo de una revisión de este campo se proporciona en Bevan et al. (Biotechnol. Gent. Eng. Rev. 16 231).

55 También se contempla la "siembra" de un receptor con células transfectadas o transformadas, tal como se describe en la publicación internacional WO 99/11789.

60 Estos métodos se pueden utilizar para estimular la migración celular y por lo tanto facilitar o acelerar la curación de heridas y quemaduras, reparar lesiones de la piel tales como úlceras, reemplazo de tejidos e injerto, tal como por cultivo *in vitro* de piel autóloga, reepitelización de los órganos internos como el riñón y el pulmón y la reparación del tejido nervioso dañado.

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

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

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

Se contemplan también estructuras en andamio de polímeros para el propósito de facilitar el diseño de la piel de sustitución, como por ejemplo se describe en Sheridan et al. (2000, J. Control Release 14 91) y Fauza et al. (1998, *supra*), como son las microesferas como agentes para la aplicación de células de la piel a las heridas y quemaduras (LaFrance and Armstrong, 1999, Tissue Eng. 5 153).

También se contempla el uso de complejos proteicos aislados, incluidas las proteínas quiméricas sintéticas de la invención, para identificar, cribar, diseñar o de otra manera producir agonistas o antagonistas de complejos que comprenden un factor de crecimiento y fibronectina, tales como complejos IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, GF:FN, or IGF-I:IGFBP:FN. Tales agentes pueden ser un "mimético". El término "mimético" se utiliza en la presente memoria para referirse a moléculas que están diseñados para parecerse a determinadas regiones funcionales de las proteínas o péptidos, e incluye dentro de su alcance los términos "agonista", "análogo" y "antagonista" como se conocen bien en la técnica.

Los agonistas pueden ser producidos de modo que imitan la unión de los receptores del factor de crecimiento afines y los receptores de FN mediante complejos IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN, o IGF-I:IGFBP:FN. Tales moléculas pueden tener utilidad como estimuladores de la migración celular tal como se requiere para la curación de heridas, regeneración de la piel y similares.

En otra alternativa, los antagonistas se pueden producir para prevenir o inhibir la unión de los receptores de factores de crecimiento afines y los receptores de la integrina mediante complejos IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN o IGFII:IGFBP:FN. Tales moléculas pueden tener utilidad como inhibidores de la migración y/o la proliferación celular y de este modo constituyen agentes antitumorales útiles y también en tratamientos de trastornos de la piel tales como la psoriasis y la cicatrización hipertrófica que resultan de la proliferación celular aberrante.

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

La búsqueda en bases de datos estructurales asistida por ordenador es cada vez más utilizada como un procedimiento para identificar miméticos. Los métodos de búsqueda en bases de datos, los cuales, en principio, pueden ser adecuados para la identificación de compuestos miméticos, se pueden encontrar en la Publicación Internacional WO 94/18232 (relacionada con la producción de miméticos de antígenos del VIH), Patente US-5.752.019 y la Publicación Internacional WO 97/41526 (relacionada con la identificación de miméticos de EPO).

Otros métodos incluyen una variedad de técnicas biofísicas que identifican interacciones moleculares. Estas permiten el cribado de moléculas candidatas en función de si dicha molécula candidata afecta a la formación de complejos, por ejemplo, IGF-I:FN, IGF-II:FN, EGF:FN, bFGF:FN, KGF:FN o IGF-IGFBP-FN. Los métodos aplicables a las técnicas potencialmente útiles tales como ensayos de unión de radioligando competitivo (véase en Upton et al., 1999, *supra* un método correspondiente), ultracentrifugación analítica, microcalorimetría, resonancia de plasmón de superficie y métodos basados en biosensores ópticos se proporcionan en el Capítulo 20 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan et al., (John Wiley & Sons, 1997).

Para que la presente invención pueda ser entendida y puesta en práctica más fácilmente, el experto en la materia debe consultar los siguientes ejemplos no limitativos.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1

#### *IGF-I, IGFBP y FN estimulan la migración celular*

Las células MCF-10A fueron sembradas en soportes Transwell que habían sido recubiertos con FN (1 µg/ml) y concentraciones crecientes de IGF-I preunido en presencia de IGFBP-3 o 5. Se permitió la migración celular durante 5 horas. El número de células que atraviesan la membrana en respuesta a cada tratamiento se expresó como porcentaje de las que emigran sobre FN solamente (SFM). Los datos de MCF-10 se reúnen a partir de tres experimentos con tratamientos ensayados en cuatro pocillos en cada experimento repetido y se muestra en la Fig. 2.

Las barras de error indican el EEM. MSS = Medios sin suero. IGF-I:FN, IGF-I:IGFBP-3:FN and IGF-I:IGFBP-5:FN fueron capaces de estimular significativamente el aumento de la migración por encima del de los pocillos de control con FN solo (respuestas de 153,7 +/- 7,3 %, 192,5 +/- 6,8 % y 187,5 +/- 6,5 % de los pocillos de control de FN, respectivamente) (p <0,05). La respuesta de las células MCF7-10A a los tratamientos con IGF-I:IGFBP-3:FN e IGF-I:IGFBP-5:FN también fue significativamente mayor que la obtenida con cualquiera de IGFBP o IGF-I solo con FN (p <0,05). Estos datos indican que las respuestas máximas se producen cuando están presentes los complejos IGF-I:IGFBP-3/5:FN triméricos. Esto sugiere que las quimeras que contienen IGF-I ligado a FN activan las integrinas de unión a FN y el receptor del factor de crecimiento afín.

10 EJEMPLO 2

*Proteínas quiméricas sintéticas fibronectina : factor de crecimiento*

15 En la presente memoria se proporcionan ejemplos de proteínas quiméricas sintéticas de la invención, en forma de quimeras FN : factor de crecimiento (p.ej., IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF y KGF).

20 Las proteínas quiméricas sintéticas incluyen cualquiera de longitud completa o formas truncadas de FN fusionados con un factor de crecimiento, con o sin modificaciones de restos de aminoácidos. Además, la FN y los factores de crecimiento pueden estar fusionados con o sin los diversos enlazadores peptídicos.

25 Se han diseñado una serie de construcciones de expresión quiméricas en las que diferentes longitudes de la proteína FN están unidas a las proteínas IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF de longitud completa maduras o al menos un dominio de las proteínas IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF capaces de unirse a un receptor del factor de crecimiento afín. En cada caso, los segmentos de FN están preferentemente unidos a la secuencia de IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF través de un enlazador, por ejemplo, un enlazador Gly<sub>4</sub> Ser (SEQ ID NO:7), un enlazador Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> (SEQ ID NO:8), un enlazador (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:9) o un enlazador (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 10).

Los ejemplos de proteínas quiméricas sintéticas incluyen, pero no se limitan a:

- 30 A) Dominio 8 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- B) Dominios 8-9 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- C) Dominios 8-10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- D) Dominio 9 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- 35 E) Dominios 9-10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- F) Dominio 10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- G) Dominios 1-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominio 8 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- H) Dominios 1-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominios 8-9 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- 40 I) Dominios 1-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominios 8-10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- J) Dominios 1-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominio 9 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- 45 K) Dominios 1-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominios 9-10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- L) Dominios 1-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominio 10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- M) Dominios 4-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominio 8 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- 50 N) Dominios 4-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominios 8-9 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- O) Dominios 4-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominios 8-10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- P) Dominios 4-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominio 9 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- 55 Q) Dominios 4-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominios 9-10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF);
- R) Dominios 4-5 de tipo I de FN [Enlazador] Dominio 10 de tipo III de FN [Enlazador] Factor de crecimiento (IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF).

60 Las secuencias de ADN de los genes de FN, IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF y KGF humanos (SEQ ID NOs: 1-6, respectivamente) pueden ser optimizadas para la expresión en el codón de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias de codificación pueden ser clonadas en un vector de expresión que incorpora una etiqueta de afinidad de polihistidina para facilitar la purificación de las quimeras (p.ej., el vector de expresión pIB/V5-His (Invitrogen)). Una secuencia de nucleótidos que codifica un enlazador de aminoácidos como se ha descrito anteriormente puede ser insertada a través de mutagénesis de sitio dirigido por PCR. La adición de una Asn al extremo C terminal de la

secuencia de enlazador puede ser utilizada para generar un motivo Asn-Gly, siendo Gly el primer aminoácido de la proteína del factor de crecimiento. Este motivo permite la escisión inducida por hidroxilamina de la proteína del factor de crecimiento de las quimeras.

5 Las construcciones resultantes codificarán varias longitudes de la proteína FN unidas por un enlazador a las proteínas IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF maduras de longitud completa o al menos un dominio de las proteínas IGF-I, IGF-II, EGF, bFGF o KGF capaces de unirse a un receptor del factor de crecimiento afín. La secuencia de ADN de todas las construcciones se puede verificar para asegurarse de que se mantiene la fidelidad de las secuencias de ADN deseadas.

10 Se pueden usar clones en el vector pIB/V5-His para transfectar células de insecto Sf9 y la proteína secretada transitoriamente expresada se detecta en el medio acondicionado, tal como se evaluó por inmunotransferencia. Brevemente, las muestras se resuelven en SDS-PAGE en condiciones reductoras y las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa utilizando un método de transferencia semi-seco. La membrana se pone en contacto con anticuerpos policlonales anti-FN y las especies de proteínas diana son visualizadas a continuación usando quimioluminiscencia potenciada.

15 La purificación de las proteínas quiméricas se basa en la cromatografía de afinidad Ni-NTA Superflow Agarosa (QIAGEN, Australia) realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las proteínas quiméricas se controlan durante todo el proceso de purificación mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western usando un anticuerpo policlonal anti-FN (Calbiochem).

20 Se pueden usar células, tales como células MCF-10A, células MCF-7 y células epiteliales humanas aisladas, queratinocitos y fibroblastos para examinar los efectos de las proteínas quiméricas sintéticas sobre la migración y/o proliferación celular. Por ejemplo, la migración celular puede evaluarse usando ensayos de migración Transwell™, mientras que la proliferación celular se puede determinar usando ensayos de proliferación celular bien conocidos para un experto en la materia.

## REIVINDICACIONES

1. Un complejo proteico aislado en forma de una proteína quimérica sintética, que comprende una secuencia de aminoácidos de:
- 5 (i) un factor de crecimiento, o al menos un dominio de dicho factor de crecimiento que es capaz de unirse a un receptor del factor de crecimiento afín; y  
(ii) uno o más dominios de tipo III de fibronectina (FN), en el que el uno o más dominios de tipo III de FN consiste en los aminoácidos 1266-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1447-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1173-1536 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1, donde uno o más dominios de tipo III de FN comprenden un dominio de unión a integrina.
- 10 2. El complejo proteico aislado de la reivindicación 1, en el que dicho factor de crecimiento se selecciona de factor crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF).
- 15 3. El complejo proteico aislado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el dominio de unión a integrina es un dominio de unión a integrina  $\alpha_1$  o un dominio de unión a integrina  $\alpha_4$ .
- 20 4. El complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el cual no comprende una secuencia de aminoácidos de IGFBP.
- 25 5. El complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un fragmento adicional de FN.
- 30 6. El complejo proteico aislado de la reivindicación 5, en el que el fragmento adicional de FN comprende los aminoácidos 50-273 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 184-273 de la secuencia de FN expuesta en la SEQ ID NO: 1.
- 35 7. El complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además al menos una secuencia de enlazador.
- 40 8. El complejo proteico aislado de la reivindicación 7, en el que la secuencia de enlazador comprende un sitio de escisión de la proteasa y/o se selecciona del grupo que consiste en:  
(i) Gly<sub>4</sub> Ser (SEQ ID NO:7);  
(ii) Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> (SEQ ID NO:8);  
(iii) (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:9);  
(iv) (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:10);  
(v) Leu Ile Lys Met Lys Pro (SEQ ID NO:11) y  
(vi) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (SEQ ID NO:12).
- 45 9. Un ácido nucleico aislado que codifica el complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 50 10. Una construcción genética que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 9 unido operativamente a una o más secuencias de nucleótidos reguladoras en un vector, siendo preferentemente la construcción una construcción de expresión y estando el ácido nucleico aislado unido operativamente a un promotor.
- 55 11. Una célula hospedadora que comprende la construcción genética de la reivindicación 9 o la reivindicación 10.
- 60 12. Una composición farmacéutica que comprende el complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 65 13. Un implante quirúrgico, estructura en andamio o prótesis impregnados, recubiertos o tratados de otra manera que comprenden el complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o un apósito para heridas o quemaduras, que comprende el complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
14. Un método *in vitro* para promover la migración y/o proliferación celular, que incluye la etapa de utilizar el complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para unir tanto un receptor del factor de crecimiento como un receptor de integrina expresado por una célula para de ese modo inducir, aumentar o favorecer de otro modo la migración y/o proliferación de dicha célula.
15. El complejo proteico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en la curación de heridas o quemaduras en un animal, en el que preferentemente el animal es un ser humano.

**A) Secuencia de AA de FN**

```

1      mlrqpgpgll llavqclgta vpstgasksk rqaqmqvqpq spvavsqsqp gcydngkhyq
61     inqqwertyl gnalvctcyg gsrqfncesk peaeetcfdk ytgntyrvgd tyerpksmi
121    wdctcigagr grisctianr cheggqsyki gdtwrrphet ggymlcevcl gngkgewtck
181    piaekcfdha agtsyvvet wekpyqgwmv vdctclgegs gritctsrnr cndqdttrsy
241    rigdwtsskd nrgnllqcic tgnrgewkc erhtsvqtts sgsqpftdvr aavyqpphp
301    qpppyghcvt dsgvvyvsgm qwlktqgnkq mlctclngv scqetavtqt yggnsngepc
361    vlpftyngrt fyscttegrq dghlwcstts nyeqdkysf ctdhtvlvqt qggnsngalc
421    hfpflynnhn ytdctsegrr dnmkwcgttq nydadqkfgf cpmaaheec ttnegvmyri
481    gdqwdkqhdn ghmmrctcvg nrgewtcia ysqrldqciv dditionvndt fhkrheeghm
541    lnctcfqggr grwkcdpvdq cqdssetgfy qigdswkeyv hgvryqcycy grgigewhcg
601    plqtypsssg pvevfitetp sqpnshpiqw napqpskish yilwrpkns vgrwkeatip
661    ghlnsytikg lkpgvvyegq lisiqqyghq evtrfdfttt ststpvtsnt vtgettpfsp
721    lvatesevte itassfvvsw vsasdtvsqf rveyelseeg depqyldlps tatsvnipld
781    lpgrkyivnv yqisedgeqs lilstsqtta pdappdptvd qvddtsivvr wsrpqapitg
841    yrivyspsve gsstelnlpe tansvtlsdl qpqvqyniti yaveenqest pvviqgettg
901    tprsdvpsp rdlqfvevtd kvvtimwtpv esavtgyrvd vipvnlpgeh gqrlpisrnt
961    faevtqlspg vtyyfkvfav shgreskplt aqqttkldap tnlqfvnetd stvlvrwtpv
1021   raqitgyrlt vqltrrqqr qynvgpsvsk yplrnlpas eytvsilvaik gngespkatg
1081   vfttlqpgss ippyntevte ttivitwtpa prigfklgvr psqgqgeapre vtsdsgsivv
1141   sgltpgveyv ytiqvlrdgq erdapivnkvtplsptnl hleanpdtgv ltvswerstt
1201   pditgyritt tptngqqgns leevvhadqs sctfdnlspg leynvsvyvt kddkesvpis
1261   dtiipavppp tdlrftnigp dtmrvtwapp psidltnflv ryspvkneed vaelsispsd
1321   navvltnlpp gteyvsvvss vyeqhestpl rgrqktglds ptgidfsdit ansftvhwia
1381   pratitgyri rhhpehfsgr predrvphsr nsitltnltp gteyvsvsiva lngreespll
1441   igqgstvsdv prdlevvaat ptslliswda pavtvryyri tygetggnsq vqeftvpqsk
1501   statisglkp gvdytitvya vtgrgdspas skpisinyrt eidkpsmqmvdtdvqdnsisv
1561   kwlpssspvt gyrvtttpkn gpgptkktka gpdqtemtie glqptveyyv svyaqnpqge
1621   sqplvqtavt nidrpkglaf tdvdvdsiki awespqgqvs ryrvtysspe dgihelpap
1681   dgeedtaelq glrpgseytv svvalhddme sqpligtqst aipaptdlkf tqvtptslsa
1741   qwtppnvqlt gyrvrvtpke ktgpmkeinl apdsssvvvs glmvatkyev svyalkdtlt
1801   srpaqgvvtt lenvsprra rytdatetti tiswrkttet itgfqvadvp angqtpiqrt
1861   ikpdvrsyti tglqpgtdyk iylytlndna rsspvidas taidapsnlr flattpnsll
1921   vswqpprari tgyiikyekp gspprevvpr prpgvteati tglepgteyt iyvialknnq
1981   ksepligrkk tdelpqlvtl phpnlhgpei ldvpstvqkt pfvthpgydt gngiqlpqts
2041   gqqpsvqqm ifeehgfrtt pttatpir hrprpyppnv geeiqighip redvdylhyp
2101   hpgplnplas tgqealsqtt iswapfqdts eyiischpvg tdeepqlqfrv pgtstsatlt
2161   gltrgatyni ivealkdqqr hkvreevvtv gnsvneqlnq ptddscfdpy tvshyavgde
2221   wermesgfk llcqclgfgs ghfrcdssrw chdnvnyki gekwdrgeñ gqmmstclg
2281   ngkgefkcdp heatcyddgk tyhvgeqwk eylgaicsct cfggqrgwrc dncrrpqqep
2341   spegttgqsy nqysqryhqr tntnvnpcie cfmpldvqad redsre (SEQ ID NO:1)

```

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

```

GPETLCGAEL VDALQFVCGD RGFYFNKPTG YGSSRRAPQ TGIVDECCFR SCDLRRLEMY
CAPLKPAKSA (SEQ ID NO:2)

```

**C) Secuencia de AA de IGF-II**

```

AYRPSETLGG GELVDTLQFV CGDRGFYFSR PASRVRRSR GIVECCFRS CDLALLETYC
ATPAKSE (SEQ ID NO:3)

```

**FIGURA 1**

**D) Secuencia de AA de EGF**

NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYTEALDKYA CNCVVGYIGE RCQYRDLKWW ELR (SEQ ID NO:4)

**E) Secuencia de AA de bFGF**

PALPEDGGSG AFPPGHFKDP KRLYCKNGGF FLRIHPDGRV DGVREKSDPH IKLQLQAEER  
GVVSIKGVCA NRYLAMKEDG RLLASKCVTD ECFFFERLES NNYNTYRSRK YTSWYVALKR  
TGQYKLGSKT GPGQKAILFL PMSAKS (SEQ ID NO:5)

**F) Secuencia de AA de KGF**

CNDMTPEQMA TNVNCSSPER HTRSVDYMEG GDIRVRLFC RTQWYLRIK RGKVKGTQEM  
KNNYNIMEIR TVAVGIVAIAK GVESEFYLAM NKEGKLYAKK ECNEDCNFKE LILENHYNTY  
ASAKWTHNGG EMFVALNQKG IPVRGKTKK EQKTAHFLPM AIT (SEQ ID NO:6)

**G) Secuencias de enlazador**

- 1) Gly<sub>4</sub> Ser (SEQ ID NO:7)
- 2) Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> (SEQ ID NO:8)
- 3) (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO:9)
- 4) (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO:10)
- 5) Leu Ile Lys Met Lys Pro (SEQ ID NO:11)
- 6) Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys (SEQ ID NO:12)

**FIGURA 1 cont.**

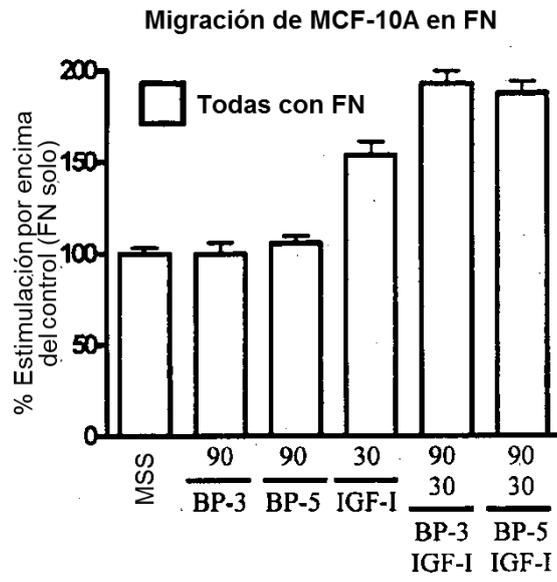


FIGURA 2