

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 230**

51 Int. Cl.:

C07K 14/52 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2013 PCT/EP2013/064016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006082**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2013 E 13734060 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017 EP 2870175**

54 Título: **Conjugados que contienen secuencias procedentes de factor de crecimiento placentario y su uso como componentes de biomateriales y en medicina**

30 Prioridad:

03.07.2012 US 201261667630 P

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

11.04.2018

73 Titular/es:

**ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE
LAUSANNE (EPFL) (100.0%)
EPFL-TTO EPFL Innovation Park J
1015 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**HUBBELL, JEFFREY A.;
MARTINO, MIKAËL y
BRIQUEZ, PRISCILLA SUHASNA MAITHILI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 663 230 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

Conjugados que contienen secuencias procedentes de factor de crecimiento placentario y su uso como componentes de biomateriales y en medicina

Campo técnico

- 5 El campo técnico, en general, se refiere a péptidos que se unen a matrices extracelulares a través de interacción de unión específicas.

Antecedentes

- 10 La matriz extracelular (ECM) proporciona soporte estructural para el tejido y capacidades de señalización para células. La ECM representa un papel importante en el desarrollo y en la reparación de tejidos. La técnica precedente, además de la otra técnica mencionada a lo largo de la descripción, está, por ejemplo, entre otros, en el documento WO 2005/016963; Faseb J. 24(12), diciembre 2010, páginas 4711, 4721 o Angiogenesis 13, 2008, páginas 215-221.

Sumario de la invención

- 15 Según se comunica en la presente, se ha descubierto que el factor de crecimiento placentario (PIGF) exhibe actividad de unión específica hacia la ECM. El PIGF es una citocina angiogénica que existe en múltiples variantes de empalme. El PIGF se identificó originalmente en la placenta, donde se ha propuesto que controla el crecimiento y la diferenciación del trofoblasto. El PIGF se expresa durante el desarrollo embrionario temprano. Se ha mostrado que el PIGF se expresa en el trofoblasto veloso, mientras que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se expresa en células de origen mesenquimal dentro de la placa coriónica. El PIGF se expresa en varios otros órganos
20 incluyendo el corazón, el pulmón, el tiroides, el músculo esquelético y el tejido adiposo. El PIGF actúa como un potente estimulador de la secreción de VEGF por monocitos e incrementa significativamente los niveles de ARNm de la quimiocinas proinflamatorias interleucina-1 beta, interleucina-8, proteína quimioatrayente de monocitos-1 y VEGF en células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos. El PIGF induce la angiogénesis tumoral al introducir células progenitoras hematopoyéticas y macrófagos circulantes a la zona de los tumores en crecimiento
25 (Ribatti D, 2008).

- Una realización es un polipéptido aislado que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, SEQ ID NO: 5 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, y subsecuencias de las mismas. Dichas subsecuencias se pueden elegir debido a que exhiben unión específica a una o más de fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina y fibrina. Por ejemplo, se puede especificar una constante de disociación en la que la unión específica del polipéptido a fibrinógeno tiene una constante de disociación (KD) de menos de aproximadamente 100 nM, o menos de aproximadamente 40 nM, o menos de aproximadamente 25 nM.
30

- Una realización es un vehículo de aporte biológico que comprende una fusión molecular de un agente biológico y un péptido que comprende una secuencia o subsecuencia de al menos 6 residuos de una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 que tiene de 0 a aproximadamente 15% de sustituciones conservativas y SEQ ID NO: 5 que tiene de 0 a aproximadamente 15% de sustituciones conservativas. Según se explica con más detalle en la presente, el péptido exhibe unión específica a una o más, o todas, de las moléculas de la matriz extracelular seleccionadas del grupo que consiste en fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina, fibrina, colágeno, colágeno I y sulfato de heparina. De hecho, los péptidos probado exhibían unión específica a todas las moléculas de la matriz extracelular. Ejemplos de agentes biológicos son los elegidos del grupo que consiste en una proteína, un fármaco proteínico, un marcador, un inmunoagente, una quimiocina, una citocina y un péptido de adhesión celular. El término citocina, según se usa en la presente, incluye factores de crecimiento y morfógenos.
40
45

- Una realización es un biomaterial que comprende una matriz, comprendiendo la matriz un polipéptido que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, SEQ ID NO: 5 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, y todas las subsecuencias de las mismas, exhibiendo dicho péptido unión específica a una molécula de la matriz extracelular. La matriz puede ser natural o sintética y estar covalentemente reticulada, reticulada sin uniones covalentes, o libre de reticulaciones.
50

- Una realización es un medicamento que comprende un péptido, un vehículo o un biomaterial que comprende un PIGF2, p. ej., un dominio de PIGF2. El medicamento se puede usar, p. ej., en un tratamiento médico, para elaborar una composición médica, p. ej., como una vacuna, para el aporte de fármacos, la curación de heridas y la curación de tejidos, p. ej., la curación de un hueso, una fístula o una úlcera.
55

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1: un dominio dentro de PIGF2 (PIGF2₁₂₃₋₁₄₄) se une fuertemente y promiscuamente a proteínas de la ECM. (a) GF que se une a proteínas del ECM, medido mediante ELISA. Una señal por encima de 0,1 (recuadro gris) se consideraba representativa de una unión específica. El PIGF2 se une fuertemente a todas las proteínas de la ECM probadas (barras grises). (b) Alineamiento de las secuencias proteínicas de las variantes de empalme PIGF2 y PIGF-1 (que no se une). El PIGF2 contiene un inserto de 21 aminoácidos adicional (PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, en gris) situado cerca del extremo C. (c) Unión de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ a proteínas de la ECM cuando están fusionadas a una proteína modélica que no se une, GST (GST-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄). Una versión desordenada de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (GST-PIGF2_{scr}) no se une a proteínas de la ECM. En (a) y (c), n ≥ 3, media ± EEM. El alineamiento muestra secuencias de PIGF-1 (PIGF-1 LPAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEHMFSPSCVSLLRCTGCCGDENLH CVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRCECRPLREKMKPERCGDAVPRR (SEQ ID NO: 58) en comparación con PIGF2 (LPAVPPQQWALSAGNGSSEVEVVPFQEVWGRSYCRALERLVDVVSEYPSEVEHMFSPSCVSLLRCTGCCGDENLHCVPVETANVTMQLLKIRSGDRPSYVELTFSQHVRCECRPLREKMKPERRRPKRGKRR REKQRPTDCHLCGDAVPRR, SEQ ID NO: 59).

FIGURA 2: Unión de diversos fragmentos de GST-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ a fibronectina, colágeno I, sulfato de heparano y neuropilina-1. (a) Diseño de fragmentos de GST-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. (b) Unión de fragmentos de GST-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ a fibronectina, colágeno I, sulfato de heparano y neuropilina-1. Los alineamientos representados incluyen fragmentos de GST-PIGF2: RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLCGDAVPRR (SEQ ID NO: 60), RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL (SEQ ID NO: 61), RRPKGRGKRRREKQRPTD (SEQ ID NO: 62), RRRPKGRGKRRREKQ (SEQ ID NO: 1), GKRRREKQ (SEQ ID NO: 2) y RRRPKGRG (SEQ ID NO: 3).

FIGURA 3: El dominio de unión a heparina de VEGF-A165 se sustituye por PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (recuadro negro) para generar VEGF-A121-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (SEQ ID NO: 7). PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se fusiona al extremo C de PDGF-BB para generar PDGF-BB-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (SEQ ID NO: 9) PIGF2₁₂₃₋₁₄₄* (recuadro gris) que contiene una mutación puntual (Cys₁₄₂ por Ser) está insertado en el extremo C de BMP-2 para generar BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄* (SEQ ID NO: 13).

FIGURA 4: tiene 2 paneles. (a) Citocinas-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) que se unen a proteínas de la ECM (fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina, colágeno I, fibrinógeno) y sulfato de heparano medidas mediante ELISA. Las placas de ELISA se revistieron con citocinas y se incubaron adicionalmente con proteínas de la ECM a una concentración creciente (de 0,02 a 320 nM). Las proteínas de la ECM unidas se detectaron usando anticuerpos. La curva de unión se ajustó mediante regresión no lineal para obtener la constante de disociación (K_D) usando A_{450 nm} = Bmáx*[concentración]/(K_D + [concentración]). n = 3, media ± EEM. (b) Citocinas-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) se retienen en una matriz de fibrina. Las matrices de fibrina se elaboraron en presencia de citocinas silvestres (PIGF-1, PIGF2, VEGF-A121, VEGF-A165, PDGF-BB y BMP-2) o citocinas modificadas (VEGF-A121-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, PDGF-BB-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, o BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) y se incubaron adicionalmente en 8 volúmenes de tampón fisiológico durante 7 días. El tampón se cambió todos los días y la liberación acumulativa de citocinas se cuantificó para cada día. PIGF-1, VEGF-A121, VEGF-A165, PDGF-BB y BMP-2 silvestres se liberaron rápidamente, mientras que VEGF-A121-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, PDGF-BB-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄* se secuestraban en la matriz.

FIGURA 5: GFs fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ in vitro muestra una bioactividad similar en comparación con GFs silvestres. (a) ECs humanas se estimularon con VEGF-A121, VEGF-A165 o VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, y (b) células madre mesenquimales humanas se estimularon con PDGF-BB o PDGF-BB-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. Receptores de GF (VEGFR-2 y PDGFR-β) fosforilados se cuantificaron mediante ELISA (n = 3, media ± EEM). La inserción del PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ en VEGF-A y PDGF-BB no altera su señalización. Por otra parte, la inserción de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ en VEGF-A121 incrementa su actividad hasta el nivel de VEGF-A165. Como es el caso para VEGF-A165, esta actividad incrementada sobre la fosforilación del receptor se debe lo más probablemente a la unión de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ a neuropilina-1, que incrementa la potencia de VEGF-A en la estimulación de la fosforilación de VEGFR-2 (Migdal M y cols., 1998; Pan Q y cols., 2007; Whitaker GB y cols., 2001). La prueba de la T de Student se usó para comparaciones estadísticas; *p<0,05, **p<0,01. (c) BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄* se evaluó por su capacidad para promover la actividad de ALP en células madre mesenquimales humanas (inducción de la diferenciación osteoblástica). La ALP celular se cuantificó después de 14 días de cultivo en presencia de BMP-2 o BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄*. No se observaron diferencias en el número de células y la actividad de ALP entre células tratadas con BMP-2 o BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄*. Los resultados se expresan como ng de ALP/10k células (n = 4, media ± EEM).

FIGURA 6: GFs fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ presentan una afinidad mejorada para componentes de la ECM. (a) Afinidad (se muestra K_D) de GFs silvestres frente a fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ para proteínas de la ECM y sulfato de heparano. n = 3, media ± EEM. (b-f) GFs fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se retienen en la zona de aporte durante un período prolongado con relación a GFs silvestres. (b) Retención de VEGF-A165 y VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ cuando se inyectan subcutáneamente en la piel dorsal de ratones. n = 6 por punto temporal, media ± EEM. (c-f) Retención de GF silvestres y fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ cuando se ponían en defectos de 5 mm de diámetro en la piel dorsal de ratones (c,d) o la bóveda craneal de ratones (e,f) rellenas con una matriz de fibrina. Retención después de 3 y 6

días en la matriz de fibrina (barras grises) y el tejido que circunda el defecto (barras negras, 2 mm más lejos). $n \geq 4$ por punto temporal, media \pm EEM. Para todos los paneles, prueba de la t de Student; $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

FIGURA 7: VEGF-A-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ y PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ inducen mayor curación de heridas cutáneas y angiogénesis que VEGF-A y PDGF-BB silvestres. (a-j) El aporte de dosis bajas (200 ng de cada uno combinados) de VEGF-A-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ y PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ promovía la curación de heridas cutáneas en ratones diabéticos, mientras que las mismas dosis de VEGF-A165 y PDGF-BB silvestres no lo hacían. Heridas cutáneas dorsales de profundidad completa (6 mm de diámetro) se trataron con GFs aportados tópicamente (el día 0, 3 y 6 para heridas analizadas el día 10; el día 0, 3, 6 y 9 para heridas analizadas el día 15) o aportados una vez en una matriz de fibrina. Se probaron seis grupos diferentes: *tópicamente*, vehículo de PBS sólo, VEGF-A165 + PDGF-BB y VEGF-A-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ + PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄; *en fibrina*, fibrina sólo, fibrina que contiene VEGF-A165 + PDGF-BB y fibrina que contiene VEGF-A-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ + PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄. Después de 10 y 15 días (grupos tópicos; a-b) o 7 y 10 días (grupos de fibrina; f-g), el cierre de heridas y la formación de tejido granular se evaluaron mediante histología. Todos los puntos son media \pm EEM ($n = 8-10$ heridas por grupo por punto temporal. Prueba de la t de Student; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). (c,h) Histología representativa a los 10 días para los grupos de fibrina y a los 15 días para los grupos tópicos (tinción con hematoxilina y eosina). Las flechas negras indican bordes de heridas; las flechas rojas indican puntas de lengua epitelial en curación. El tejido de granulación, teñido en violeta rosado. El músculo bajo las heridas se tiñe en rojo rosado. Barra de la escala = 1 mm. (d,e,i,j) Cuantificación de la angiogénesis dentro del tejido de granulación. Después de 10 y 15 días (grupos tópicos; d,e), o 7 y 10 días (grupos de fibrina; I,J), los tejidos heridos se tiñeron con respecto a ECs (células CD31⁺) y SMCs (células desmina⁺); la tinción doble indica morfología vascular estable ($n \geq 4$ por punto temporal, media \pm EEM). GFs silvestres se compararon con GFs fusionados a PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ usando la prueba de la t de Student; $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

FIGURA 8: VEGF-A-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ induce mucha menos permeabilidad vascular que la misma dosis de VEGF-A165 silvestre (10 μ g). (a) Los gráficos muestran una medida de la permeabilidad vascular en la piel de la oreja del ratón. $n \geq 4$, media \pm EEM. Para comparaciones estadísticas, VEGF-A165 se comparó con VEGF-A-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ usando la prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica; $*p < 0,05$. (b,c) Imágenes representativas de la vasculatura de la piel de la oreja del ratón 20 min después de la aplicación de VEGF-A. La permeabilidad inducida por VEGF-A se visualiza mediante la fuga de dextrano marcado en rojo de los vasos. Barra de la escala = 0,2 mm.

FIGURA 9: El aporte de PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ y BMP-2-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄* induce mayor regeneración ósea en la rata que PDGF-BB y BMP-2 silvestres. Defectos de la bóveda craneal de tamaño crítico (6 mm de diámetro) se trataron con GFs aportados tópicamente o en una matriz de fibrina. Se probaron seis grupos diferentes: *tópicamente*, vehículo de solución salina solamente, BMP-2 + PDGF-BB y BMP-2-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄* + PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄; y *en fibrina*, fibrina solamente, fibrina que contiene BMP-2 + PDGF-BB, y fibrina que contiene BMP-2-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄* + PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄. Las dosis eran 1 μ g de cada GF, combinados, para los grupos tratados tópicamente en la duramadre y 200 ng de cada GF, combinados, para los grupos con fibrina. (a-d) Cuatro semanas después del tratamiento, se midió la reparación ósea mediante μ CT como volumen de hueso y cobertura del defecto (a,b muestras grupos tópicos; c,d muestras grupos de fibrina). (e-j) Reconstrucciones de la bóveda craneal representativas. e, vehículo de solución salina; f, BMP-2 + PDGF-BB; g, BMP-2-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄* + PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄; h, fibrina solamente, i, fibrina con BMP-2 + PDGF-BB; j, fibrina con BMP-2-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄* + PDGF-BB-PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄. El área defectuosa está sombreada. Los datos son medias \pm EEM ($n = 6$ por condición). Para las comparaciones estadísticas, GFs silvestres se compararon con GFs fusionados a PIGF₂₁₂₃₋₁₄₄ usando la prueba de la t de Student; $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

Descripción detallada

Según se comunica en la presente, se ha descubierto que el factor de crecimiento placentario (PIGF) exhibe actividad de unión específica hacia ECM. Aspectos de la invención incluyen polipéptidos de PIGF, fusiones moleculares de PIGF para el aporte de productos biológicos, biomateriales que incorporan PIGF y aporte de fármacos. Los polipéptidos de PIGF pueden incluir o estar limitados, p. ej., a uno o más dominios o fragmentos de PIGF.

La presente invención incluye las siguientes realizaciones específicas:

1. Un vehículo de aporte biológico que comprende

una fusión molecular de un péptido y un agente biológico que comprende un primer dominio de unión a heparina,

en donde el péptido comprende un segundo dominio de unión a heparina que comprende un péptido que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, y subsecuencias de SEQ ID NO: 4 que tienen un truncamiento de no más

- de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4, exhibiendo dicho péptido unión específica a fibrinógeno.
2. El vehículo de la realización 1 con el péptido que exhibe unión específica a fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina, fibrina y sulfato de heparano.
- 5 3. El vehículo de la realización 1 o 2, en el que el péptido tiene una unión específica a fibrinógeno con una constante de disociación (KD) de menos de aproximadamente 40 nM.
4. El vehículo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el agente biológico se elige del grupo que consiste en una proteína, un fármaco proteínico, un marcador, un inmunoagente, una quimiocina, una citocina y un péptido de adhesión celular.
- 10 5. El vehículo de cualquiera de las realizaciones 1-4, en el que la fusión molecular comprende una proteína recombinante que comprende el agente biológico y el péptido.
6. El vehículo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente biológico tiene un dominio de unión a heparina endógeno que proporciona dicho primer dominio de unión a heparina y comprende una citocina elegida del grupo que consiste en factores de crecimiento epidérmico (EGFs), VEGFs, VEGF-A, PDGFs, PDGF-AB, PDGF-BB, FGFs, FGF-2, FGF-18, BMPs, BMP-2, BMP-7, TGF- β s, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, NT-3 y BDNF o en el que el agente biológico comprende una quimiocina elegida del grupo que consiste en CXCL12 y CCL21.
- 15 7. El vehículo de cualquiera de las realizaciones 1-6, que comprende un inmunoagente o un péptido de adhesión celular.
8. Una biomolécula que comprende una citocina que comprende un primer dominio de unión a heparina y un dominio de PIGF2 que comprende un segundo dominio de unión a heparina que comprende un péptido que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, y subsecuencias de SEQ ID NO: 4 que tienen un truncamiento de no más de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4 .
- 20 9. La biomolécula de la realización 8, en la que un dominio de unión a heparina endógeno de la citocina se ha retirado o inhabilitado.
- 25 10. La biomolécula de la realización 8 o la realización 9, en la que la citocina tiene unión específica a una molécula de la matriz extracelular seleccionada del grupo de fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina y fibrina.
11. La biomolécula de la realización 10, en la que la constante de disociación de la unión de la biomolécula citocina con fibrinógeno es menor de 50% de una constante de disociación de unión de la citocina no derivada a fibrinógeno.
- 30 12. La biomolécula de cualquiera de las realizaciones 8-11, en donde la citocina se selecciona del grupo que consiste en factores de crecimiento epidérmico (EGFs), VEGFs, VEGF-A, PDGFs, PDGF-AB, PDGF-BB, [[los]] FGFs, FGF-2, FGF-18, BMPs, BMP-2, BMP-7, TGF- β s, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, NT-3 y BDNF.
13. La biomolécula de cualquiera de las realizaciones 8-12, en donde la biomolécula es una proteína de fusión o una fusión molecular que comprende además un agente biológico.
- 35 14. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, y subsecuencias de SEQ ID NO: 4 que tienen un truncamiento de no más de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4, exhibiendo dicho péptido unión específica a fibrinógeno, con la condición de que dicho polipéptido no exista en la naturaleza.
- 40 15. Un biomaterial que comprende una matriz, comprendiendo la matriz
- un péptido que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 y subsecuencias de SEQ ID NO: 4 que tienen un truncamiento de no más de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4, que tiene de 0 a
- 45 aproximadamente 15% sustituciones conservativas,

exhibiendo dicho péptido unión específica a la matriz.

16. El biomaterial de la realización 15 que comprende un dominio de la matriz extracelular que se une específicamente al péptido.

5 17. El biomaterial de las realizaciones 15 o 16, que comprende además una fusión molecular del péptido y un agente biológico.

10 18. El biomaterial de la realización 17, en donde el agente biológico comprende una citocina seleccionada del grupo que consiste en factores de crecimiento epidérmico (EGFs), VEGFs, VEGF-A, VEGF-C, PDGFs, PDGF-AB, PDGF-BB, los FGFs, FGF-2, FGF-18, IGFs, IGF-1, BMPs, BMP-2, BMP-7, TGF- β s, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, neurotrofinas, NT-3 y BDNF o una quimiocina elegida del grupo que consiste en interferones, INF- γ , CXCL quimiocinas, CXCL10, CXCL11, CXCL12, quimiocinas CCL, y CCL21.

19. El biomaterial de la realización 17, en donde el agente biológico comprende un inmunoagente o un péptido de adhesión celular.

15 20. El biomaterial de cualquiera de las realizaciones 14-19, que comprende además una pluralidad de fusiones moleculares, teniendo cada una de la pluralidad de las fusiones un agente biológico distinto fusionada a al menos uno de los péptidos.

21. Un medicamento que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable de cualquiera de las realizaciones 1-7, la biomolécula de cualquiera de las realizaciones 8-13, el polipéptido de la realización 14 o el biomaterial de cualquiera de las realizaciones 15-20.

22. Un medicamento que comprende la biomolécula de cualquiera de las realizaciones 8-13.

20 23. Una vacuna que comprende cualquiera de las realizaciones de las realizaciones 1-21.

24. Una matriz o un sistema que comprende cualquiera de las realizaciones de las realizaciones 1-23, para aporte de fármacos, vacunación, curación de heridas o curación de huesos.

Fibronectina

25 La fibronectina (FN) es expresada ampliamente por múltiples tipos de células y es críticamente importante en muchos procesos dependientes de la ECM (*Krammer A y cols., 2002*) en los vertebrados, al representar papeles importantes en la adhesión, la migración, el crecimiento y la diferenciación celulares (*Mao Y y Schwarzbauer JE, 2005; Pankov R y Yamada KM, 2002*). FN es una glicoproteína dímera compuesta por dos subunidades de 230-270 kDa casi idénticas conectadas covalentemente cerca de sus extremos C por un par de enlaces disulfuro. Cada subunidad consiste en tres tipos de módulos repetitivos, tipo I, II y III. Estos módulos comprenden dominios
30 funcionales que median en interacciones con otros componentes de la ECM, con receptores de la superficie celular y con la propia FN. La FN contiene 12 repeticiones de tipo I, 2 repeticiones de tipo II y 15-18 repeticiones de tipo III. La FN se puede subdividir en dos formas, FN plasmática soluble FN (constituyente soluble abundante del plasma [300 μ g/ml]) y FN celular menos soluble. La FN plasmática es secretada por hepatocitos y está enriquecida en la sangre mientras que la FN celular es secretada por fibroblastos y muchos otros tipos de células y se incorpora en una matriz
35 fibrilar en la superficie celular. La FN celular consiste en un grupo mucho mayor y más heterogéneo de isoformas de FN que dan como resultado patrones de empalme específicos del tipo de célula que producen FNs con diferentes propiedades adhesivas para células, de unión a ligandos y de solubilidad que proporcionan un mecanismo para que las células alteren precisamente la composición de la ECM de un modo específico del desarrollo y el tejido.

40 La FN es un ligando para varios miembros de la familia de receptores de integrinas. La secuencia de reconocimiento mejor estudiada, el tripéptido RGD, está situada en la 10ª repetición de tipo III (FN III10). El reconocimiento de esta secuencia tripeptídica simple es complejo y depende de los residuos de flanco, su presentación tridimensional y las características individuales de los bolsillos de unión a integrina. Por ejemplo, un segundo sitio en la 9ª repetición de tipo III (FN III9), el "sitio sinérgico" que comprende el pentapéptido PHSRN (SEQ ID NO: 50) (*Mardon HJ y Grant
45 KE, 1994*), promueve la unión de integrina α 5 β 1 específica a FN y en FN III9-10, a través de interacciones con la subunidad α 5 (*Mould AP y cols., 1997*) mientras que la unión de la integrina α v β 3 a RGD es independiente del sitio sinérgico (*Danen EH y cols., 1995*). La integrina α 5 β 1 es el receptor inicial que media en el ensamblaje de FN en la formación de la matriz fibrilar (*Mao Y y Schwarzbauer JE, 2005; Pankov R y Yamada KM, 2002*).

50 Además de un unión a integrina, la FN también se une a citocinas. El segundo dominio de unión a heparina de FN (FN III12-14) se une a la mayoría de los factores de crecimiento (citocinas capaces de estimular el crecimiento

celular) procedentes de las familias de factores de crecimiento derivados de plaquetas y factores de crecimiento fibroblásticos, y algunos factores de crecimiento procedentes de las familias de factores de crecimiento transformantes beta y neurotrofinas (*Martino MM y Hubbell JA, 2010*).

5 Aunque las moléculas de FN son el producto de un solo gen, la proteína resultante puede existir en múltiples formas que surgen de un empalme alternativo de un solo pre-ARNm que puede generar tanto como 20 variantes en FN humana. Un tipo principal de empalme se produce dentro del grupo central de repeticiones de tipo III (FN III7 a FN III15). La utilización o el salto de exones conduce a la inclusión o exclusión de cualquiera de dos repeticiones de tipo III - EDB (también denominado EIIIB o EDII y situado entre las repeticiones de FN III7 y III8) y EDA (también llamado EIIIA o EDI y situado entre las repeticiones III11 y III12 de FN). Los dominios EDA y EDB alternativamente empalmados casi siempre están ausentes de FN plasmática. Se ha presentado la unión de $\alpha_4\beta_1$ así como $\alpha_9\beta_1$ a una secuencia EDGIHEL (SEQ ID NO: 51) situada dentro del segmento de EDA alternativamente empalmado, sugiriendo una posible función adhesiva para la especie de FN que contiene EDA incrementado. EDA de FN se ha explorado como una plataforma para vacunas subunitarias. Basándose en la observación de que EDA de FN se liga a y activa el receptor de tipo Toll 4 (TLR4), un grupo de investigadores ha explorado usar EDA de FN como un DAMP adyuvantes en vacunas subunitarias, generando la proteína de fusión EDA de FN III-antígeno (Lasarte JJ y cols., 2007). Una proteína de fusión que contiene EDA y el epítipo del MHC I SIINFEKL derivaba de ovoalbúmina en el extremo C así como una proteína de fusión que contiene EDA y la presentación de ovoalbúmina mejorada de ovoalbúmina completa por DCs y una respuesta citotóxica inducida in vivo. Se mostró que estas proteínas recombinantes de EDA protegen a los ratones de una estimulación con células tumorales que expresan ovoalbúmina. A pesar de un efecto útil de EDA de FN en vacunas subunitarias recombinantes, la capacidad como adyuvante de EDA de FN no ha sido adecuada para conferir protección en modelos de estimulación viral en el ratón (Mansilla C y cols., 2009). En efecto, una combinación con otro adyuvante, poli(I:C), y anti-CD40 era necesaria para regular a la baja la expresión intrahepática de ARN del virus de la hepatitis. Como tal, se ha encontrado que el EDA de FN es insuficientemente potente para las técnicas de vacunología.

Tenascina C

La tenascina C (TNC) es una glicoproteína multifuncional grande de la matriz extracelular que está presente durante el desarrollo y se reexpresa en la vida adulta en caso de remodelación tisular, tal como curación de heridas (*Trebaul A y cols., 2007*), cáncer (*Orend G, 2005*) e inflamación (*Udalova IA y cols., 2011*). Durante el desarrollo, la tenascina C representa un papel muy restringido y dinámico en el diseño de redes neurales y vasculares y el esqueleto. Se ha mostrado que afecta a la adhesión, la proliferación y la migración celulares a través de interacción directa con células o indirectamente a través de la unión a otras moléculas de la matriz extracelular, tales como fibronectina (*Jones FS y Jones PL, 2000*).

35 En un organismo adulto sano, la tenascina C se produce de un modo estrechamente controlado, rápido y transitorio y está contenida en localizaciones específicas en las que es necesaria la reparación tisular, tal como curación de heridas y regeneración nerviosa (*Joester A y Faissner A, 2001*), y se necesita resolver una infección (*Udalova IA y cols., 2011*). Sin embargo, el caso de producción descontrolada de tenascina C, esta molécula se hace patológica dando como resultado un crecimiento de tejido anormal, tal como cáncer, reestenosis después de angioplastia coronaria percutánea (*Imanaka-Yoshida K y cols., 2001*) e implantación de endoprótesis vasculares, enfermedades fibróticas, heridas crónicas, enfermedades cardiovasculares (*Golledge J y cols., 2011*) y enfermedades autoinmunitarias (*Udalova IA y cols., 2011*). Recientemente, la tenascina C se ha relacionado con lesión cardíaca y arterial, angiogénesis y metástasis tumorales (*O'Connell JT y cols., 2011; Oskarsson T y cols., 2011*), así como en la modulación del comportamiento de las células madre (*Midwood KS y cols., 2011*). En el caso de las metástasis del cáncer, se ha mostrado que las células cancerosas, responsable de las metástasis, producen tenascina C, con inhibición de esta producción de tenascina C que da como resultado una reducción de las metástasis (*Oskarsson T y cols., 2011*). Por lo tanto, la tenascina podría ser una diana importante en el desarrollo de tratamientos diagnósticos y terapéuticos, especialmente cuando funciones particulares en esta molécula grande se pueden definir y localizar en una región específica reducida.

50 La tenascina C humana es un hexabranquión unido por disulfuro que contiene 4 dominios principales: En primer lugar, un dominio de ensamblaje en el extremo N forma una estructura de superhélice y enlaces disulfuro intercatenarios que media en la formación de hexámeros. En segundo lugar, se ha mostrado que una serie de 14,5 repeticiones similares al factor de crecimiento epidérmico, que tienen una longitud de entre 30 y 50 aminoácidos y cada una contiene seis cisteínas, obtienen propiedades antiadhesivas. En tercer lugar, una serie de 15 repeticiones de fibronectina tipo III, que tienen una longitud de aproximadamente 90 aminoácidos y forman dos láminas de hebras beta antiparalelas, contienen varias regiones de unión a integrina (*Jones FS y Jones PL, 2000*). En cuarto lugar, un dominio globular similar a fibrinógeno está situado en el extremo C (*Midwood KS y cols., 2011; Udalova IA y cols., 2011*). Se ha mostrado que este dominio globular similar a fibrinógeno antagoniza a TLR4 (*Midwood K y cols., 2009*). Como tal, este dominio es una señal de peligro para el cuerpo e inicia reacciones inmunológicas.

La región del dominio de fibronectina tipo III de la tenascina ha mostrado una gran variabilidad debido a un empalme alternativo dependiendo de la fuente de TNC (*Jones FS y Jones PL, 2000*). Los números (x-y) de dominios de

fibronectina tipo III de TNC se definirán en este informe como TNC IIIx-y. El dominio TNC III3 (*Peng Q y cols., 2009*) contiene un péptido RGD y múltiples dominios de unión a integrina (por ejemplo: $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_3\beta_6$, $\alpha_8\beta_1$ (*Yokosaki Y y cols., 1998*), $\alpha_x\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$) (para una gran variedad de tipos de células (por ejemplo: células del músculo liso, células endoteliales, neuronas, astrocitos, glioma) (*Jones FS y Jones PL, 2000*). Se ha demostrado que el dominio TNC III5 se une a heparina (*Weber P y cols., 1995*). Según se comunica en la presente, se ha mostrado que el dominio TNC III5, y dominios más largos que comprenden el dominio TNC III5 tales como TNC III1-5 y TNC III3-5, se unen a quimiocinas.

Fibrinógeno y fibrina

El fibrinógeno es una glicoproteína plasmática soluble que es sintetizada por el hígado y la proteína precursora durante la coagulación sanguínea. La enzima proteolítica trombina, factor de coagulación II, polimerizará fibrinógeno en fibrina durante la coagulación al escindir fibrinopéptidos de su dominio central, evitando el automontaje fisicoquímico o la polimerización de la molécula (*Weisel JW, 2007*). La fibrina es reticulada químicamente secuencialmente por el factor XIIIa formando la proteína estructural primaria de un coágulo sanguíneo viscoelástico (*Mosesson MW, 2005*), y funcionando como una red proteínica provisional especializada que se forma principalmente en la reparación tisular espontánea. La estabilidad de la fibrina depende de su interacción con componentes moleculares/celulares del sistema hemostático (*Hantgan RR y cols., 1994*). Además de la reticulación de fibrina en sí misma, el factor XIIIa reticula otras proteínas adhesivas en el coágulo sanguíneo. La fibrina se puede unir a varios receptores de adhesión celular tales como integrinas y promueve notablemente la adhesión de plaqueta y leucocitos tales como monocitos y neutrófilos (*Flick MJ y cols., 2004; Ugarova TP y Yakubenko VP, 2001*).

Las matrices de fibrina fueron uno de los primeros biomateriales usados para prevenir las hemorragias y promover la curación de heridas (*Janmey PA y cols., 2009*). La fibrina está disponible de fuentes autólogas y de plasma sanguíneo humano reunido crioprecipitado. Actualmente, la fibrina es uno de los hidrogeles más usados en el entorno clínico. La estructura fibrilar compleja y el carácter reticulado de la matriz de fibrina pueden estar controlados por los detalles de su formación (*Lorand L y Graham RM, 2003; Standeven KF y cols., 2007; Weisel JW, 2004*). De forma importante, en contraste con las matrices de colágeno fibrilares en las que se produce migración celular a través de mecanismos que son tanto dependientes como independientes de la degradación proteolítica, la migración celular en la fibrina es casi exclusivamente dependiente de la actividad proteolítica asociada a células (esencialmente a partir de plasmina y metaloproteinasas de matriz (*Mosesson MW, 2005*)). Una de las principales ventajas de la fibrina es que varias proteínas se incorporan naturalmente en la matriz de fibrina durante la coagulación, tales como fibronectina e inhibidor de alfa-2-plasmina, mediante reticulación covalente a través de la transglutaminasa factor XIIIa (*Mosesson MW, 2005*). Por lo tanto, esta reacción natural se puede explotar fácilmente para funcionalizar la fibrina con múltiples moléculas de señalización celular (*Patterson J y cols., 2010; Schense JC y Hubbell JA, 1999*). Además, se sabe que el fibrinógeno posee interacciones específicas con factor de crecimiento fibroblástico (FGF)-2, VEGF-A165 y proteína de unión a factor de crecimiento insulinoide (IGFBP)-3 (*Peng H y cols., 2004; Sahni A y cols., 1998; Sahni A y cols., 2006; Werner S y Grose R, 2003*).

La fibrina es una matriz de base útil, y los péptidos que se unen a heparina y las fusiones moleculares descritos en la presente se pueden usar con la misma. Otros materiales también se pueden manipular para incluir TG o restos que interactúan con transglutaminasas para recibir una fusión molecular de TG. Se mencionan los documentos US 7241730, 6.331.422, US 6.607.740, US 6.723.344, US Pub 2007/0202178, US Pub 2007/0264227. Las matrices de fibrina se someten a degradación mediante proteasas *in vivo*, y los inhibidores de proteasas se formulan frecuentemente en matrices de fibrinógeno / fibrina para prolongar su vida útil *in vivo*. Esto hace a las matrices de fibrina más útiles en aplicaciones de adhesivos y selladores tisulares, y en aplicaciones de manipulación tisular. Uno de tales inhibidores de proteasas es la aprotinina. Una forma de unión a fibrina de la aprotinina se ha manipulado al incluir un sustrato de factor XIIIa dentro de una proteína de fusión que comprende aprotinina (*Lorentz KM y cols., 2011*).

Las matrices son útiles para propósitos de liberación sostenida de fármacos. Los fármacos se pueden atrapar en la matriz y difundirse lentamente desde la matriz. La afinidad se puede manipular entre un fármaco y los componentes de la matriz. Por ejemplo, la afinidad a heparina se ha usado para prolongar la liberación de citocinas que se unen a heparina desde matrices basadas en fibrina, incorporando sitios de unión para heparina en la matriz de fibrina y empleando heparina como un producto intermedio en esa reacción de unión (*Sakiyama SE y cols., 1999*).

Reparación y regeneración tisular

Después del daño, la reparación o regeneración tisular es el resultado de una coordinación espaciotemporal de procesos con destino a células que son controlados por una multitud de episodios de señalización celular procedentes del microambiente extracelular y células incorporadas en la zona de la lesión (*Gurtner GC y cols., 2008*). Dentro de un contexto biomecánico proporcionado por este medio elástico (*Discher DE y cols., 2009*), las células se adhieren mediante interacciones mediadas por receptores con componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina y laminina (entre muchos otros), mediadas por receptores de adhesión especializados tales como integrinas y otros (*Berrier AL y Yamada KM, 2007*). Estos receptores transmiten estrés desde la matriz extracelular, a través de la membrana, hasta el citoesqueleto dentro de la célula de un modo dinámico y concertado

(Hinz B, 2009). Sin embargo, los receptores de la adhesión hacen mucho más que transmitir estrés; en particular dentro de aglomerados de receptores de la adhesión en la membrana, la transducción de señales bioquímicas tiene lugar a través de activación de cinasas y otros mecanismos (Berrier AL y Yamada KM, 2007; Hinz B, 2009). Además de las proteínas de adhesión, la matriz extracelular también secuestra y presenta un número de moléculas morforreguladoras incluyendo morfógenos, citocinas y factores de crecimiento, que controlan procesos de división y/o migración y/o diferenciación celulares, y/o morfogénesis multicelular (Discher DE y cols., 2009; Schultz GS y Wysocki A, 2009). Los morfógenos, las citocinas y los factores de crecimiento son poderosas moléculas de señalización solubles, debido a que pueden cambiar el destino celular e inducir la morfogénesis tisular directamente. El término morfógeno se usa principalmente en biología de desarrollo para describir un tipo particular de molécula de señalización que puede inducir una respuesta celular de un modo dependiente de la concentración (Affolter M y Basler K, 2007), mientras que las citocinas y quimiocinas (quimiotaxis inductora de citocinas pequeñas) son proteínas reguladoras esenciales para el desarrollo y el funcionamiento de una respuesta inmunitaria tanto innata como adaptiva (Rossi D y Zlotnik A, 2000; Vilcek J y Feldmann M, 2004). Por definición, los factores de crecimiento son capaces de inducir crecimiento celular, además de otra respuesta celular tal como migración y diferenciación (Cross M y Dexter TM, 1991). Un factor de crecimiento puede ser bien un morfógeno o bien una citocina.

Por ejemplo, citocinas clave implicadas en la morfogénesis tisular incluyen factores de crecimiento endotelial vascular (VEGFs), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs), factores de crecimiento fibroblásticos (FGFs), factores de crecimiento insulinoides (IGFs), proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), factores de crecimiento transformantes beta (TGF-βs) y neurotrofinas (β-NGF, NT-3, BDNF). Muchas citocinas se unen a componentes de la matriz extracelular tales como proteoglicanos de sulfato de heparano (Lindahl U y Li JP, 2009) y residen allí hasta que son liberadas por procesos enzimáticos o disociación. Estos factores, cuando se liberan y a veces también cuando están unidos a la matriz (Makarenkova HP y cols., 2009), se unen a receptores de la superficie celular y desencadenan la señalización, principalmente a través de activación de cinasas. Así, la matriz extracelular sirve como una reserva de moléculas de señalización, tanto moléculas de adhesión como citocinas, que instruyen procesos de decisión celular. La angiogénesis, la morfogénesis multicelular y la diferenciación de células madre son procesos celulares que están estrechamente controlados por la matriz extracelular y citocinas, y especialmente por su señalización cooperativa. Debido a que la reparación tisular es conducida por estos procesos, la función de la matriz extracelular guía el diseño de biomateriales en la manipulación tisular y la medicina regenerativa, con el objetivo global de mimetizar las siguientes características clave: la presentación de moléculas de adhesión y la liberación de citocinas.

Vacunología

Según se menciona anteriormente, las citocinas representan un papel fundamental en la morfogénesis tisular. Las citocinas también representan un papel fundamental en la inmunología, al regular la proliferación, la maduración y la migración de diferentes tipos de células inmunitarias, conduciendo así la respuesta inmunitaria apropiada a diferentes tipos de antígenos. La citocina TGF-β es una citocina particularmente importante en inmunología.

Las quimiocinas son proteínas pequeñas que también representan papeles fundamentales en la inmunología. Entre las quimiocinas, el interferón-γ (IFN-γ) es una quimiocina inmunomoduladora crítica para la inmunidad innata y adaptiva contra antígenos virales y bacterianos y para el control de tumores. IFN-γ es expresado principalmente por células citolíticas naturales (NK) y células T citolíticas naturales (NKT) como parte de la respuesta inmunitaria innata, y por células T CD4 y CD8 durante la respuesta inmunitaria adaptiva. IFN-γ es la quimiocina más importante para regular el equilibrio entre células Th1 y Th2: las células Th1 expresan IFN-γ, que a su vez provoca la diferenciación de Th1 y la supresión de la diferenciación de Th2. La diferente respuesta celular a IFN-γ son activadas por su unión a un receptor heterodímero (IFNGR1 e IFNGR2) que activa la ruta de señalización JAK/STAT1. La activación de esta señalización intracelular desencadena la expresión de múltiples genes aguas abajo, entre ellos la quimiocina proteína 10 inducida por interferón gamma (CXCL10) y ligando 11 de quimiocina (motivo C-X-X) (CXCL11). Estas dos quimiocinas provocan su efecto al unirse al receptor de CXCR3 sobre la superficie celular y se consideran potentes quimioatrayentes para monocito/macrófagos, células dendríticas, células NK y T, respectivamente.

En vacunología, los antígenos son dominios peptídicos o proteínicos o proteínas enteras de origen patógeno o propio (Hubbell JA y cols., 2009). Los antígenos vacunales en enfermedades infecciosas se basan en proteínas encontradas en los patógenos de interés, tales como antígenos de la gripe o antígenos de la tuberculosis. El número de antígenos buscados como diana en una enfermedad infecciosa, en vacunas tanto profilácticas como terapéuticas, es muy grande. Los antígenos vacunales en el cáncer se basan en proteínas encontradas en el tipo de célula tumoral, tales como el antígeno survivina que se va a expresar altamente en muchos tipos de tumores o el antígeno TRP-2 expresado en melanocitos y una diana para la vacunación del cáncer en el melanoma. El número de antígenos elegidos como diana en el cáncer es muy grande.

Se puede elaborar una vacuna que comprenda un dominio de PIGF2 y un antígeno, a modo de ejemplo un vehículo o una matriz según se describe en la presente. El PIFG2 proporciona ligación a tejido natural o ECM en la matriz. Una composición vacunal puede comprender adyuvantes, señales de peligro y/o quimiocinas, que pueden ser parte de una matriz, una fusión molecular que comprende un dominio de PIGF2, o se pueden añadir además del PIFG2.

PIGF

Se describen en la presente péptidos que son miméticos de un dominio procedente de PIGF2. La citocina PIGF existe en múltiples isoformas. PIGF2 es una isoforma alargada de PIGF-1, que contiene una inserción de secuencia RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL (SEQ ID NO: 4) en el ser humano, RRKTKGKRKRSRNSQTEEPHP (SEQ ID NO: 5) en el ratón y secuencias relacionadas en otras especies de mamífero. En la presente, se presenta el sorprendente descubrimiento inesperado de que este péptido se une muy fuertemente a fibrinógeno y fibrina, así como a las proteínas de la matriz extracelular fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina C, y hasta un menor grado colágeno I. Este dominio se denomina el PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. El término dominio de PIGF2 se usa para referirse a este dominio y a subdominios que demuestran unión específica para la matriz extracelular. La fuerte unión entre el PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y fibrinógeno/fibrina se puede usar para unirse a proteínas que comprenden PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, incluyendo fármacos y antígenos proteínicos, en matrices de fibrina. La fuerte unión entre PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y fibrinógeno/fibrina y/o proteínas de la matriz extracelular se puede usar para prolongar la presencia de proteínas que comprenden PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ que se han administrado en matrices de fibrina, que se han administrado sobre o dentro de la zona de una lesión, o que se han administrado sobre o dentro de una zona de tejido. La fuerte unión entre el dominio de PIGF2 y proteínas de la matriz extracelular se puede usar para prolongar la retención de proteínas que comprenden el dominio de PIGF2 en tejidos en virtud de la unión a la matriz extracelular endógenamente presente en la zona del tejido o la lesión tisular. La afinidad descubierta entre PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y fibrinógeno/fibrina y la afinidad que existe entre PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y moléculas de la matriz extracelular conduce a un número de realizaciones preferidas.

El término PIGF2 o dominio de PIGF2 incluye los péptidos de SEQ ID NO: 4 y 5, y subsecuencias de los mismos, así como las variaciones de esas secuencias. SEQ ID NO: 4 y 5 son realizaciones de un dominio de PIGF2. Realizaciones adicionales de un dominio de PIGF2 incluyen sustituciones conservativas de las secuencias y también formas truncadas, con residuos N-terminales y/o C-terminales que están truncados. La identificación de truncamientos puede ser realizada fácilmente por el experto leyendo la presente divulgación. El número de residuos consecutivos que proporcionan unión específica está entre aproximadamente 4 y aproximadamente 15 residuos, con secuencias más largas que también muestran unión específica. Según esto, realizaciones de PIGF2 incluyen un polipéptido aislado que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, SEQ ID NO: 5 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, y subsecuencias de las mismas, exhibiendo dichas subsecuencias unión específica a uno o más de: fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina y fibrina. Las subsecuencias incluyen todas las subsecuencias con una longitud de 4 a 15 residuos, p. ej., todas las subsecuencias de 4, 5, 6 y 7 residuos y todas las subsecuencias de 7-12 y todas las de 5-15 residuos. El valor de la constante de disociación para las secuencias es bajo, p. ej., en donde la unión específica del polipéptido a fibrinógeno tiene una constante de disociación (KD) de menos de aproximadamente 40 nM. Por otra parte, frecuentemente se puede realizar la sustitución de L-aminoácidos en la secuencia descubierta por D-aminoácidos, como en Giordano.

En referencia a la Figura 2, panel a, los datos para las subsecuencias de prueba de la PIGF2₁₂₃₋₁₅₂ mostraban que los fragmentos de 7 residuos retenían la unión específica para la matriz extracelular (ECM). Sin embargo, los fragmentos mayores mostraban una afinidad superior. Estos datos indican que se puede esperar razonablemente que las secuencias más cortas muestren unión específica a una ECM apropiada, incluyendo todas las subsecuencias de cuatro o más residuos. Además, se sabe en las técnicas biológicas que muchas secuencias son eficaces cuando son parte de moléculas incluso muy grandes, p. ej., el motivo de adhesión a células RGD. Aunque algunas moléculas se pliegan de un modo que confunda la unión específica de estas secuencias relativamente pequeñas, los técnicos están muy familiarizados con técnicas para crear moléculas incluso muy grandes que emplean estas secuencias de un modo eficaz. Por una parte, hay un cierto número de biomoléculas naturales que pueden tener una o más de estas secuencias presentes como resultado de una oportunidad aleatoria, considerando que hay muchas biomoléculas naturales y sólo aproximadamente 20 aminoácidos naturales. Se debe suponer que estas secuencias no son activas para la unión específica debido a que estas biomoléculas se han adaptado evolutivamente para efectuar funciones específicas. La unión a la ECM es una función específica presente en la naturaleza muy importante que no se debe atribuir a biomoléculas particulares sin una evidencia biológica adecuada en estos casos.

La mayoría de los motivos de adhesión pueden sufrir algunas sustituciones conservativas y retener la funcionalidad. Aunque no todas estas sustituciones serán eficaces, estos cambios a menudo son eficaces. Hay una variedad de cambios conservativos que generalmente se pueden realizar en una secuencia de aminoácidos sin alterar la actividad. Estos cambios se denominan sustituciones o mutaciones conservativas; esto es, un aminoácido perteneciente a un agrupamiento de aminoácidos que tiene un tamaño o una característica particular se puede sustituir por otro aminoácido. Los sustitutos de una secuencia de aminoácidos se puede seleccionar de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. No se espera que estas alteraciones afecten al peso molecular aparente según se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o el punto isoeléctrico. Las

sustituciones conservativas también incluye sustituir isómeros ópticos de las secuencias por otros isómeros ópticos, específicamente D-aminoácidos por L-aminoácidos para uno o más residuos de una secuencia. Por otra parte, todos los aminoácidos de una secuencia pueden sufrir sustitución de isómeros D por L. Sustituciones conservativas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Lys por Arg y viceversa para mantener una carga positiva; Glu por Asp y viceversa para mantener una carga negativa; Ser por Thr de modo que se mantenga un OH libre; y Gln por Asn para mantener un NH₂ libre. Por otra parte, en algunos casos se pueden realizar mutaciones puntuales, eliminaciones e inserciones de las secuencias polipeptídicas o las correspondientes secuencias de ácido nucleico son una pérdida de función del fragmento de polipéptido o ácido nucleico. Las sustituciones pueden incluir, p. ej., 1, 2, 3 o más residuos. Los residuos de aminoácido descritos en la presente emplean bien el indicador de aminoácido de una sola letra o bien la abreviatura de tres letras. Las abreviaturas usadas en la presente están de acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos estándar, J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559. Todas las secuencias de residuos de aminoácidos están representadas en la presente por fórmulas con orientación a izquierda y derecha en la dirección convencional del extremo amino al extremo carboxi. Según esto, se contemplan sustituciones conservativas de los péptidos indicados en la presente y se pueden describir en cuanto a la cantidad, p. ej., de 1 a 5, o el porcentaje, p. ej., de 0% a 33%. Los expertos apreciarán inmediatamente que se contemplan todos los valores e intervalos dentro de los límites expresamente indicados, p. ej., aproximadamente 5%, 7 aproximadamente % o aproximadamente 15%. En el caso de 1 sustitución en 7 residuos, la sustitución es 14,2%, que es aproximadamente 15%. En el caso de 2 sustituciones en 22, el porcentaje es 9,1, que es aproximadamente 10%.

Ciertas realizaciones proporcionan diversas secuencias polipeptídicas y/o polipéptidos purificados o aislados. Un polipéptido es un término que se refiere a una cadena de residuos de aminoácido, independientemente de la modificación postraduccional (p. ej., fosforilación o glicosilación) y/o la complejación con polipéptidos adicionales, la síntesis en complejos multisubunitarios, con ácidos nucleicos y/o carbohidratos, u otras moléculas. Por lo tanto, los proteoglicanos también se denominan en la presente polipéptidos. Según se usa en la presente, un "polipéptido funcional" es un polipéptido que es capaz de promover la función indicada. Los polipéptidos se pueden producir mediante un número de métodos, muchos de los cuales son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden obtener mediante extracción (p. ej., de células aisladas), mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido, o mediante síntesis química. Los polipéptidos se pueden producir, por ejemplo, mediante tecnología recombinante, y vectores de expresión que codifican el polipéptido introducido en células hospedadoras (p. ej., mediante transformación o transfección) para la expresión del polipéptido codificado.

En algunos casos, se puede requerir una determinación del porcentaje de identidad de un péptido con una secuencia indicada en la presente. En tales casos, el porcentaje de identidad se mide en cuanto al número de residuos del péptido, o una porción del péptido. Un polipéptido de, p. ej., 90% de identidad, también puede ser una porción de un péptido mayor.

El término purificado, según se usa en la presente con referencia a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que se ha sintetizado químicamente y así sustancialmente no está contaminado por otros polipéptidos, o se ha separado o purificado de la mayoría de los otros componentes celulares por los que está naturalmente acompañado (p. ej., otras proteínas celulares, polinucleótidos o componentes celulares). Un ejemplo de un polipéptido purificado es uno que está al menos 70%, en peso seco, libre de las proteínas y las moléculas orgánicas presentes en la naturaleza con los que está asociado naturalmente. Por lo tanto, una preparación de un polipéptido purificado puede ser, por ejemplo, al menos 80%, al menos 90% o al menos 99%, en peso seco, el polipéptido. Los polipéptidos también se pueden manipular para contener una secuencia de etiquetado (p. ej., una etiqueta de polihistidina, una etiqueta myc o una etiqueta FLAG®) que facilita que el polipéptido sea purificado o marcado (p. ej., capturado sobre una matriz de afinidad, visualizado bajo un microscopio). Así, una composición purificada que comprende un polipéptido se refiere a un polipéptido purificado a menos que se indique otra cosa. El término aislado indica que los polipéptidos o ácidos nucleicos de la invención no están en su ambiente natural. Así, los productos aislados de la invención pueden estar contenidos en un sobrenadante de cultivo, pueden estar parcialmente enriquecidos, se pueden producir a partir de fuentes heterólogas, se pueden clonar en un vector o se pueden formular con un vehículo, etc.

Los polipéptidos pueden incluir una modificación química; un término que, en este contexto, se refiere a un cambio en la estructura química presente en la naturaleza de los aminoácidos. Estas modificaciones se pueden hacer en una cadena lateral o un extremo, p. ej., cambiando el extremo amino o el extremo carboxilo. En algunas realizaciones, las modificaciones son útiles para crear grupos químicos que se pueden usar convenientemente para conectar los polipéptidos a otros materiales, o para ligar un agente terapéutico.

Unión específica, según se usa comúnmente ese término en las técnicas biológicas, se refiere a una molécula que se une a una diana con un afinidad relativamente alta en comparación con tejidos no elegidos como diana, y generalmente implica una pluralidad de interacciones no covalentes, tales como interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, y similares. Las interacciones de unión específica caracterizan la unión anticuerpo-antígeno, la unión enzima-sustrato e interacciones proteína-receptor que se unen específicamente; aunque estas moléculas se pueden unir a tejidos además de sus dianas de vez en cuando, se dice que esta unión carece de especificidad y no es unión específica.

Análisis

El Ejemplo 1 (véase la Fig. 1) describe resultados que establecen que el dominio de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se descubrió dentro de PIGF2 que se une fuertemente y promiscuamente a proteínas de la ECM. Este dominio es solo una parte de PIGF2 y, como tal, no existe en la naturaleza. PIGF2 se unía fuertemente a todas las proteínas de la ECM probadas (Fig. 1, barras grises). El alineamiento de las secuencias proteínicas de las variantes de empalme PIGF2 y PIGF-1 (que no se une) ilustra cómo PIGF2 contiene una inserción de 21 aminoácidos adicional (PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, en gris) situada cerca del extremo C. También se mostraba que la unión era eficaz cuando el dominio de PIGF2 se fusionaba a una proteína, GST (GST-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄). A partir del Ejemplo 1, se concluyó que PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ comprende un dominio que se une a proteínas de la ECM. Se probó la unión de diversos fragmentos de PIGF2 a diversas proteínas de la ECM, sulfato de heparano y neuropilina-1, con los resultados representados en la Figura 2. El Ejemplo 2 detalla los experimentos así como describe ejemplos de elaboración de truncamientos y/o sustituciones en la secuencia.

Una variedad de citocinas se puede elaborar como proteínas de fusión con el dominio de PIGF2 (Ejemplo 3; Figura 3). La Fig. 4 (véase el Ejemplo 4) indica resultados para la unión de estas proteínas de fusión con ECM. Se midieron las constantes de disociación para la unión específica y se determinó que la afinidad de PIGF2 para una amplia variedad de proteínas de la ECM era conferida a las moléculas de fusión. Estas incluían factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y proteína morfogenética ósea (BMP). El Ejemplo 5 detalla la fabricación adicional de fusiones moleculares citocina-dominio de PIGF2, incluyendo fusiones con factor de crecimiento insulínico-I (IGF-I), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1), TGF-beta 2 (TGF-β2), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y una neurotrofina (NT), NT-3. Se observó que estos factores biológicos (Ejemplo 6, Fig. 5) mantenían su actividad biológica cuando se fusionaban al dominio de PIGF2. De hecho, la molécula de fusión VEGF tenía una actividad incrementada.

Hay un problema importante que ha surgido al trasladar el VEGF-A al uso clínico. En efecto, aunque la activación por VEGF-A del receptor de VEGF 2 (VEGF-R2) es potencialmente un enfoque potente para promover la angiogénesis, la administración real de VEGF-A ha mostrado que induce rápidamente permeabilidad vascular, que conduce a hipotensión sistémica y edema; este fenómeno ha sido la respuesta tóxica limitativa de la dosis en aplicaciones periféricas y cardiovasculares (*Simons M y Ware JA, 2003*) y presenta graves problemas en la medicina regenerativa. Se estableció como teoría que combinar VEGF y un dominio de PIGF2 no afectaría a la potencia del VEGF pero haría que se liberase más lentamente de modo que la permeabilidad vascular se reduciría y la combinación se haría más eficaz que el VEGF por sí mismo. De forma similar, se establece como teoría que la fusión de diversas citocinas al dominio de PIGF2 es similarmente eficaz. Estas teorías se apoyaban en una serie de experimentos. El Ejemplo 7 (Fig. 6) detalla cómo se creaban diversas variantes de citocinas con superafinidad para ECM que se unían a, y eran retenidas por, moléculas de la ECM *in vivo*. El Ejemplo 8 (Fig. 7) usaba modelos clínicamente importantes para probar el poder de curación de fusiones moleculares de PDGF-BB y VEGF-A con un dominio de PIGF2. Las heridas tratadas con las fusiones moleculares manipuladas de PDGF-BB y VEGF-A conducían a un cierre de la herida significativamente más rápido, y la mejora de la curación se corroboraba al observar mejor tejido de granulación y biomarcadores (CD31 y desmina) que mostraban una mejora de la angiogénesis.

Además, se observó que la fusión molecular de VEGF y un dominio de PIGF2 provocaba mucha menos permeabilidad vascular a pesar de provocar estos resultados mejorados. El Ejemplo 9 (Fig. 8) detalla los resultados. En resumen, la proteína de fusión parecía desacoplar la angiogénesis de la hiperpermeabilidad.

A la luz de estos diversos resultados que muestran que los dominios PIGF2 podrían crear una unión específica deseada en una molécula de fusión sin alterar las funciones de las citocinas, se efectuaron pruebas adicionales para demostrar la aplicabilidad general de estas combinaciones. El Ejemplo 10 (Fig. 9) detalla el tratamiento de defectos óseos con fusiones moleculares de citocinas con un dominio de PIGF2. En estos experimentos, se usó una matriz para retener y aportar de forma controlable las fusiones moleculares. En resumen, las moléculas de fusión eran mucho más eficaces que las citocinas por sí mismas, y eran eficaces dosis mucho menores (nanogramos de la molécula de fusión en comparación con microgramos de las citocinas inalteradas). Estos resultados demuestran la eficacia de una matriz que se une específicamente a las fusiones moleculares así como su eficacia en un tratamiento de curación ósea.

Se proporciona adicionalmente una variedad de Ejemplos detallados que describen cómo diseñar y elaborar diversas fusiones moleculares. El Ejemplo 11 detalla cómo motivos de adhesión celular se pueden fusionar a un dominio de PIGF2. Un dominio de fibronectina se usa como un ejemplo. Matrices para aportar fármacos y/o promover la invasión celular o la curación se pueden exponer a estas fusiones moleculares y ser modificadas para transportar un fármaco u otro agente activo tal como un motivo de adhesión celular. Se conocen diversas matrices, incluyendo matrices sintéticas, matrices de fibrina y matrices naturales o sintéticas, incluyendo las que están reticuladas covalentemente y las que no están reticuladas covalentemente. El Ejemplo 12 detalla una fusión molecular de un fármaco para la liberación desde una matriz, con el fragmento de hormona paratiroidea 1-34 usado como un ejemplo. El Ejemplo 13 detalla una fusión molecular de un dominio de PIGF2 y un inhibidor de proteasa. El contexto es una matriz de fibrina con aprotinina como un ejemplo. El Ejemplo 14 detalla una fusión molecular de las quimiocinas CXCL10, CXCL11, IFN-γ y CCL21 con PIGF2.

También se pueden elaborar vacunas usando un dominio de PIGF2. El Ejemplo 15 detalla la fusión molecular de un antígeno inmunogénico con un dominio de PIGF2. Esta molécula se puede administrar en el contexto de un compuesto farmacéuticamente aceptable y en combinación con otras características para las vacunas, p. ej., según se detallan en otras partes en la presente. A modo de ejemplo, el Ejemplo 16 proporciona detalles para manipular el agonista del receptor de tipo Toll fusionado con un dominio de PIGF2.

El aporte y la liberación controlada de fármacos se ejemplifica generalmente mediante los detalles del Ejemplo 17, que describe una fusión molecular de un agente bioactivo con un dominio de PIGF2. A modo de ejemplo, se proporciona un FGF18 que se une a la matriz extracelular mediante una proteína de fusión entre FGF18 y un dominio de PIGF2. Se presentan diversas alternativas para esta fusión.

Fusión molecular

Una realización preferida es una fusión molecular entre un dominio de PIGF2 y un agente terapéutico. Las realizaciones incluyen un dominio de PIGF2 en una fusión molecular con, p. ej., un agente terapéutico, un marcador, una molécula de adhesión celular, un antígeno, una proteína, un fármaco proteínico o una citocina. Se puede formar una fusión molecular entre un primer péptido de PIGF2 y un segundo péptido. En lugar de un segundo péptido, se puede usar un resto químico, p. ej., un marcador, un marcador fluorescente. La fusión comprende los péptidos conjugados directamente o indirectamente entre sí. Los péptidos pueden estar directamente conjugados entre sí o indirectamente a través de un conector. El conector puede ser un péptido, un polímero, un aptámero, un ácido nucleico o una partícula. La partícula puede ser, p. ej., una micropartícula, una nanopartícula, un polimerosoma, un liposoma o una micela. El polímero puede ser, p. ej., natural, sintético, lineal o ramificado. Una proteína de fusión que comprende el primer péptido y el segundo péptido es un ejemplo de una fusión molecular de los péptidos, comprendiendo la proteína de fusión los péptidos directamente ligados entre sí o con secuencias conectoras intermedias y/o secuencias adicionales en uno o ambos extremos. La conjugación al conector puede ser a través de enlaces covalentes. Métodos incluyen preparar una fusión molecular o una composición que comprende la fusión molecular, incluyendo esta composición en una forma farmacéuticamente aceptable.

Unas realizaciones incluyen una fusión molecular de un polipéptido que comprende un dominio de PIGF2 y un sustrato de transglutaminasa (TG). Una realización de un sustrato de TG es un péptido que comprende los residuos 1-8 de inhibidor de 2-plasmina alfa (NQE QVSPL) (SEQ ID NO: 50). Unas realizaciones incluyen un polipéptido tal que es un polipéptido de fusión recombinante. La fusión molecular puede comprender además un resto de adhesión celular que tiene una afinidad de unión específica para una molécula de adhesión celular. Se conocen diversos restos de adhesión celular, a modo de ejemplo, en los que el resto de adhesión celular comprende un ligando para una glicoproteína o un receptor de la superficie celular. O el resto de adhesión celular puede comprender un ligando con unión específica a la molécula de adhesión celular y la molécula de adhesión celular es un receptor de la superficie celular elegido del grupo que consiste en una integrina y una cadherina.

El término fusión molecular, o el término conjugado, se refiere a la asociación directa o indirecta mediante enlaces químicos, incluyendo covalentes, iónicos electrostáticos o carga-carga. La conjugación crea una unidad que es mantenida mediante enlace químico. Conjugación directa se refiere a un enlace químico con el agente, con o sin conectores o grupos químicos intermedios. Conjugación indirecta se refiere a la conexión química con un portador. El portador puede encapsular en gran parte al agente, p. ej., un polimerosoma, un liposoma o una micela o algunos tipos de nanopartículas, o puede tener el agente sobre su superficie, p. ej., una nanopartícula o cuenta metálica, o ambas, p. ej., una partícula que incluye algo del agente en su interior así como sobre su exterior. El portador también puede encapsular un antígeno para la inmunotolerancia. A modo de ejemplo, se puede elaborar un polimerosoma, un liposoma o una partícula que encapsule el antígeno. El término encapsular significa cubrir totalmente, eficazmente sin que ninguna porción se exponga, a modo de ejemplo, se puede elaborar un polimerosoma que encapsule un antígeno o un agente.

La conjugación se puede efectuar mediante enlaces covalentes del péptido con otra molécula, con o sin el uso de un conector. La formación de estos conjugados está dentro de la experiencia de los expertos y se conocen diversas técnicas para efectuar la conjugación, estando guiada la elección de la técnica particular por los materiales que se van a conjugar. La adición al polipéptido de aminoácidos (C- o N-terminal) que contienen cadenas laterales ionizables, es decir ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, cisteína, histidina o tirosina, y no están contenidos en la porción activa de la secuencia polipeptídica, sirve en su estado desprotonado como un potente nucleófilo para acoplarse en diversas reacciones de bioconjugación con grupos reactivos ligados a polímeros, es decir, PEG homo- o heterobifuncional (p. ej., Lutolf y Hubbell, *Biomacromolecules* 2003;4:713-22, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Londres. Academic Press Ltd; 1996). En algunas realizaciones, se usa un conector polimérico soluble, y se puede administrar a un paciente en una forma farmacéuticamente aceptable. O un fármaco se puede encapsular en polimerosomas o vesículas o ligar covalentemente al ligando peptídico.

La fusión molecular puede comprender una partícula. El dominio de PIGF2 puede estar ligado a la partícula. Un antígeno, un agente u otra sustancia puede estar en o sobre la partícula. Ejemplos de nanopartículas, micelas y otras partículas se encuentran, p. ej., en los documentos US 2008/0031899, US 2010/0055189, US 2010/0003338.

5 Las nanopartículas se pueden preparar como colecciones de partículas que tienen un diámetro medio de entre aproximadamente 10 nm y aproximadamente 200 nm, incluyendo todos los intervalos y valores entre los límites explícitamente articulados, p. ej., de aproximadamente 20 a aproximadamente 200, y de aproximadamente 20 a aproximadamente 40, hasta aproximadamente 70, o hasta aproximadamente 100 nm, dependiendo de la polidispersidad que sea aportada por el método preparativo. Se pueden utilizar diversos sistemas de nanopartículas, 10 tales como los formados a partir de copolímeros de poli(etilenglicol) y poli(ácido láctico), los formados a partir de copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(beta-aminoéster) y los formados a partir de proteínas tales como albúmina sérica. Otros sistemas de nanopartículas son conocidos por los expertos en estas técnicas. Véanse además Devalapally y cols., *Cancer Chemother Pharmacol.*, 07-25-06; Langer y cols., *International Journal of Pharmaceutics*, 257:169-180 (2003); y Tobío y cols., *Pharmaceutical Research*, 15(2):270-275 (1998).

15 También se pueden preparar partículas mayores de más de aproximadamente 200 nm de diámetro medio que incorporan los ligandos que se unen a heparina, denominándose estas partículas en la presente micropartículas ya que empiezan a aproximarse a la escala micrométrica y están aproximadamente dentro del límite de la resolución óptica. A modo de ejemplo, ciertas técnicas para elaborar micropartículas se indica en las Pat. EE. UU. N° 20 5.227.165, 6.022.564, 6.090.925 y 6.224.794.

La funcionalización de nanopartículas para emplear la capacidad de elección de dianas requiere la asociación del polipéptido de elección como diana con la partícula, p. ej., mediante unión covalente usando una técnica de 25 bioconjugación, estando guiada la elección de una técnica particular por la partícula o nanopartícula, u otra construcción, a la que se va a ligar el polipéptido. En general, son conocidas muchas técnicas de bioconjugación para ligar péptidos a otros materiales y se puede elegir la técnica más adecuada para un material particular. A modo de ejemplo, aminoácidos adicionales se pueden ligar a las secuencias polipeptídicas, tales como cisteína en el caso de ligar el polipéptido a moléculas reactivas con tiol.

30 La fusión molecular puede comprender un polímero. El polímero puede ser ramificado o lineal. La fusión molecular puede comprender un dendrímero. En general, se puede usar polímeros biocompatibles hidrófilos solubles de modo que el conjugado sea soluble y esté biodisponible después de la introducción en el paciente. Ejemplos de polímeros solubles son poli(alcoholes vinílicos), polietiléniminas y polietilenglicoles (un término que incluye poli(óxidos de 35 etileno)) que tienen un peso molecular de al menos 100, 400 o entre 100 y 400.000 (contemplándose todos los intervalos y valores entre estos valores explícitos). Solubilidad en este contexto se refiere a una solubilidad en agua o solución salina fisiológica de al menos 1 gramo por litro. También se pueden usar dominios de polímeros biodegradables, p. ej., poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico), policaprolactonas, poli(ácido hidroxibutírico), poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos y policianoacilatos.

40 Unas realizaciones incluyen un polímero que comprende un polipéptido que comprende un péptido de PIGF2 sintético. Por ejemplo, unas realizaciones incluyen los polímeros listados anteriormente así como un polisacárido, polietilenglicol, poli(óxido de alquileo), colágeno o gelatina. El polímero puede comprender además un sustrato de transglutaminasa (TG), una citocina y similares.

45 En algunas realizaciones, se prepara una asociación polipéptido-polímero, p. ej., una fusión molecular, y se introduce en el cuerpo como una composición purificada en una condición farmacéuticamente aceptable, o con un excipiente farmacéutico. La zona de introducción puede ser, p. ej., sistémico, o en un tejido o una zona de trasplante.

50 Unas realizaciones incluyen una fusión molecular entre un dominio de PIGF2 y un fármaco proteínico, tal como una proteína de fusión recombinante que comprende un dominio de PIGF2 y el fármaco proteínico, un conjugado químico que comprende un dominio de PIGF2 y el fármaco proteínico, o un conjugado químico indirecto que comprende el dominio de PIGF2 y el fármaco proteínico mediado a través de la fusión conjunta a un polímero o una 55 micela o nanopartícula polimérica. Las fusiones moleculares entre el dominio de PIGF2 y el fármaco proteínico pueden servir para anclar el fármaco proteínico a tejidos cuando se administran en zonas tisulares, por afinidad con fibrinógeno/fibrina en zonas tisulares lesionadas o por afinidad a proteínas de la ECM en zonas tisulares. Como tal, una realización preferida es una fusión molecular de un dominio de PIGF2 y un fármaco proteínico en un portador farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, las fusiones moleculares entre el dominio de PIGF2 y un fármaco 60 proteínico pueden servir para anclar el fármaco proteínico dentro de una matriz de fibrina. La fibrina es una matriz de biomaterial usada comúnmente, usada para sellar y adherir tejidos, en aplicaciones de medicina regenerativa y en aplicaciones de aporte de fármacos. El anclaje de fármacos proteínicos dentro de matrices de fibrina puede proporcionar beneficios farmacológicos en estas y otras aplicaciones. Los antígenos peptídicos y proteínicos también se pueden conectar anclado dentro de matrices de fibrina al formar una fusión molecular entre el antígeno y 65 un dominio de PIGF2. Como tal, una realización preferida es una fusión molecular de un dominio de PIGF2 y un fármaco o antígeno proteínico en una formulación farmacéuticamente aceptable de fibrinógeno/fibrina. También se

puede preparar fibrinógeno/fibrina a partir de fuentes autólogas, y como tal una realización preferida es una fusión molecular de un dominio de PIGF2 y un fármaco o antígeno proteínico en un portador farmacéuticamente aceptable para la aplicación en fibrina autóloga.

5 Vehículo

En muchos casos, un agente terapéutico, p. ej., fármacos proteínicos tales como citocinas, hormonas o proteínas de adhesión celular, se podrían aportar directamente en la zona corporal que se necesita tratar sin el uso de ninguna matriz. Sin embargo, debido al flujo y el drenaje intersticial, las citocinas u otros agentes solubles se pueden depurar rápidamente de la zona de inyección, dependiendo de su afinidad para la ECM. Puesto que las citocinas modificadas con una secuencia de PIGF2, p. ej., una secuencia de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, muestran una unión mejorada a varias proteínas de la matriz extracelular incluyendo fibronectina, tenascina C, vitronectina, osteopontina y colágeno I, se pueden retener mejor en la zona de inyección, dando como resultado un tratamiento mejorado.

Se puede usar un péptido de PIGF2 como un vehículo para el aporte de un agente terapéutico. El vehículo es soluble o un coloide en una solución fisiológica, teniendo preferiblemente todos los componentes del vehículo menos de aproximadamente 500 µm de dimensión máxima cuando se liberan en el cuerpo. Realizaciones del vehículo de PIGF2 incluyen una fusión molecular de un agente biológico y un péptido que comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, SEQ ID NO: 5 que tiene de 0 a 5 sustituciones conservativas, y subsecuencias de las mismas, exhibiendo dicho ácido nucleico unión específica a uno o más de fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina y fibrina. El agente biológico se puede elegir del grupo que consiste en una proteína, un fármaco proteínico, un marcador, un inmunoadyuvante, una quimiocina, una citocina y un péptido de adhesión celular.

Durante el uso, un péptido de PIGF2, por sí mismo o como parte de una fusión molecular, exhibe especificidad de unión para diversas moléculas de la ECM, incluyendo fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C, osteopontina y fibrina. En este contexto, el fibrinógeno y la fibrina se pueden considerar ECM temporal. La colocación del vehículo de PIGF2 en un tejido da como resultado la inmovilización localizada del vehículo en o cerca de la zona de la colocación, y no es sistémica. El agente o los agentes transportados por el vehículo se liberarán a lo largo del tiempo o serán consumidos donde están inmovilizados por células que están interactuando con el tejido. El tejido del propio paciente puede así servir como una biomatriz para el aporte de factores. Se conocen muchos usos para las biomatrices, incluyendo la liberación prolongada de fármacos.

Matrices

Unas realizaciones incluyen un biomaterial que incorpora un dominio de PIGF2 en una matriz. El término matriz se refiere a una estructura tridimensional sintética, incluyendo un bloque, una lámina o una película; es un término usado en contraste con un material soluble o fluido. El término sintético significa no natural para el paciente, y que sea exógeno con relación al paciente. Las matrices, cuando se usan internamente como armazones, tienen que soportar cargas mecánicas, contener cinéticas de degradación adecuadas y presentar moléculas bioactivas. Los armazones funcionan como una fusión de portador celular y dispositivo de aporte de fármaco con el propósito de la manipulación de tejidos. Para imitar el microambiente natural para las células a fin de inducir la reparación y la regeneración tisular, los materiales sintéticos se pueden modificar con fragmentos de ECM. Los fragmentos de ECM descritos en este informe se pueden diseñar para formar una fusión molecular con un sustrato de transglutaminasa (TG) en el extremo N, que consiste en los residuos 1-8 de la proteína inhibidor de plasmina alfa2 (α2P11-8, NQEQVSPL (SEQ ID NO: 50)). Por lo tanto, el factor XIIIa se puede usar como una transglutaminasa para catalizar la reacción entre las glutaminas de esta secuencia (NQEQVSPL) y las lisinas de diferentes biomateriales. La enzima de coagulación, factor XIIIa, unirá covalentemente el grupo amina libre de las lisinas (Lys) al grupo carboxamida gamma de la glutamina (Gln), dando como resultado enlaces que exhiben alta resistencia a la degradación proteolítica. Por ejemplo, los hidrogeles de fibrina natural se reticular mediante este mecanismo y por lo tanto un dominio de TG- PIGF2 se puede reticular dentro del gel (Schense y Hubbell, 1999).

Con respecto a realizaciones preferidas para anclar biomoléculas a una matriz de fibrina, la biomolécula puede ser un fármaco proteínico recombinante para aporte local en la reparación tisular, incluyendo citocinas. Así, una realización preferida para la reparación tisular es una formulación farmacéutica de una matriz de reparación tisular que comprende fibrinógeno o fibrina y una fusión molecular entre el PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y una citocina recombinante, incluyendo miembros del factor de crecimiento epidérmico (EGF), VEGF, PDGF, FGF, IGF, BMP, TGF-β y familias y superfamilias de neurotrofinas. La matriz de fibrina también puede servir como una matriz de liberación controlada para el aporte sostenido de fusiones moleculares de fármacos proteínicos con un dominio de PLGF2 o PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y fármacos proteínicos.

Una realización preferida es una proteína de fusión que comprende el dominio PLGF2 o PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y la citocina VEGF-A, refiriéndose la denominación VEGF-A a cualquiera de las isoformas de VEGF-A.

El PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se puede usar para manipular matrices de fibrina para la inmunomodulación y la inmunopotenciación, incluyendo la vacunación, locales. Realizaciones preferidas son fusiones moleculares que comprenden el PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y una quimiocina, incluyendo las quimiocinas de interés INF- β , CXCL10, CXCL11, y CCL21, o citocinas incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3. Realizaciones preferidas son una matriz de inmunomodulación o inmunopotenciación que comprende fibrinógeno o fibrina y una fusión molecular entre el dominio de PLGF2 o PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y una quimiocina recombinante, incluyendo las quimiocinas de interés INF- β , CXCL10, CXCL11, y CCL21, o citocinas incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3. PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se puede usar para incorporar proteínas de la matriz extracelular de señal de peligro inmunológico en fibrina. PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ también se puede usar para incorporar proteínas de la matriz extracelular de señal de peligro en fibrina, incluyendo el dominio globular similar a fibrinógeno de tenascina C, una señal de peligro inmunológico. Una realización preferida es una fusión molecular de un dominio de PLGF2 y el dominio globular similar a fibrinógeno de tenascina C.

Una aplicación importante en la inmunopotenciación es la vacunación. Una realización preferida es una matriz vacunal que comprende fibrinógeno o fibrina y una fusión molecular del dominio de PLGF2 y un antígeno peptídico o proteínico. Una realización preferida es una fusión molecular entre un dominio de PLGF2 y un antígeno peptídico o proteínico. Una realización preferida adicional es una matriz vacunal que comprende fibrinógeno o fibrina, una fusión molecular entre un dominio de PLGF2 y una quimiocina, una fusión molecular de PLGF2 y el dominio globular similar a fibrinógeno de tenascina C y una fusión molecular entre un dominio de PLGF2 y un antígeno peptídico o proteínico.

Las matrices de fibrina también proporcionan un ambiente adhesivo dentro del cual las células migran, se infiltran e invaden. Es útil ser capaz de modular este ambiente de adhesión, y esto se puede hacer al elaborar fusiones moleculares de péptidos de adhesión o dominios de proteínas de adhesión, tales como FN III9-10, o muchos dominios correspondientes encontrados en fibronectina, vitronectina, laminina y tenascina C, por ejemplo. Realizaciones preferidas son fusiones moleculares de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y dominios de adhesión, incluyendo los dominios de adhesión los péptidos que se unen a integrina derivados de fibronectina, comprendiendo los dominios de adhesión las secuencias de aminoácidos RGD, RGDS, RGDSP (SEQ ID NO: 52), KLDAPT (SEQ ID NO: 51), IDGIHEL (SEQ ID NO: 49), IDAPS (SEQ ID NO: 48), LDV y REDV, y los dominios de adhesión de fibronectina FN III10, FN III9-10, así como las repeticiones de FN tipo III 1^a-5^a de tenascina y la 3^a repetición de FN tipo III de tenascina C.

Además de los dominios de adhesión, es útil anclar dominios que se unen a citocinas y quimiocinas dentro de las matrices de fibrina. Esto se puede conseguir con fusiones moleculares de un dominio de PLGF2 y dominios que se unen a citocinas y quimiocinas, por ejemplo procedentes de fibronectina, tenascina C, vitronectina, laminina y otras moléculas de matriz. Realizaciones preferidas son una fusión molecular de un dominio de PLGF2 y FN III12-14, una fusión molecular de un dominio de PLGF2 y TNC III1-5, una fusión molecular de un dominio de PLGF2 y TNCIII 3-5, y una fusión molecular de un dominio de PLGF2 y TNCIII5.

También es valioso anclar inhibidores de proteasas dentro de la fibrina, para retardar la degradación de la fibrina después del dentro de o sobre la superficie del cuerpo. Esto se puede conseguir con fusiones moleculares de un dominio de PLGF2 y un inhibidor de proteasa, tal como aprotinina. Una realización preferida es una fusión molecular de PLGF2 y aprotinina. Una realización preferida es una formulación de fibrina que comprende una fusión molecular de un dominio de PLGF2 y aprotinina.

Administración

Se pueden usar portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables para aportar realizaciones como las descritas en la presente. Excipiente se refiere a una sustancia inerte usada como un diluyente o vehículo para un agente terapéutico. Los portadores farmacéuticamente aceptables se usan, en general, con un compuesto a fin de hacer útil el compuesto para una terapia o como un producto. En general, para cualquier sustancia, un portador es un material que se combina con la sustancia para el aporte a un animal. Pueden ser necesarios o deseables portadores, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares farmacéuticos convencionales. En algunos casos, el portador es esencial para el aporte, p. ej., para solubilizar un compuesto insoluble para el aporte de líquido; un tampón para el control del pH de la sustancia para conservar su actividad; o un diluyente para prevenir la pérdida de la sustancia en el recipiente de almacenamiento. Sin embargo, en otros casos, el portador se usa por comodidad, p. ej., un líquido para una administración más cómoda. Sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente se pueden sintetizar según métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las sustancias o composiciones farmacéuticamente aceptables están altamente purificadas para que estén libres de contaminantes, son estériles y son biocompatibles. Pueden incluir además un portador, una sal o un excipiente adecuados para la administración a un paciente. En el caso del agua como el portador, el agua está altamente purificada y se procesa para estar libre de contaminantes, p. ej., endotoxinas.

Los compuestos descritos en la presente se pueden administrar mezclados con diluyentes, excipientes, extendedores o portadores farmacéuticos adecuados (denominados en la presente portador farmacéuticamente aceptable, o un portador) seleccionados adecuadamente con respecto a la forma de administración pretendida y de

acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales. Así, el compuesto aportable se puede elaborar en una forma adecuada para la administración oral, rectal, tópica, en inyección intravenosa, en inyección intraarticular, parenteral, intranasal o traqueal. Los portadores incluyen sólidos o líquidos, y el tipo de portador se elige basándose en el tipo de administración que se use. Aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes, agentes colorantes, agentes saborizantes, agentes inductores del flujo y agentes fundentes adecuados se pueden incluir como portadores, p. ej., para píldoras. A modo de ejemplo, un componente activo se puede combinar con un portador inerte oral, atóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, gelatina, agar, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato magnésico, fosfato dicálcico, sulfato cálcico, manitol, sorbitol y similares. Los compuestos se pueden administrar oralmente en formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos, o en formas de dosificación líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. Los compuestos activos también se pueden administrar parenteralmente, en formas de dosificación líquidas estériles. También se pueden usar tampones para alcanzar un pH fisiológico u osmolaridad.

Ejemplos

Ejemplo 1: Una secuencia de aminoácidos corta dentro de PIGF2 (PIGF2₁₂₃₋₁₄₄) se une fuertemente a proteínas de la ECM.

Se descubrió un dominio dentro de PIGF2 (PIGF2₁₂₃₋₁₄₄) que se une fuertemente y promiscuamente a proteínas de la ECM. La unión de GF a proteínas de la ECM se midió mediante ELISA. Una señal por encima de 0,1 (recuadro gris) se consideraba representativa de una unión específica. PIGF2 se une fuertemente a todas las proteínas de la ECM probadas (barras grises). El alineamiento de las secuencias proteínicas de las variantes de empalme PIGF2 y PIGF-1 (que no se une) ilustra cómo PIGF2 contiene una inserción de 21 aminoácidos adicional (PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, en gris) situada cerca del extremo C. Se probó la unión de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ a proteínas de la ECM cuando estaba fusionado a una proteína modélica que no se une, glutatióna S-transferasa (GST) (GST-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄). Una versión desordenada de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (GST-PIGF2_{scr}) no se une a proteínas de la ECM. La Fig. 1 indica datos experimentales para la misma.

Ejemplo 2: Optimización del dominio de unión a ECM de PIGF2.

A partir del Ejemplo 1, se concluyó que PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ comprende un dominio de unión a proteínas de la ECM. Se probó la unión de diversos fragmentos de GST-PLGF2 a diversas proteínas de la ECM, sulfato de heparano y neuropilina-1, con los resultados representados en la Figura 2.

Este dominio se puede manipular adicionalmente a través de la retirada de secuencias que no son críticas para la unión a proteínas de la ECM a través de experimentación. Esta experimentación se puede llevar a cabo como sigue. El ensayo ELISA descrito en el Ejemplo 1 es útil como una lectura de salida en esta optimización experimental. Se elaboran proteínas de fusión a partir de una proteína tal como GST, que comprenden el dominio de longitud completa PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ en un extremo, por ejemplo el extremo C, y la unión a fibrinógeno unido a la superficie se mide mediante un ensayo ELISA usando un anticuerpo que detecta la proteína GST para establecer un valor de referencia de unión inducida por el dominio PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ de longitud completa. Se elaboran proteínas de fusión adicionales, que comprenden el dominio PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ que se ha recortado en uno o más residuos de aminoácido del extremo C-terminal del PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ de longitud completa o del extremo N-terminal del PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ de longitud completa. Así, se forman dos familias de proteínas de fusión, una con acortamiento en el extremo N-terminal de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y una con acortamiento en el extremo C-terminal de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. La medida de la unión a la ECM unida a la superficie permite la determinación de la relación estructura-función entre la longitud de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (a partir de cualquier extremo) y la afinidad para proteínas de la ECM. Se pueden caracterizar de forma similar sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de este dominio.

Ejemplo 3: Diseño y producción de citocinas que se unen a ECM que contienen PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

Secuencias que codifican fusiones moleculares, en particular proteínas de fusión, de citocinas humanas (VEGF-A165, PDGF-BB y BMP-2) y el dominio PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa y se ensamblaron en el vector de expresión de mamífero pXLG, a fin de obtener citocina-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (SEQ ID NO: 7, 9, 11, 12, y 13). A fin de evitar un problema de plegamiento erróneo de proteínas debido a la inclusión de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, la única cisteína dentro del PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (Cys¹⁴²) se puede retirar o sustituir por otro aminoácido tal como una serina (PIGF2₁₂₃₋₁₄₄*). Las proteínas de fusión se expresaron en células HEK y se purificaron mediante cromatografía de afinidad en metal inmovilizado usando un tampón de unión que contenía 500 mM de NaCl, 20 mM de fosfato sódico y 10 mM de imidazol, pH 7,4. La proteína se dializó adicionalmente frente a tampón de Tris (20 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,4). Ejemplos de diseños de citocinas que contienen PIGF2₁₂₃₋₁₄₄* se muestran en la Fig. 3.

ES 2 663 230 T3

SEQ ID NO: 6: VEGF-A121 humano

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRC
GGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGQHIGEMSFLQHNCCECRPKKDRARQE
CDKPRR

SEQ ID NO: 7: VEGF-A121 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

APMAEGGGQNHHEVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPSCVPLMRC
GGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGGQHIGEMSFLQHNCCECRPKKDRARQE
RRRPGKGRGKRRREKQRPTDCHLCDKPRR

- 5 La indicación VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se usa para referirse a SEQ ID NO: 7 y a otros diseños de fusión de VEGF-A que comprenden el dominio PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

SEQ ID NO: 8: PDGF-BB humano

SLGSLTIAEPAMIAECKTRTEVFEISRRLIDRTNANFLVWPPCVEVQRCSGCCNNRNV
QCRPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKCETVAAARPVT

SEQ ID NO: 9: PDGF-BB humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

SLGSLTIAEPAMIAECKTRTEVFEISRRLIDRTNANFLVWPPCVEVQRCSGCCNNRNV
QCRPTQVQLRPVQVRKIEIVRKKPIFKKATVTLEDHLACKCETVAAARPVTRRRPKG
RGKRRREKQRPTDCHL

10

SEQ ID NO: 10: BMP-2 humana

QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPFPLADHL
NSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVVKNYQDMVVEGC
GCR

SEQ ID NO: 11: BMP-2 humana-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPFPLADHL
NSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVVKNYQDMVVEGC
GCRRRPGKGRGKRRREKQRPTDCHL

- 15 SEQ ID NO: 12: PIGF2₁₂₃₋₁₄₄- BMP-2 humana

RRRPGKGRGKRRREKQRPTDCHLSCKRHPLYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHG
ECPFPLADHLNSTNHAIVQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVVKNY
QDMVVEGCGR

SEQ ID NO: 13: BMP-2 humana-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄*

QAKHKQRKRLKSSCKRHPLYVDFSDVGVNDWIVAPPGYHAFYCHGECFPLADHL
 NSTNHAIQTLVNSVNSKIPKACCVPTELSAISMLYLDENEKVVLKKNYQDMVVEGC
 GCRRRPGKGRGKRRREKQRPTDSSL

Ejemplo 4: Las citocinas modificadas con PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ o PIGF2_{123-144*} exhiben una afinidad mejorada para componentes de la ECM.

5 Se probó la unión de diversas citocinas modificadas con PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) a diversas proteínas de la ECM y sulfato de heparano, con los resultados representados en la Figura 4 paneles a y b. Las constantes de disociación se determinaron como se muestra en la Tabla 1, que indica las constantes de afinidad de citocinas-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) para diversas proteínas de la ECM y sulfato de heparano, medidas mediante ELISA. La constante de disociación (K_D) se obtuvo mediante regresión no lineal usando A450 nm = Bmáx*[concentración]/(K_D + [concentración]). Se observó que la afinidad para proteína de la ECM y sulfato de heparano de citocinas modificadas con PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) (VEGF-A121-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, PDGF-BB-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ y BMP-2-PIGF2_{123-144*}) era muy superior (K_D inferior) que las citocinas silvestres. Como tal, la afinidad de PIGF2 para proteínas de la ECM se fue conferida a VEGF-A165, PDGF-BB y BMP-2 mediante la fusión del PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ a VEGF-A165, PDGF-BB y BMP-2, respectivamente.

Tabla 1

K _D (nM)	Fibronectina	Vitronectina	Tenascina C	Osteopontina	Fibrinógeno	Colágeno I	Sulfato de heparano
VEGFA165	97,2 ± 10,4	70,9 ± 11,3	115,3 ± 15,7	71,0 ± 8,4	301,5 ± 73,0	> 500	60,9 ± 9,7
VEGF-A-PIGF-2 ₁₂₃₋₁₄₄	11,2 ± 3,3	2,8 ± 0,3	18,0 ± 1,2	26,4 ± 13,2	5,8 ± 0,6	123,9 ± 16,1	5,9 ± 0,5
PDGF-BB	11,6 ± 1,4	10,5 ± 1,0	19,0 ± 2,8	20,3 ± 2,2	250,4 ± 57,6	> 500	42,3 ± 6,3
FDGF-BB-PIGF-2 ₁₂₃₋₁₄₄	4,5 ± 0,3	1,2 ± 0,1	6,3 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,2	96,3 ± 13,4	4,8 ± 0,4
BMP-2	19,2 ± 2,3	94,7 ± 12,8	25,5 ± 2,1	47,8 ± 4,2	47,1 ± 4,5	> 500	17,1 ± 1,9
BMP-2-PIGF-2 ₁₂₃₋₁₄₄	5,2 ± 0,4	2,4 ± 0,2	6,9 ± 0,7	11,2 ± 1,1	2,0 ± 0,1	101,7 ± 17,9	2,8 ± 0,3
PIGF-2	7,2 ± 1,1	2,0 ± 0,2	10,1 ± 1,0	13,1 ± 1,4	4,5 ± 0,6	126,4 ± 15,7	4,6 ± 0,4

15 Ejemplo 5: Diseño de citocinas que se unen a ECM fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) o con un dominio de la citocina sustituido por PIGF2₁₂₃₋₁₃₃(*).

20 Secuencias que codifican fusiones moleculares, en particular proteínas de fusión, de citocinas y el dominio PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa y se ensamblaron en el vector de expresión de mamífero pXLG, a fin de obtener citocina-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) o PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*)-citocina. Una proteína de fusión entre PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*) y las formas humanas de IGF-I, TGF-β1, TGF-β2, BDNF y NT-3 se diseñan en SEQ ID NO: 15, 17, 18, 20, 22 y 24. También se puede usar una secuencia más corta procedente de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*). Realmente, se elaboraron SEQ ID NO: 1-20 y SEQ ID NO: 21-24 se muestran como ejemplos de realizaciones adicionales.

SEQ ID NO: 14: IGF-I humano:

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL

25 EMYCAPLKPAKSA

SEQ ID NO: 15: IGF-I humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄:

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL

EMYCAPLKPAKSARRRPGKGRGKRRREKQRPTDCHL

SEQ ID NO: 16: TGF-β1 humano:

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT

QYSKVLALYNQHNPAGASAAPCCVPQALEPLPIVYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

30 SEQ ID NO: 17: TGF-β1 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄:

ES 2 663 230 T3

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT
QYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIVRSCKCSR
RRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

SEQ ID NO: 18: PIGF2₁₂₃₋₁₄₄--TGF-β1 humana:

RRRPKGRGKRRREKQRPTD⁵SHLALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIH
EPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPASAAAPCCVPQALEPLPIVYY
VGRKPKVEQLSNMIVRSCKCS

SEQ ID NO: 19: TGF-β2 humano:

ALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIHEPKGYNANFCAGACPYLWSSD
5 TQHSRVLSLYNTINPEASAPCCVSQDLEPLTILYYIGKTPKIEQLSNMIVKSKCS

SEQ ID NO: 20: PIGF2₁₂₃₋₁₄₄--TGF-β2 humana

RRRPKGRGKRRREKQRPTD¹⁰SHLALDAAYCFRNVQDNCCLRPLYIDFKRDLGWKWIH
EPKGYNANFCAGACPYLWSSDTQHSRVLSLYNTINPEASAPCCVSQDLEPLTILYYI
GKTPKIEQLSNMIVKSKCS

SEQ ID NO: 21: BDNF humano

HSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGT¹⁵TVLEKVPVSKGQLKQYFYET
KCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCT
LTIKRGR

10 SEQ ID NO: 22: BDNF humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

HSDPARRGELSVCDSEWVTAADKKTAVDMSGGT¹⁵TVLEKVPVSKGQLKQYFYET
KCNPMGYTKEGCRGIDKRHWNSQCRTTQSYVRALTMDSKKRIGWRFIRIDTSCVCT
LTIKRGRRRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

SEQ ID NO: 23: NT-3 humana:

YAEHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYETRC
KEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRIDTSCVCALS
RKIGRT

SEQ ID NO: 24: NT-3 humana-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

YAEHKSHRGEYSVCDSESLWVTDKSSAIDIRGHQVTVLGEIKTGNSPVKQYFYETRC
KEARPVKNGCRGIDDKHWNSQCKTSQTYVRALTSENNKLVGWRWIRIDTSCVCALS
15 RKIGRTRRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

Ejemplo 6: Actividad de citocinas fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

La Figura 5 indica los resultados. In vitro, los factores de crecimiento (GFs) fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ mostraban una bioactividad similar en comparación con GFs silvestres. Las ECs humanas se estimularon con VEGF-A121, VEGF-A165 o VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, y las células madre mesenquimales humanas se estimularon con PDGF-BB o PDGF-BB-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. Los receptores de GF (VEGFR-2 y PDGFR-β) fosforilados se cuantificaron mediante ELISA (n = 3, media ± EEM). La inserción del PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ en VEGF-A y PDGF-BB no alteraba su señalización. Por otra parte, la inserción de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ en VEGF-A121 incrementaba su actividad hasta el nivel de VEGF-A165. BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄* se evaluó por su capacidad para promover la actividad de ALP en células madre mesenquimales humanas (inducción de la diferenciación osteoblástica). La ALP celular se cuantificó después de 14 días de cultivo en presencia de BMP-2 o BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄*. No se observaron diferencias en el número de células y la actividad de ALP entre células tratadas con BMP-2 o BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄*.

Ejemplo 7: Retención *in vivo* de citocinas fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄(*).

Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se crearon variantes de citocinas superafines a ECM que se unen a y son retenidas por moléculas de la ECM *in vivo*. Por ejemplo, cuando se inyectaba subcutáneamente en la piel dorsal de ratones, VEGF-A165 desaparecía rápidamente de la zona de inyección, quedando solo 10% en el tejido cutáneo después de 3 días. En contraste, aproximadamente 50% de la VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ inyectada permanecía después de 3 días, y se podía detectar más de 10% después de 6 días. Adicionalmente, en la piel dorsal o la bóveda craneal de ratones rellenos con una matriz de fibrina que contenía citocinas silvestres o fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, eran detectables bajas cantidades de citocinas silvestres dentro de la zona de aporte después de 3 y 6 días, mientras que las citocinas fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ eran retenidas significativamente en la matriz de fibrina y dentro del tejido que rodeaba los defectos.

Ejemplo 8: Tratamiento de heridas cutáneas con una matriz de fibrina que comprende citocinas fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Se realizan generalmente evaluaciones preclínicas de citocinas con respecto a la curación de heridas cutáneas crónicas en roedores y lo más comúnmente en los ratones diabéticos *db/db* (Hanft JR y cols., 2008; Robson MC y cols., 1992; Robson MC y cols., 1992; Robson MC y cols., 2001), a pesar del hecho de que no exista todavía el modelo de enfermedad óptimo para heridas crónicas humanas. No obstante, existe consenso en que el ratón *db/db* genéticamente modificado representa un modelo clínicamente pertinente para la curación de heridas cutáneas dificultada por la diabetes (Davidson JM, 1998; Sullivan SR y cols., 2004). El éxito en el modelo del ratón *db/db* abre directamente el camino para estudios clínicos (Hanft JR y cols., 2008; Robson MC y cols., 1992). Heridas cutáneas dorsales de profundidad completa se trataron con una dosis alrededor de 100 veces menor de citocinas (200 ng de cada uno de PDGF-BB y VEGF-A, combinados) aportadas una vez en una matriz de fibrina o simplemente aplicadas tópicamente de tres a cuatro veces. Estas dosis bajas de estas bajas dosis de PDGF-BB y VEGF-A silvestres (aportadas en fibrina o tópicamente) no mejoraban significativamente la curación de heridas en comparación con heridas no tratadas o tratadas solo con fibrina según se indica bien por el grado de cierre de la herida (el último indicado por reepitelialización) o bien por la cantidad de tejido de granulación. En contraste, las heridas tratadas con los PDGF-BB y VEGF-A fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ superafines a ECM manipulados conducía a un cierre de heridas significativamente más rápido y a más tejido de granulación, tanto tópicamente como en fibrina. Debido a que la angiogénesis es una etapa crucial para apoyar tejido de granulación recientemente formado (Gurtner GC y cols., 2008), se fijó la atención en el que la angiogénesis difería entre los tratamientos. El análisis inmunohistológico para CD31 (altamente expresado por ECs) y desmina (expresada por células del músculo liso (SMCs) que estabilizan los vasos sanguíneos) revelaba que la angiogénesis dentro de los tejidos de granulación era mucho más pronunciada cuando se aportaban GFs fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. Por ejemplo, se ha presentado que 20 µg/herida de VEGF-A165 o 10 µg/herida de PDGF-BB (REGRANEX®) aplicados tópicamente durante cinco días consecutivos son eficaces en el ratón *db/db* (Chan RK y cols., 2006; Galiano RD y cols., 2004).

Ejemplo 9: Permeabilidad vascular inducida por VEGF-A fusionado a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

Los resultados se muestran en la Figura 8. VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ induce mucha menos permeabilidad vascular que la misma dosis de VEGF-A165 silvestre (10 µg). La permeabilidad vascular se midió en la piel de la oreja del ratón. La permeabilidad inducida por VEGF-A se visualizó por la fuga de dextrano marcado en rojo de los vasos. VEGF-A165 se comparó con VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. Las imágenes de la vasculatura de la piel de la oreja del ratón se analizaron después de la aplicación de VEGF-A. Los resultados indicaban que este enfoque podría resolver un problema importante al trasladar el VEGF-A al uso clínico. En efecto, mientras que la activación por VEGF-A del receptor 2 de VEGF (VEGF-R2) puede ser un enfoque potente para promover la angiogénesis, se ha observado que la administración real de VEGF-A induce rápidamente permeabilidad vascular, que conduce a hipotensión sistémica y edema; este fenómeno ha sido la respuesta tóxica limitativa de la dosis en aplicaciones periféricas y

cardiovasculares (*Simons M y Ware JA, 2003*) y presenta graves problemas en la medicina regenerativa. Debido a que VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ tiene una capacidad mejorada para unirse a ECM endógena, VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ podría inducir menos permeabilidad vascular. En un modelo de extravasación de dextrano desde los vasos de la piel de la oreja del ratón (*Kilarski WW y cols., 2013*), la velocidad de fuga debida a la aplicación de 10 µg de VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ era solo 19 ± 7% de la debida a la aplicación de VEGF-A165 silvestre, aunque mostrara una actividad equivalente a VEGF-A165 en la fosforilación de VEGFR-2. Como tal, la manipulación de VEGF-A para formar VEGF-A-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ parece desacoplar la angiogénesis (según se muestra en el modelo de curación de heridas cutáneas) de la hiperpermeabilidad, resolviendo potencialmente un problema importante con el traslado clínico de VEGF-A.

Ejemplo 10: Tratamiento de defectos óseos con una matriz de fibrina que comprende citocinas fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

Los resultados se muestran en la Figura 9. Las citocinas fusionadas a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ son útiles para manipular un microambiente para la curación ósea. Debido a que las citocinas BMP-2 y PDGF-BB son beneficiosas para la reparación ósea (*Hollinger JO y cols., 2008*), matrices de fibrina que contenían una baja dosis de BMP-2 (200 ng) y PDGF-BB (200 ng) combinados se evaluaron con respecto a la reparación ósea. Un modelo pertinente para ilustrar el potencial de traducción en seres humanos es el defecto de la bóveda craneal de tamaño crítico en una rata esqueléticamente madura, que es un modelo estándar y clínicamente pertinente para la curación ósea sin unión (*Hollinger JO y Kleinschmidt JC, 1990; Muschler GF y cols.*). Evaluaciones preclínicas de materiales de reparación ósea y proteínas osteoinductivas incluyen comúnmente modelos de defectos óseos de tamaño crítico, tales como el defecto de la bóveda craneal de tamaño crítico en la rata (*Hollinger JO y Kleinschmidt JC, 1990*). Una combinación de BMP-2-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄* y PDGF-BB-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ (200 ng de cada uno) se aportó en una matriz de fibrina, o se aportó típicamente a la duramadre antes del cierre cutáneo quirúrgico a una dosis algo superior (1 µg de cada uno, combinados). Después de 4 semanas, la curación ósea – caracterizada por deposición de tejido óseo y cobertura de los defectos – se analizó usando microtomografía digital (microCT). El aporte de GFs silvestres solos o dentro de fibrina incrementa ligeramente la curación ósea cuando se comparan con los defectos sin tratamiento o tratados solamente con fibrina. En contraste, el tratamiento con GFs fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ conducía a un incremento notable de la deposición de tejido óseo en comparación con GF silvestre. Para comparación, 1 µg habitualmente es insuficiente para tratar un defecto de la bóveda craneal de 6 mm en la rata (*Schmoekel HG y cols., 2005*), y son necesarias cantidades de miligramos de BMP-2 para tratar fracturas de tibia en seres humanos (*Gautschi OP y cols., 2007*).

Ejemplo 11: Manipulación del dominio de adhesión de proteínas de la ECM fusionadas al dominio PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

Para incorporar un dominio promotor de la adhesión celular dentro de matrices de fibrina, son útiles fusiones moleculares de FN III10 y FN III9-10 y PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. SEQ ID NO: 25 presenta un diseño que usa FN III9-10 que puede ser elaborado fácilmente por el experto que lea esta memoria descriptiva.

SEQ ID NO: 25: FN III9-10 humana-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

GLDSPTGIDFSDITANSFTVHWIAPRATITGYRIRHHPEHFSGRPREDRVPHSRNSITLT
 NLTPGTEYVVSIVALNGREESPLLIGQSTVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDPAVT
 VRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSK
 PISINYRTRRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

Ejemplo 12: Manipulación de un fármaco proteínico para la liberación sostenida desde matrices de fibrina utilizando el dominio PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

Se sabe que PTH1-34 es útil para regular la masa ósea sistémica, y se ha mostrado que la aplicación local de variantes de PTH1-34 que se unen a fibrina estimula la formación ósea local (*Arrighi I y cols., 2009*). Se diseña una proteína de fusión de PTH1-34 y PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ como en SEQ ID NO: 27; esta proteína puede ser elaborada fácilmente por el experto que lea esta memoria descriptiva.

SEQ ID NO: 26: PTH1-34 humana

SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKQLQDVHNF

SEQ ID NO: 27: PTH1-34 humana-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFRRRPPKGRGKRRREKQRPTDCH

L

Ejemplo 13: Manipulación de un inhibidor de proteasa fusionado a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

5 La fibrina se ha usado clínicamente durante mucho tiempo para la hemostasia y la selladura, sin embargo, la ampliación del uso en otras aplicaciones ha estado limitada debido a su reabsorción relativamente rápida in vivo, incluso con la adición de aprotinina u otros inhibidores de proteasa. La retención del inhibidor de proteasa aprotinina en matrices de fibrina se puede conseguir mediante el diseño y el uso de una fusión de aprotinina con PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. Esta fusión se diseña como en SEQ ID NO: 29; esta proteína puede ser elaborada fácilmente por el experto que lea esta memoria descriptiva.

SEQ ID NO: 28: aprotinina bovina

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGG

10 A

SEQ ID NO: 29: aprotinina bovina-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGG
ARRRPPKGRGKRRREKQRPTDCHL

Ejemplo 14: Manipulación de una quimiocina fusionada a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

15 Las quimiocinas que se unen a fibrina son útiles en inmunomodulación e inmunoterapia, incluyendo vacunación. Se diseñan fusiones de las quimiocinas CXCL10, CXCL11, IFN- γ y CCL21 con PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ en SEQ ID NO: 31, 33, 35 y 37, respectivamente. Estas proteínas pueden ser elaboradas fácilmente por el experto que lea esta memoria descriptiva.

SEQ ID NO: 30: CXCL10 humano

VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCLNPESKAI
KNLLKAVSKERSKRSP

20 SEQ ID NO: 31: CXCL10 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

VPLSRTVRCTCISISNQPVNPRSLEKLEIIPASQFCPRVEIATMKKKGEKRCLNPESKAI
KNLLKAVSKERSKRSPRRRPPKGRGKRRREKQRPTDCHL

SEQ ID NO: 32: CXCL11 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKGQRCLNPKS
KQARLIKKVERKNF

SEQ ID NO: 33: CXCL11 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

25 FPMFKRGRCLCIGPGVKAVKVADIEKASIMYPSNNCDKIEVIITLKENKGQRCLNPKS
KQARLIKKVERKNFRRRPPKGRGKRRREKQRPTDCHL

SEQ ID NO: 34: IFN- γ humano

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLF
KNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELI
QVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRG

SEQ ID NO: 35: IFN- γ humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLF
KNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELI
QVMAELSPA AKTGKRKRSQMLFRGRRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

SEQ ID NO: 36: CCL21 humano

5 SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKEL
WVQQLMQHLDKTPSPQKPAQGCRKDRGASKTGKKGKSGKCKRTERSQTPKGP

SEQ ID NO: 37: CCL21 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

SDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRKQEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKEL
WVQQLMQHLDKTPSPQRRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

Ejemplo 15: Manipulación de un péptido y un antígeno proteínico fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

10 La L-dopacromo tautomerasa, también llamada proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP-2), se ha identificado
como un antígeno asociado a melanoma humano y es expresado por la mayoría de los melanomas así como
melanocitos normales en seres humanos y ratones. Las células dendríticas impulsadas con proteína o péptido de
TRP-2 humana han mostrado la inducción de células T CD8+ específicas, sugiriendo que las células específicas del
epítipo 180-188 de células T TRP-2 CD81 (trp2) autorreactivas pueden evitar la selección tímica (*Sierro SR y cols.,*
15 2011). La afinidad de unión a fibrina de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se puede usar para incorporar antígenos en matrices de fibrina
usadas como vacunas. Un antígeno pertinente para una vacuna contra el cáncer en el tratamiento del melanoma se
diseña como SEQ ID NO: 39, que comprende un antígeno peptídico específico procedente de TRP-2, y como SEQ
ID NO: 41, que comprende toda la proteína TRP-2, en ambos casos fusionados a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄. Estos ejemplos se
diseñan y presentan para mostrar cómo los expertos pueden adaptar fácilmente estos métodos para usar estos u
otros antígenos.

20 SEQ ID NO: 38: L-dopacromo tautomerasa 180-188 humana

SVYDFFVWL

SEQ ID NO: 39: sitio de escisión de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ humano/plasmina derivado de factor X/L-dopacromo tautomerasa
180-188

RRRPKGRGKRRREKQRPTDCHLITFRSVYDFFVWL

25 SEQ ID NO: 40: L-dopacromo tautomerasa humana

QFPRVCM TVDSL VNKECCPRLGAESANVCGSQGRGQCTEVRADTRPWSGPYILRN
QDDRELWPRKFFHRTCKCTGNFAGYNCGDCKFGWTGPNCERKKPPVIRQNIHSLSP
QEREQFLGALDLAKKRVHPDYVITTQHWLGLLPNGTQPQFANCSVYDFFVWLHY
YSVRD TLLGPRPYRAIDFSHQGPAFVTWHRYHLLCLERDLQRLIGNESFALPYWNF
ATGRNECDVCTDQLFGAARPDDPTLISRNSRFSSWETVCDSLDDYNHLVTL CNGTYE

GLLRRNQMGRNSMKLPTLKDIRDCLSLQKFDNPPFFQNSTFSFRNALEGFDKADGTL
 DSQVMSLHNLVHSFLNGTNALPHSAANDPIFVVLHSFTDAIFDEWMKRFPADAW
 PQELAPIGHNRMYNMVPFFPPVTNEELFLTSDQLGYSYAIDL PVSVEETPGWPTLLV
 VMGTLVALVGLFVLLAFLQYRRLRK GYTPLMETHLSSKRYTEEA

SEQ ID NO: 41: L-dopacromo tautomerasa humana-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

QFPRVCMTVDSL VNKECCPRLGAESANVCGSQQGRGQCTEVRADTRPWSGPYILRN
 QDDRELWPRKFFHRTCKCTGNFAGYNCGDCKFGWTGPNCERKKPPVIRQNIHSLSP
 QEREQFLGALDLAKKRVPDYVITTHWLGLLGPNGTQPQFANCSVYDFFVWLHY
 YSVRDTLLGPRPYRAIDFSHQGPAFVTWHRYHLLCLERDLQRLIGNESFALPYWNF
 ATGRNECDVCTDQLFGAARPDPTLISRNSRFSSWETVCDSLDDYNHLVTLNNGTYE
 GLLRRNQMGRNSMKLPTLKDIRDCLSLQKFDNPPFFQNSTFSFRNALEGFDKADGTL
 DSQVMSLHNLVHSFLNGTNALPHSAANDPIFVVLHSFTDAIFDEWMKRFPADAW
 PQELAPIGHNRMYNMVPFFPPVTNEELFLTSDQLGYSYAIDL PVSVEETPGWPTLLV
 VMGTLVALVGLFVLLAFLQYRRLRKGYTPLMETHLSSKRYTEEARRRPKGRGKRRR
 EKQRPTDCHL

Ejemplo 16: Manipulación del agonista del receptor de tipo Toll fusionado a PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

- 5 Las vacunas con señales de peligro incorporadas proporcionan señales para activar respuestas inmunitarias a antígenos incorporados. El fragmento de proteína de la ECM dominio globular de fibrina (también denominado el dominio globular de fibrinógeno) de TNC es una de estas señales de peligro. El dominio de señal de peligro se puede incorporar en matrices de fibrina por la afinidad de PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ para la fibrina. Una proteína de fusión del glóbulo de fibrina de TNC (SEQ ID NO: 42) y PIGF2₁₂₃₋₁₄₄ se diseña en SEQ ID NO: 43.

- 10 SEQ ID NO: 42: dominio globular de fibrinógeno de TNC humano

GLLYPFPKDCSQAMLNDDTTSGLYTIYLNKDKAQALEVFCDMTSDGGGWIVFLRRK
 NGRENFYQNWKAYAAGFGDRREEFLHWLGLDNLNKITAQQQYELRVDLRDHGETA
 FAVYDKFSVGD AKTRYKLVKVEGYSGTAGDSMAYHNRSFSTFDKDTDSAITNCALS
 YKGAFWYRNCHRVNLMGRYGDNNHSQGVNWFHWKGHEHSIQFAEMKLRPSNFRN
 LEGRRKRA

SEQ ID NO: 43: dominio globular de fibrinógeno de TNC humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

GLLYPFPKDCSQAMLNDDTTSGLYTIYLNKDKAQALEVFCDMTSDGGGWIVFLRRK
 NGRENFYQNWKAYAAGFGDRREEFLHWLGLDNLNKITAQQQYELRVDLRDHGETA
 FAVYDKFSVGD AKTRYKLVKVEGYSGTAGDSMAYHNRSFSTFDKDTDSAITNCALS
 YKGAFWYRNCHRVNLMGRYGDNNHSQGVNWFHWKGHEHSIQFAEMKLRPSNFRN
 LEGRRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

- 15 Ejemplo 17: Retención tisular de citocinas que contienen el PIGF2₁₂₃₋₁₄₄.

Se ha mostrado que la citocina FGF18 conduce a una reparación mejorada del cartílago cuando se inyecta en las articulaciones de animales en modelos de osteoartritis (*Moore EE y cols., 2005*). La eliminación desde la zona de

inyección limita la eficacia de este enfoque. Una variante de FGF18 que se une a la matriz extracelular es proporcionada por una proteína de fusión entre FGF18 y PIGF2₁₂₃₋₁₄₄, diseñada en SEQ ID NO: 45. Esta proteína puede ser fácilmente elaborada por el experto leyendo esta memoria descriptiva, así como otros vehículos para otros agentes o citocinas.

5 SEQ ID NO: 44: FGF18 humano

EENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYA
 QLLVETDTFGSQVRIKGGKETFYLCMNRKGKLVGKPDGTSKECVFIEKVLENNYTAL
 MSAKYSGWYVGFTKKGRPRKGPKTRENQQDVHFMKRYPKGQPELQKPFKYTTVTK
 RSRRIRPHTPA

SEQ ID NO: 45: FGF18 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₄₄

EENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYA
 QLLVETDTFGSQVRIKGGKETFYLCMNRKGKLVGKPDGTSKECVFIEKVLENNYTAL
 MSAKYSGWYVGFTKKGRPRKGPKTRENQQDVHFMKRYPKGQPELQKPFKYTTVTK
 RSRRIRPHTPARRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL

10 Se pueden elaborar otras variantes de FGF-18 en las que un dominio natural dentro de FGF-18 se reemplaza por un dominio de PIFG-2. Existe un dominio de unión a heparina hipotético dentro de FGF-18, a saber KRYPKGQPELQKPFKYTTVTKRSRRIR (SEQ ID NO: 56), cuyo dominio clave es KRSRRIR (SEQ ID NO: 57). Así, una ejecución sustitutiva es reemplazar el dominio KRSRRIR por un dominio de PIGF2, por ejemplo SEQ ID NO: 53.

SEQ ID NO: 53: FGF18 humano-PIGF2₁₂₃₋₁₃₈

EENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYA
 QLLVETDTFGSQVRIKGGKETFYLCMNRKGKLVGKPDGTSKECVFIEKVLENNYTAL
 MSAKYSGWYVGFTKKGRPRKGPKTRENQQDVHFMKRYPKGQPELQKPFKYTTVTR
 15 RRPKGRGKRRREKQRPTHPA

Un segundo ejemplo sustitutivo es prolongar el dominio de PIGF2 en su extremo N terminal a fin de ajustar mejor los aminoácidos dentro de FGF-18, SEQ ID NO: 54, usando PIGF2₁₁₉₋₁₄₄, a saber MKPERRRPKGRGKRRREKQRPTDCHL (SEQ ID NO: 55) También existen otras ejecuciones posibles.

SEQ ID NO: 54: FGF18 humano-PIGF2₁₂₁₋₁₃₈

EENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYQLYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYA
 QLLVETDTFGSQVRIKGGKETFYLCMNRKGKLVGKPDGTSKECVFIEKVLENNYTAL
 MSAKYSGWYVGFTKKGRPRKGPKTRENQQDVHFMKPERRRPKGRGKRRREKQRPT
 20 HPA

25 La citocina TGF-β3 se ha explorado intensivamente en la limitación de cicatrices dérmicas, por ejemplo cicatrices de incisión posquirúrgicas. La citocina se ha inyectado a lo largo de estas líneas de incisión (*Ferguson MW y cols., 2009*). La eliminación desde la zona de inyección limita la eficacia de este enfoque. Una variante de TGF-β3 que se une a la matriz extracelular se proporciona mediante una proteína de fusión entre TGF-β3 y PIGF2_{123-144*}, diseñada en SEQ ID NO: 47. Esta proteína puede ser fácilmente elaborada por el experto leyendo esta memoria descriptiva, así como otros vehículos para otros agentes o citocinas.

SEQ ID NO: 46: TGF-β3 humano:

ES 2 663 230 T3

ALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWHEPKGYIANFCSGPCPYLRSADT
THSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYVGRTPKVEQLSNMVVKSKCS

SEQ ID NO: 47: PIGF2_{123-144*}-TGF- β 3 humana:

RRRPKGRGKRRREKQRPTDHLALDTNYCFRNLEENCCVRPLYIDFRQDLGWKWWH
EPKGYIANFCSGPCPYLRSADTTHSTVLGLYNTLNPEASASPCCVPQDLEPLTILYYV
GRTPKVEQLSNMVVKSKCS

REFERENCIAS

- Affolter M, Basler K (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 8:663-674.
- 5 Arrighi I y cols. (2009). Bone healing induced by local delivery of an engineered parathyroid hormone prodrug. *Biomaterials* 30:1763-1771.
- Berrier AL, Yamada KM (2007). Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565-573.
- Chan RK y cols. (2006). Effect of recombinant platelet-derived growth factor (Regranex) on wound closure in genetically diabetic mice. *J Burn Care Res* 27:202-205.
- 10 Cross M, Dexter TM (1991). Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 64:271-280.
- Danen EH y cols. (1995). Requirement for the synergy site for cell adhesion to fibronectin depends on the activation state of integrin alpha 5 beta 1. *J Biol Chem* 270:21612-21618.
- Davidson JM (1998). Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res* 290 Suppl:S1-11.
- 15 Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 324:1673-1677.
- Ferguson MW y cols. (2009). Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet* 373:1264-1274.
- Flick MJ y cols. (2004). Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *J Clin Invest* 113:1596-1606.
- 20 Galiano RD y cols. (2004). Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 164:1935-1947.
- Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R (2007). Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77:626-631.
- 25 Golledge J y cols. (2011). The role of tenascin C in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 92:19-28.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008). Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314-321.
- Hanft JR y cols. (2008). Phase I trial on the safety of topical rhVEGF on chronic neuropathic diabetic foot ulcers. *J Wound Care* 17:30-32, 34-37.
- 30 Hantgan RR, Francis CW, Marder VJ (1994) Chapter 14: Fibrinogen structure and physiology (Lippincott Company, Philadelphia) 3rd Ed.
- Hinz B (2009). The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech*:doi:10.1016/j.biomech.2009.1009.1020.
- 35 Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990). The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1:60-68.
- Hollinger JO y cols. (2008). Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1:48-54.
- Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA (2009). Materials engineering for immunomodulation. *Nature* 462:449-460.

- Imanaka-Yoshida K y cols. (2001). Serial extracellular matrix changes in neointimal lesions of human coronary artery after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical significance of early tenascin-C expression. *Virchows Arch* 439:185-190.
- 5 Janmey PA, Winer JP, Weisel JW (2009). Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface* 6:1-10.
- Joester A, Faissner A (2001). The structure and function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biol* 20:13-22.
- Jones FS, Jones PL (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Dev Dyn* 218:235-259.
- 10 Krammer A y cols. (2002). A structural model for force regulated integrin binding to fibronectin's RGD-synergy site. *Matrix Biol* 21:139-147.
- Lindahl U, Li JP (2009). Interactions between sulfato de heparano and proteins - design and functional implications. *Int Rev Cell Molec Biol* 276:105-159.
- 15 Lorand L, Graham RM (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4:140-156.
- Lorentz KM, Kontos S, Frey P, Hubbell JA (2011). Engineered aprotinin for improved stability of fibrin biomaterials. *Biomaterials* 32:430-438.
- Makarenkova HP y cols. (2009). Differential interactions of FGFs with heparan sulfate control gradient formation and branching morphogenesis. *Sci Signal* 2:ra55.
- 20 Mao Y, Schwarzbauer JE (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* 24:389-399.
- Mardon HJ, Grant KE (1994). The role of the ninth and tenth type III domains of human fibronectin in cell adhesion. *FEBS Lett* 340:197-201.
- 25 Martino MM, Hubbell JA (2010). The 12th-14th type III repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth factor-binding domain. *Faseb J* 24:4711-4721.
- Midwood K y cols. (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med* 15:774-780.
- Midwood KS, Hussenet T, Langlois B, Orend G (2011). Advances in tenascin-C biology. *Cell Mol Life Sci* 68:3175-3199.
- 30 Moore EE y cols. (2005). Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 13:623-631.
- Mosesson MW (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 3:1894-1904.
- 35 Mould AP y cols. (1997). Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit. *J Biol Chem* 272:17283-17292.
- Muschler GF y cols. The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 16:123-145.
- 40 O'Connell JT y cols. (2011). VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16002-16007.

- Orend G (2005). Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1066-1083.
- 5 Oskarsson T y cols. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 17:867-874.-Pankov R, Yamada KM (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115:3861-3863.
- Patterson J, Martino MM, Hubbell JA (2010). Biomimetic materials in tissue engineering. *Mater Today* 13:14-22.
- Peng H y cols. (2004). Identification of a binding site on human FGF-2 for fibrinogen. *Blood* 103:2114-2120.
- Peng Q y cols. (2009). Mechanical design of the third FnIII domain of tenascin-C. *J Mol Biol* 386:1327-1342.
- 10 Ribatti D (2008). The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis* 11:215-221.
- Robson MC y cols. (1992). The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg* 216:401-406; discussion 406-408.
- 15 Robson MC y cols. (1992). Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet* 339:23-25.
- Robson MC y cols. (2001). Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair Regen* 9:347-352.
- Rossi D, Zlotnik A (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-242.
- 20 Sahni A, Odrliin T, Francis CW (1998). Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *Journal of Biological Chemistry* 273:7554-7559.
- Sahni A y cols. (2006). FGF-2 binding to fibrin(ogen) is required for augmented angiogenesis. *Blood* 107:126-131.
- Sakiyama SE, Schense JC, Hubbell JA (1999). Incorporation of heparin-binding peptides into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering. *Faseb J* 13:2214-2224.
- 25 Schense JC, Hubbell JA (1999). Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa. *Bioconjug Chem* 10:75-81.
- Schmoekel HG y cols. (2005). Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng* 89:253-262.
- 30 Schultz GS, Wysocki A (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 17:153-162.
- Sierro SR y cols. (2011). Combination of lentivector immunization and low-dose chemotherapy or PD-1/PD-L1 blocking primes self-reactive T cells and induces anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 41:2217-2228.
- Standeven KF y cols. (2007). Functional analysis of fibrin {gamma}-chain cross-linking by activated factor XIII: determination of a cross-linking pattern that maximizes clot stiffness. *Blood* 110:902-907.
- 35 Sullivan SR y cols. (2004). Validation of a model for the study of multiple wounds in the diabetic mouse (db/db). *Plast Reconstr Surg* 113:953-960.
- Trebaul A, Chan EK, Midwood KS (2007). Regulation of fibroblast migration by tenascin-C. *Biochem Soc Trans* 35:695-697.

- Udalova IA, Ruhmann M, Thomson SJ, Midwood KS (2011). Expression and immune function of tenascin-C. *Crit Rev Immunol* 31:115-145.
- Ugarova TP, Yakubenko VP (2001). Recognition of fibrinogen by leukocyte integrins. *Ann N Y Acad Sci* 936:368-385.
- 5 Vilcek J, Feldmann M (2004). Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 25:201-209.
- Weber P, Zimmermann DR, Winterhalter KH, Vaughan L (1995). Tenascin-C binds heparin by its fibronectin type III domain five. *J Biol Chem* 270:4619-4623.
- 10 Weisel JW (2004). The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys Chem* 112:267-276.
- Weisel JW (2007). Structure of fibrin: impact on clot stability. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:116-124.
- Werner S, Grose R (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83:835-870.
- 15 Yokosaki Y y cols. (1998). Identification of the ligand binding site for the integrin alpha9 beta1 in the third fibronectin type III repeat of tenascin-C. *The Journal of biological chemistry* 273:11423-11428.
- Kilarski WW y cols. (2013). Intravital immunofluorescence for visualizing the microcirculatory and immune microenvironments in the mouse ear dermis. *PLoS One* 8:e57135.
- Lasarte JJ y cols. (2007). The extra domain A from fibronectin targets antigens to TLR4-expressing cells and induces cytotoxic T cell responses in vivo. *J Immunol* 178:748-756.
- 20 Mansilla C y cols. (2009). Immunization against hepatitis C virus with a fusion protein containing the extra domain A from fibronectin and the hepatitis C virus NS3 protein. *J Hepatol* 51:520-527.
- Migdal M y cols. (1998). Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* 273:22272-22278.
- Pan Q y cols. (2007). Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J Biol Chem* 282:24049-24056.
- 25 Simons M, Ware JA (2003). Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2:863-871.
- Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) y VEGF(121). *J Biol Chem* 276:25520-25531.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ECOLE POLYTECHNIQUE FEDERALE DE LAUSANNE (EPFL)

<120> PÉPTIDO QUE SE UNE A PROTEÍNAS AISLADO DE FACTOR DE CRECIMIENTO PLACENTARIO

<130> 131662WO

5 <150> US 61/667, 630

< 151> 2012-07-03

<160> 62

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 < 211> 15

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> Porción de la fusión GST-PIGF2

15 <400> 1

Arg	Arg	Arg	Pro	Lys	Gly	Arg	Gly	Lys	Arg	Arg	Arg	Glu	Lys	Gln
1				5					10					15

<210> 2

< 211> 8

< 212> PRT

20 < 213> Artificial

<220>

< 223> Fragmento de GSP-PIGF2

<400> 2

Gly	Lys	Arg	Arg	Arg	Glu	Lys	Gln
1				5			

25 <210> 3

< 211> 8

< 212> PRT

< 213> Artificial
 <220>
 < 223> Fragmento de GSP_PIGF2
 <400> 3
 5 Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly
 1 5
 <210> 4
 < 211> 22
 < 212> PRT
 < 213> Artificial
 10 <220>
 < 223> Porción de PIGF2 humano
 <400> 4
 Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 1 5 10 15
 Pro Thr Asp Cys His Leu
 20
 <210> 5
 15 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> artificial
 <220>
 < 223> porción de PIGF2 de ratón.
 20 <400> 5
 Arg Arg Lys Thr Lys Gly Lys Arg Lys Arg Ser Arg Asn Ser Gln Thr
 1 5 10 15
 Glu Glu Pro His Pro
 20
 <210> 6
 < 211> 120
 < 212> PRT

ES 2 663 230 T3

< 213> Artificial

<220>

< 223> porción de VEGF-A121 humano

<400> 6

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80

5

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110

Gln Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg
115 120

<210> 7

< 211> 142

< 212> PRT

10

< 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de VEGF-A121 y dominio de PlGF2

<400> 7

ES 2 663 230 T3

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
 1 5 10 15

Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
 20 25 30

Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
 35 40 45

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Glu
 50 55 60

Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
 65 70 75 80

Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe
 85 90 95

Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
 100 105 110

Gln Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys
 115 120 125

Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu Cys Asp Lys Pro Arg Arg
 130 135 140

<210> 8

< 211> 109

< 212> PRT

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> porción de PDGF humano

<400> 8

ES 2 663 230 T3

Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys
1 5 10 15

Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg
20 25 30

Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg
35 40 45

Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln
50 55 60

Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys
65 70 75 80

Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala
85 90 95

Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr
100 105

<210> 9

< 211> 131

< 212> PRT

5

< 213> homo sapiens

<400> 9

Ser Leu Gly Ser Leu Thr Ile Ala Glu Pro Ala Met Ile Ala Glu Cys
1 5 10 15

Lys Thr Arg Thr Glu Val Phe Glu Ile Ser Arg Arg Leu Ile Asp Arg
20 25 30

Thr Asn Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg
35 40 45

Cys Ser Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln
50 55 60

Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Ile Glu Ile Val Arg Lys
65 70 75 80

Lys Pro Ile Phe Lys Lys Ala Thr Val Thr Leu Glu Asp His Leu Ala
85 90 95

Cys Lys Cys Glu Thr Val Ala Ala Ala Arg Pro Val Thr Arg Arg Arg
100 105 110

ES 2 663 230 T3

Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp
115 120 125

Cys His Leu
130

<210> 10

< 211> 114

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu
85 90 95

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
100 105 110

Cys Arg

<210> 11

< 211> 135

10 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de BMP-2 y dominio de PIGF2

<400> 11

15 Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
1 5 10 15

ES 2 663 230 T3

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
 20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
 35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
 50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
 65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu
 85 90 95

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
 100 105 110

Cys Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln
 115 120 125

Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
 130 135

<210> 12

< 211> 124

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de BMP-2 y dominio de PIGF2

<400> 12

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 1 5 10 15

Pro Thr Asp Cys His Leu Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp
 20 25 30

Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr
 35 40 45

His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His
 50 55 60

Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val
 65 70 75 80

Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala

ES 2 663 230 T3

< 213> homo sapiens

<400> 14

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1 5 10 15
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
35 40 45
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60
Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65 70

<210> 15

5

< 211> 92

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de IGF-I y dominio de PIGF2

10

<400> 15

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
1 5 10 15
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
35 40 45
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60
Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg
65 70 75 80
Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
85 90

<210> 16

< 211> 112

< 212> PRT

ES 2 663 230 T3

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
 20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
 100 105 110

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 115 120 125

Pro Thr Asp Cys His Leu
 130

<210> 18

< 211> 134

5 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> fusión de PIGf2 y TGF beta

<400> 18

ES 2 663 230 T3

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 1 5 10 15

Pro Thr Asp Ser His Leu Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
 20 25 30

Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys
 35 40 45

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn
 50 55 60

Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
 65 70 75 80

Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala
 85 90 95

Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr
 100 105 110

Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
 115 120 125

Arg Ser Cys Lys Cys Ser
 130

<210> 19

< 211> 112

< 212> PRT

5 < 213> homo sapiens

<400> 19

ES 2 663 230 T3

Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn Val Gln Asp Asn Cys Cys
1 5 10 15

Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn Phe Cys Ala Gly Ala Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu
50 55 60

Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Ser
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr Pro
85 90 95

Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 20

< 211> 134

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de PIGF2 y TGF beta 2 humanos

<400> 20

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
1 5 10 15

Pro Thr Asp Ser His Leu Ala Leu Asp Ala Ala Tyr Cys Phe Arg Asn
20 25 30

Val Gln Asp Asn Cys Cys Leu Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg
35 40 45

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr Asn Ala Asn
50 55 60

Phe Cys Ala Gly Ala Cys Pro Tyr Leu Trp Ser Ser Asp Thr Gln His
65 70 75 80

Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn Thr Ile Asn Pro Glu Ala Ser Ala
85 90 95

Ser Pro Cys Cys Val Ser Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr

ES 2 663 230 T3

100 105 110

Tyr Ile Gly Lys Thr Pro Lys Ile Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
 115 120 125

Lys Ser Cys Lys Cys Ser
 130

<210> 21

< 211> 119

< 212> PRT

5 < 213> homo sapiens

<400> 21

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
 1 5 10 15

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
 20 25 30

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
 35 40 45

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
 50 55 60

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
 65 70 75 80

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
 85 90 95

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
 100 105 110

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
 115

<210> 22

< 211> 140

10 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de BDNF y dominio de PIGF2

<400> 22

ES 2 663 230 T3

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
1 5 10 15

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
20 25 30

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
35 40 45

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
50 55 60

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
65 70 75 80

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
85 90 95

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
100 105 110

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg
115 120 125

Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
130 135 140

<210> 23

< 211> 119

5

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 23

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser
1 5 10 15

Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly
20 25 30

His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45

Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys
50 55 60

Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys
65 70 75 80

Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu
85 90 95

ES 2 663 230 T3

Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu
100 105 110

Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr
115

<210> 24

< 211> 141

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de NT-3 y dominio de PIGF2

<400> 24

Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp Ser
1 5 10 15

Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg Gly
20 25 30

His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro Val
35 40 45

Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val Lys
50 55 60

Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys Lys
65 70 75 80

Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys Leu
85 90 95

Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala Leu
100 105 110

Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys
115 120 125

Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
130 135 140

10 <210> 25

< 211> 206

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

ES 2 663 230 T3

< 223> proteína de fusión de dominio de FN119 y dominio de PIGF2

<400> 25

Gly Leu Asp Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ser Phe Thr Val His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr
20 25 30

Arg Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp
35 40 45

Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro
50 55 60

Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu
65 70 75 80

Ser Pro Pro Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg
85 90 95

Asp Leu Glu Val Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp
100 105 110

Asp Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu
115 120 125

Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Lys
130 135 140

Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile
145 150 155 160

Thr Val Tyr Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys
165 170 175

Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly
180 185 190

Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
195 200 205

<210> 26

5

< 211> 34

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 26

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

ES 2 663 230 T3

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
 20 25 30

Asn Phe

<210> 27

< 211> 56

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de PTH1 y dominio de PIGF2

<400> 27

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
 1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
 20 25 30

Asn Phe Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys
 35 40 45

Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
 50 55

10 <210> 28

< 211> 58

< 212> PRT

< 213> Bos taurus

<400> 28

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
 1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
 20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
 35 40 45

15 Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
 50 55

<210> 29

< 211> 80

ES 2 663 230 T3

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de aprotinina y dominio de PIGF2

5

<400> 29

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
35 40 45

Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala Arg Arg Arg Pro Lys Gly
50 55 60

Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
65 70 75 80

<210> 30

< 211> 77

< 212> PRT

10

< 213> homo sapiens

<400> 30

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
1 5 10 15

Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
20 25 30

Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
35 40 45

Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
50 55 60

Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro
65 70 75

<210> 31

< 211> 99

15

< 212> PRT

ES 2 663 230 T3

< 213> proteína de fusión de CKCL10 y PIGF2

<400> 31

Val Pro Leu Ser Arg Thr Val Arg Cys Thr Cys Ile Ser Ile Ser Asn
1 5 10 15
Gln Pro Val Asn Pro Arg Ser Leu Glu Lys Leu Glu Ile Ile Pro Ala
20 25 30
Ser Gln Phe Cys Pro Arg Val Glu Ile Ile Ala Thr Met Lys Lys Lys
35 40 45
Gly Glu Lys Arg Cys Leu Asn Pro Glu Ser Lys Ala Ile Lys Asn Leu
50 55 60
Leu Lys Ala Val Ser Lys Glu Arg Ser Lys Arg Ser Pro Arg Arg Arg
65 70 75 80
Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp
85 90 95
Cys His Leu

5

<210> 32

< 211> 73

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

10

< 223> proteína de fusión de CXCL11 y dominio de PLGF2

<400> 32

Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys Ile Gly Pro Gly Val
1 5 10 15
Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala Ser Ile Met Tyr Pro
20 25 30
Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile Thr Leu Lys Glu Asn
35 40 45
Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile
50 55 60
Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe
65 70

<210> 33

ES 2 663 230 T3

< 211> 95

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

5 < 223> proteína de fusión de CXCL11 y dominio de PIGF2

<400> 33

Phe Pro Met Phe Lys Arg Gly Arg Cys Leu Cys Ile Gly Pro Gly Val
1 5 10 15

Lys Ala Val Lys Val Ala Asp Ile Glu Lys Ala Ser Ile Met Tyr Pro
20 25 30

Ser Asn Asn Cys Asp Lys Ile Glu Val Ile Ile Thr Leu Lys Glu Asn
35 40 45

Lys Gly Gln Arg Cys Leu Asn Pro Lys Ser Lys Gln Ala Arg Leu Ile
50 55 60

Ile Lys Lys Val Glu Arg Lys Asn Phe Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg
65 70 75 80

Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
85 90 95

<210> 34

< 211> 138

10 < 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 34

ES 2 663 230 T3

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125

Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly
 130 135

<210> 35

< 211> 160

5 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de interferón gamma y dominio de PLGF2

<400> 35

ES 2 663 230 T3

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95

Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125

Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Arg Pro Lys Gly
 130 135 140

Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
 145 150 155 160

<210> 36

< 211> 111

< 212> PRT

5 < 213> homo sapiens

<400> 36

ES 2 663 230 T3

Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys
1 5 10 15

Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu
20 25 30

Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln
35 40 45

Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu Leu Trp Val Gln Gln Leu Met
50 55 60

Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro Gln Lys Pro Ala Gln Gly Cys
65 70 75 80

Arg Lys Asp Arg Gly Ala Ser Lys Thr Gly Lys Lys Gly Lys Gly Ser
85 90 95

Lys Gly Cys Lys Arg Thr Glu Arg Ser Gln Thr Pro Lys Gly Pro
100 105 110

<210> 37

< 211> 96

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de CCL21 y dominio de PIGF2

<400> 37

Ser Asp Gly Gly Ala Gln Asp Cys Cys Leu Lys Tyr Ser Gln Arg Lys
1 5 10 15

Ile Pro Ala Lys Val Val Arg Ser Tyr Arg Lys Gln Glu Pro Ser Leu
20 25 30

Gly Cys Ser Ile Pro Ala Ile Leu Phe Leu Pro Arg Lys Arg Ser Gln
35 40 45

Ala Glu Leu Cys Ala Asp Pro Lys Glu Leu Trp Val Gln Gln Leu Met
50 55 60

Gln His Leu Asp Lys Thr Pro Ser Pro Gln Arg Arg Arg Pro Lys Gly
65 70 75 80

Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
85 90 95

10 <210> 38

< 211> 9

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 38

5 Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
1 5

<210> 39

< 211> 35

< 212> PRT

< 213> artificial

10 <220>

< 223> sitio de escisión de dominio de PIGF2 humano y plasmina

<400> 39

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
1 5 10 15

Pro Thr Asp Cys His Leu Ile Thr Phe Arg Ser Val Tyr Asp Phe Phe
20 25 30

Val Trp Leu
35

<210> 40

15 < 211> 496

< 212> PRT

< 213> homo sapiens

<400> 40

ES 2 663 230 T3

Gln Phe Pro Arg Val Cys Met Thr Val Asp Ser Leu Val Asn Lys Glu
1 5 10 15

Cys Cys Pro Arg Leu Gly Ala Glu Ser Ala Asn Val Cys Gly Ser Gln
20 25 30

Gln Gly Arg Gly Gln Cys Thr Glu Val Arg Ala Asp Thr Arg Pro Trp
35 40 45

Ser Gly Pro Tyr Ile Leu Arg Asn Gln Asp Asp Arg Glu Leu Trp Pro
50 55 60

Arg Lys Phe Phe His Arg Thr Cys Lys Cys Thr Gly Asn Phe Ala Gly
65 70 75 80

Tyr Asn Cys Gly Asp Cys Lys Phe Gly Trp Thr Gly Pro Asn Cys Glu
85 90 95

ES 2 663 230 T3

Arg Lys Lys Pro Pro Val Ile Arg Gln Asn Ile His Ser Leu Ser Pro
100 105 110

Gln Glu Arg Glu Gln Phe Leu Gly Ala Leu Asp Leu Ala Lys Lys Arg
115 120 125

Val His Pro Asp Tyr Val Ile Thr Thr Gln His Trp Leu Gly Leu Leu
130 135 140

Gly Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Phe Ala Asn Cys Ser Val Tyr Asp
145 150 155 160

Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser Val Arg Asp Thr Leu Leu Gly
165 170 175

Pro Gly Arg Pro Tyr Arg Ala Ile Asp Phe Ser His Gln Gly Pro Ala
180 185 190

Phe Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu Cys Leu Glu Arg Asp Leu
195 200 205

Gln Arg Leu Ile Gly Asn Glu Ser Phe Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe
210 215 220

Ala Thr Gly Arg Asn Glu Cys Asp Val Cys Thr Asp Gln Leu Phe Gly
225 230 235 240

Ala Ala Arg Pro Asp Asp Pro Thr Leu Ile Ser Arg Asn Ser Arg Phe
245 250 255

Ser Ser Trp Glu Thr Val Cys Asp Ser Leu Asp Asp Tyr Asn His Leu
260 265 270

Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu Gly Leu Leu Arg Arg Asn Gln
275 280 285

Met Gly Arg Asn Ser Met Lys Leu Pro Thr Leu Lys Asp Ile Arg Asp
290 295 300

Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Asn Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser
305 310 315

Thr Phe Ser Phe Arg Asn Ala Leu Glu Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly
325 330 335

Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu His Asn Leu Val His Ser Phe
340 345 350

ES 2 663 230 T3

Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His Ser Ala Ala Asn Asp Pro Ile
 355 360 365

Phe Val Val Leu His Ser Phe Thr Asp Ala Ile Phe Asp Glu Trp Met
 370 375 380

Lys Arg Phe Asn Pro Pro Ala Asp Ala Trp Pro Gln Glu Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met Val Pro Phe Phe Pro Pro Val
 405 410 415

Thr Asn Glu Glu Leu Phe Leu Thr Ser Asp Gln Leu Gly Tyr Ser Tyr
 420 425 430

Ala Ile Asp Leu Pro Val Ser Val Glu Glu Thr Pro Gly Trp Pro Thr
 435 440 445

Thr Leu Leu Val Val Met Gly Thr Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Phe
 450 455 460

Val Leu Leu Ala Phe Leu Gln Tyr Arg Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr
 465 470 475 480

Pro Leu Met Glu Thr His Leu Ser Ser Lys Arg Tyr Thr Glu Glu Ala
 485 490 495

<210> 41

< 211> 518

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de L-dopacromo tautomerasa humana y dominio de PIGF2

<400> 41

Gln Phe Pro Arg Val Cys Met Thr Val Asp Ser Leu Val Asn Lys Glu
 1 5 10 15

Cys Cys Pro Arg Leu Gly Ala Glu Ser Ala Asn Val Cys Gly Ser Gln
 20 25 30

Gln Gly Arg Gly Gln Cys Thr Glu Val Arg Ala Asp Thr Arg Pro Trp
 35 40 45

Ser Gly Pro Tyr Ile Leu Arg Asn Gln Asp Asp Arg Glu Leu Trp Pro
 50 55 60

ES 2 663 230 T3

Arg Lys Phe Phe His Arg Thr Cys Lys Cys Thr Gly Asn Phe Ala Gly
 65 70 75 80
 Tyr Asn Cys Gly Asp Cys Lys Phe Gly Trp Thr Gly Pro Asn Cys Glu
 85 90 95
 Arg Lys Lys Pro Pro Val Ile Arg Gln Asn Ile His Ser Leu Ser Pro
 100 105 110
 Gln Glu Arg Glu Gln Phe Leu Gly Ala Leu Asp Leu Ala Lys Lys Arg
 115 120 125
 Val His Pro Asp Tyr Val Ile Thr Thr Gln His Trp Leu Gly Leu Leu
 130 135 140
 Gly Pro Asn Gly Thr Gln Pro Gln Phe Ala Asn Cys Ser Val Tyr Asp
 145 150 155 160
 Phe Phe Val Trp Leu His Tyr Tyr Ser Val Arg Asp Thr Leu Leu Gly
 165 170 175
 Pro Gly Arg Pro Tyr Arg Ala Ile Asp Phe Ser His Gln Gly Pro Ala
 180 185 190
 Phe Val Thr Trp His Arg Tyr His Leu Leu Cys Leu Glu Arg Asp Leu
 195 200 205
 Gln Arg Leu Ile Gly Asn Glu Ser Phe Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Phe
 210 215 220
 Ala Thr Gly Arg Asn Glu Cys Asp Val Cys Thr Asp Gln Leu Phe Gly
 225 230 235 240
 Ala Ala Arg Pro Asp Asp Pro Thr Leu Ile Ser Arg Asn Ser Arg Phe
 245 250 255
 Ser Ser Trp Glu Thr Val Cys Asp Ser Leu Asp Asp Tyr Asn His Leu
 260 265 270
 Val Thr Leu Cys Asn Gly Thr Tyr Glu Gly Leu Leu Arg Arg Asn Gln
 275 280 285
 Met Gly Arg Asn Ser Met Lys Leu Pro Thr Leu Lys Asp Ile Arg Asp
 290 295 300
 Cys Leu Ser Leu Gln Lys Phe Asp Asn Pro Pro Phe Phe Gln Asn Ser
 305 310 315 320

ES 2 663 230 T3

Thr Phe Ser Phe Arg Asn Ala Leu Glu Gly Phe Asp Lys Ala Asp Gly
 325 330 335

Thr Leu Asp Ser Gln Val Met Ser Leu His Asn Leu Val His Ser Phe
 340 345 350

Leu Asn Gly Thr Asn Ala Leu Pro His Ser Ala Ala Asn Asp Pro Ile
 355 360 365

Phe Val Val Leu His Ser Phe Thr Asp Ala Ile Phe Asp Glu Trp Met
 370 375 380

Lys Arg Phe Asn Pro Pro Ala Asp Ala Trp Pro Gln Glu Leu Ala Pro
 385 390 395 400

Ile Gly His Asn Arg Met Tyr Asn Met Val Pro Phe Phe Pro Pro Val
 405 410 415

Thr Asn Glu Glu Leu Phe Leu Thr Ser Asp Gln Leu Gly Tyr Ser Tyr
 420 425 430

Ala Ile Asp Leu Pro Val Ser Val Glu Glu Thr Pro Gly Trp Pro Thr
 435 440 445

Thr Leu Leu Val Val Met Gly Thr Leu Val Ala Leu Val Gly Leu Phe
 450 455 460

Val Leu Leu Ala Phe Leu Gln Tyr Arg Arg Leu Arg Lys Gly Tyr Thr
 465 470 475 480

Pro Leu Met Glu Thr His Leu Ser Ser Lys Arg Tyr Thr Glu Glu Ala
 485 490 495

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 500 505 510

Pro Thr Asp Cys His Leu
 515

<210> 42

< 211> 229

< 212> PRT

5 < 213> homo sapiens

<400> 42

Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn
 1 5 10 15

ES 2 663 230 T3

Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys
 20 25 30

Ala Gln Ala Leu Glu Val Phe Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly
 35 40 45

Trp Ile Val Phe Leu Arg Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln
 50 55 60

Asn Trp Lys Ala Tyr Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe
 65 70 75 80

Leu His Trp Leu Gly Leu Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly
 85 90 95

Gln Tyr Glu Leu Arg Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe
 100 105 110

Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys
 115 120 125

Leu Lys Val Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr
 130 135 140

His Asn Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala
 145 150 155 160

Ile Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
 165 170 175

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His Ser
 180 185 190

Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser Ile Gln
 195 200 205

Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn Leu Glu Gly
 210 215 220

Arg Arg Lys Arg Ala
 225

<210> 43

< 211> 246

< 212> PRT

5 < 213> artificial secuencia

<220>

< 223> proteína de fusión de dominio globular de fibrinógeno de tenascina y dominio de PIGF2

<400> 43

ES 2 663 230 T3

Gly Leu Leu Tyr Pro Phe Pro Lys Asp Cys Ser Gln Ala Met Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Asp Thr Thr Ser Gly Leu Tyr Thr Ile Tyr Leu Asn Gly Asp Lys
 20 25 30

Ala Gln Ala Leu Glu Val Phe Cys Asp Met Thr Ser Asp Gly Gly Gly
 35 40 45

Trp Ile Val Phe Leu Arg Arg Lys Asn Gly Arg Glu Asn Phe Tyr Gln
 50 55 60

Asn Trp Lys Ala Tyr Ala Ala Gly Phe Gly Asp Arg Arg Glu Glu Phe
 65 70 75 80

Leu His Trp Leu Gly Leu Asp Asn Leu Asn Lys Ile Thr Ala Gln Gly
 85 90 95

Gln Tyr Glu Leu Arg Val Asp Leu Arg Asp His Gly Glu Thr Ala Phe
 100 105 110

Ala Val Tyr Asp Lys Phe Ser Val Gly Asp Ala Lys Thr Arg Tyr Lys
 115 120 125

Leu Lys Val Glu Gly Tyr Ser Gly Thr Ala Gly Asp Ser Met Ala Tyr
 130 135 140

His Asn Gly Arg Ser Phe Ser Thr Phe Asp Lys Asp Thr Asp Ser Ala
 145 150 155 160

Ile Thr Asn Cys Ala Leu Ser Tyr Lys Gly Ala Phe Trp Tyr Arg Asn
 165 170 175

Cys His Arg Val Asn Leu Met Gly Arg Tyr Gly Asp Asn Asn His Ser
 180 185 190

Gln Gly Val Asn Trp Phe His Trp Lys Gly His Glu His Ser Ile Gln
 195 200 205

Phe Ala Glu Met Lys Leu Arg Pro Ser Asn Phe Arg Asn Leu Glu Gly
 210 215 220

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 225 230 235 240

Pro Thr Asp Cys His Leu
 245

<210> 44

< 211> 180

5 < 212> PRT

< 213> homo sapiens

ES 2 663 230 T3

<400> 44

Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala
1 5 10 15

Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser
20 25 30

Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala
35 40 45

Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp
50 55 60

Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr
85 90 95

Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr
100 105 110

Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys
115 120 125

Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp
130 135 140

Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys
145 150 155 160

Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro
165 170 175

Thr His Pro Ala
180

<210> 45

< 211> 202

5 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de FGF-18 y dominio de PIGF2

<400> 45

ES 2 663 230 T3

Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala
 1 5 10 15
 Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala
 35 40 45
 Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp
 50 55 60
 Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr
 65 70 75 80
 Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr
 85 90 95
 Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr
 100 105 110
 Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys
 115 120 125
 Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp
 130 135 140
 Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys
 145 150 155 160
 Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro
 165 170 175
 Thr His Pro Ala Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg
 180 185 190
 Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
 195 200

<210> 46

< 211> 112

< 212> PRT

5 < 213> homo sapiens

<400> 46

ES 2 663 230 T3

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn Leu Glu Glu Asn Cys Cys
1 5 10 15

Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn Phe Cys Ser Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu
50 55 60

Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala Ser Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val Lys Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 47

< 211> 134

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> proteína de fusión de TGF beta3 y dominio de PIGF2

<400> 47

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
1 5 10 15

Pro Thr Asp Ser His Leu Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Arg Asn
20 25 30

Leu Glu Glu Asn Cys Cys Val Arg Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Gln
35 40 45

Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys Gly Tyr Tyr Ala Asn
50 55 60

Phe Cys Ser Gly Pro Cys Pro Tyr Leu Arg Ser Ala Asp Thr Thr His
65 70 75 80

Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn Thr Leu Asn Pro Glu Ala Ser Ala

ES 2 663 230 T3

85

90

95

Ser Pro Cys Cys Val Pro Gln Asp Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr
 100 105 110

Tyr Val Gly Arg Thr Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Val Val
 115 120 125

Lys Ser Cys Lys Cys Ser
 130

<210> 48

< 211> 5

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> motivo de adhesión

<400> 48

Ile Asp Ala Pro Ser
 1 5

10 <210> 49

< 211> 7

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

15 < 223> motivo de adhesión

<400> 49

Ile Asp Gly Ile His Glu Leu
 1 5

<210> 50

< 211> 8

20 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> residuos 1 a 8 de inhibidor de plasmina alfa-2

ES 2 663 230 T3

Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala
 1 5 10 15
 Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala
 35 40 45
 Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp
 50 55 60
 Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr
 65 70 75 80
 Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr
 85 90 95
 Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr
 100 105 110
 Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys
 115 120 125
 Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp
 130 135 140
 Val His Phe Met Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys
 145 150 155 160
 Pro Phe Lys Tyr Thr Thr Val Thr Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly
 165 170 175
 Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr His Pro Ala
 180 185

<210> 54

<211> 172

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> proteína de fusión de FGF -18 y dominio de PIGF2

<400> 54

ES 2 663 230 T3

Glu Glu Asn Val Asp Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala
1 5 10 15

Arg Asp Asp Val Ser Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser
20 25 30

Arg Thr Ser Gly Lys His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala
35 40 45

Arg Gly Glu Asp Gly Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp
50 55 60

Thr Phe Gly Ser Gln Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Cys Met Asn Arg Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr
85 90 95

Ser Lys Glu Cys Val Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr
100 105 110

Ala Leu Met Ser Ala Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys
115 120 125

Lys Gly Arg Pro Arg Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp
130 135 140

Val His Phe Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys
145 150 155 160

Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr His Pro Ala
165 170

<210> 55

< 211> 26

5 < 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> porción de dominio de PIGF2

<400> 55

Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg
1 5 10 15

10 Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu
20 25

<210> 56

< 211> 27

ES 2 663 230 T3

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

< 223> sitio de unión a heparina de FGF-18

5 <400> 56

Lys Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr
1 5 10 15

Thr Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg
20 25

<210> 57

< 211> 7

< 212> PRT

10 < 213> artificial

<220>

< 223> porción del dominio de unión a heparina de FGF-18

<400> 57

Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg
1 5

15 <210> 58

< 211> 131

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

20 < 223> dominio de PIGf1

<400> 58

ES 2 663 230 T3

Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly
1 5 10 15

Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser
20 25 30

Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro
35 40 45

Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg
50 55 60

Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu
65 70 75 80

Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg
85 90 95

Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys
100 105 110

Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala Val
115 120 125

Pro Arg Arg
130

<210> 59

< 211> 150

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> dominio de PIGF2

<400> 59

Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn Gly Ser
1 5 10 15

Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg Ser Tyr
20 25 30

Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr Pro Ser
35 40 45

ES 2 663 230 T3

Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu Arg Cys
 50 55 60

Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val Glu Thr
 65 70 75 80

Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp Arg Pro
 85 90 95

Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu Cys Arg
 100 105 110

Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Arg Arg Pro Lys Arg Gly
 115 120 125

Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro Thr Asp Cys His Leu Cys Gly
 130 135 140

Asp Ala Val Pro Arg Arg
 145 150

<210> 60

< 211> 30

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> alineamiento de la proteína de fusión GST-PLGF2

<400> 60

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
 1 5 10 15

Pro Thr Asp Cys His Leu Cys Gly Asp Ala Val Pro Arg Arg
 20 25 30

10 <210> 61

< 211> 22

< 212> PRT

< 213> artificial

<220>

15 < 223> Alineamiento de la proteína de fusión GST-PIGF2

<400> 61

ES 2 663 230 T3

Arg Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg
1 5 10 15

Pro Thr Asp Cys His Leu
20

<210> 62

< 211> 18

< 212> PRT

5 < 213> artificial

<220>

< 223> alineamiento de la proteína de fusión GST-PIGF2

<400> 62

Arg Arg Pro Lys Gly Arg Gly Lys Arg Arg Arg Glu Lys Gln Arg Pro
1 5 10 15

Thr Asp

REIVINDICACIONES

1. Un vehículo de aporte biológico que comprende
 5 una fusión molecular de un péptido y un agente biológico que comprende un primer dominio de unión a heparina,
 en donde el péptido comprende un segundo dominio de unión a heparina que comprende un péptido que comprende
 10 una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ
 ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, y subsecuencias de SEQ ID NO: 4 que tienen un truncamiento de no más
 de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4, exhibiendo dicho péptido unión específica a
 fibrinógeno.
2. El vehículo según la reivindicación 1, exhibiendo el péptido unión específica a fibrinógeno, fibronectina,
 vitronectina, tenascina C, osteopontina, fibrina y sulfato de heparano.
- 15 3. El vehículo según la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido tiene una unión específica a fibrinógeno con una
 constante de disociación (KD) de menos de aproximadamente 40 nM.
4. El vehículo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente biológico se elige del grupo que
 20 consiste en una proteína, un fármaco proteínico, un marcador, un inmunoadyuvante, una quimiocina, una citocina y un
 péptido de adhesión celular.
5. El vehículo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la fusión molecular comprende una proteína
 recombinante que comprende el agente biológico y el péptido.
- 25 6. El vehículo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el agente biológico tiene un dominio de unión a
 heparina endógena que proporciona dicho primer dominio de unión a heparina y comprende una citocina elegida del
 grupo que consiste en factores de crecimiento epidérmicos (EGFs), VEGFs, VEGF-A, PDGFs, PDGF-AB, PDGF-BB,
 FGFs, FGF-2, FGF-18, BMPs, BMP-2, BMP-7, TGF- β s, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, NT-3 y BDNF o en donde el
 30 agente biológico comprende una quimiocina elegida del grupo que consiste en CXCL12 y CCL21.
7. El vehículo según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende un inmunoadyuvante o un péptido de
 adhesión celular.
8. Una biomolécula que comprende una citocina que comprende un primer dominio de unión a heparina y un
 35 dominio de PIGF2 que comprende un segundo dominio de unión a heparina que comprende un péptido que
 comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID
 NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, y subsecuencias de SEQ ID NO: 4 que tienen un
 truncamiento de no más de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4.
- 40 9. La biomolécula según la reivindicación 8, en donde el dominio de unión a heparina endógena de la citocina se ha
 retirado o inhabilitado.
10. La biomolécula según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la citocina tiene unión específica a una
 45 molécula de la matriz extracelular seleccionada del grupo de fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, tenascina C,
 osteopontina y fibrina.
11. La biomolécula según la reivindicación 10, en donde la constante de disociación de la unión de la biomolécula
 citocina con fibrinógeno es menos de 50% de una constante de disociación de unión de la citocina no derivada a
 50 fibrinógeno.
12. La biomolécula según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde la citocina se selecciona del grupo que
 consiste en factores de crecimiento epidérmico (EGFs), VEGFs, VEGF-A, PDGFs, PDGF-AB, PDGF-BB, [[los]]
 FGFs, FGF-2, FGF-18, BMPs, BMP-2, BMP-7, TGF- β s, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, NT-3 y BDNF.
- 55 13. La biomolécula según cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde la biomolécula es una proteína de fusión
 o una fusión molecular que comprende además un agente biológico.
14. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID
 60 NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, y subsecuencias de SEQ ID
 NO: 4 que tienen un truncamiento de no más de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4,
 exhibiendo dicho péptido unión específica a fibrinógeno, con la condición de que dicho polipéptido no exista en la
 naturaleza.
15. Un biomaterial que comprende una matriz, comprendiendo la matriz

un péptido que comprende a secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62 y subsecuencias de SEQ ID NO: 4 que tienen un truncamiento de no más de 7 residuos en un extremo N y/o un extremo C de SEQ ID NO: 4, que tiene de 0 a aproximadamente 15% sustituciones conservativas,

- 5 exhibiendo dicho péptido unión específica a la matriz.
16. El biomaterial según la reivindicación 15, que comprende un dominio de matriz extracelular que se une específicamente al péptido.
- 10 17. El biomaterial según la reivindicación 15 o 16, que comprende además una fusión molecular del péptido y un agente biológico.
- 15 18. El biomaterial según la reivindicación 17, en donde el agente biológico comprende una citocina seleccionada del grupo que consiste en factores de crecimiento epidérmico (EGFs), VEGFs, VEGF-A, VEGF-C, PDGFs, PDGF-AB, PDGF-BB, los FGFs, FGF-2, FGF-18, IGFs, IGF-1, BMPs, BMP-2, BMP-7, TGF- β s, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, neurotrofinas, NT-3 y BDNF o una quimiocina elegida del grupo que consiste en interferones, INF- γ , quimiocinas CXCL, CXCL10, CXCL11, CXCL12, quimiocinas CCL y CCL21.
- 20 19. El biomaterial según la reivindicación 17, en donde el agente biológico comprende un inmunoagente o un péptido de adhesión celular.
- 25 20. El biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 14-19, que comprende además una pluralidad de fusiones moleculares, teniendo cada una de la pluralidad de las fusiones un agente biológico distinto fusionado con al menos uno de los péptidos.
- 30 21. Un medicamento que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, la biomolécula según cualquiera de las reivindicaciones 8-13, el polipéptido según la reivindicación 14 o el biomaterial según cualquiera de las reivindicaciones 15-20.
- 35 22. Un medicamento que comprende la biomolécula según cualquiera de las reivindicaciones 8-13.
23. Una vacuna que comprende cualquiera de las realizaciones según las reivindicaciones 1-21.
24. Una matriz o un sistema que comprende cualquiera de las realizaciones según las reivindicaciones 1-23 para aporte de fármacos, vacunación, curación de heridas o curación de huesos.

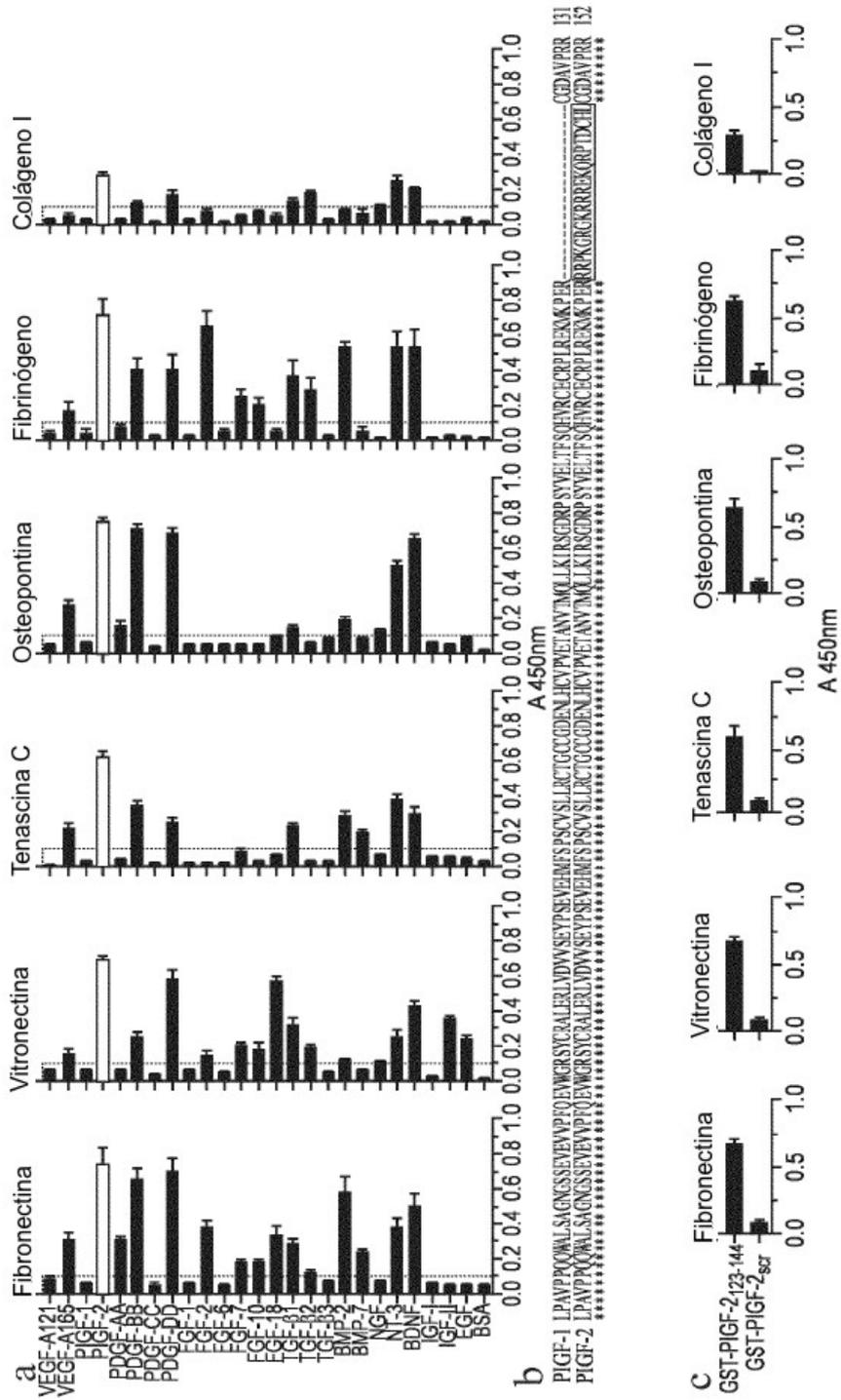


FIG. 1

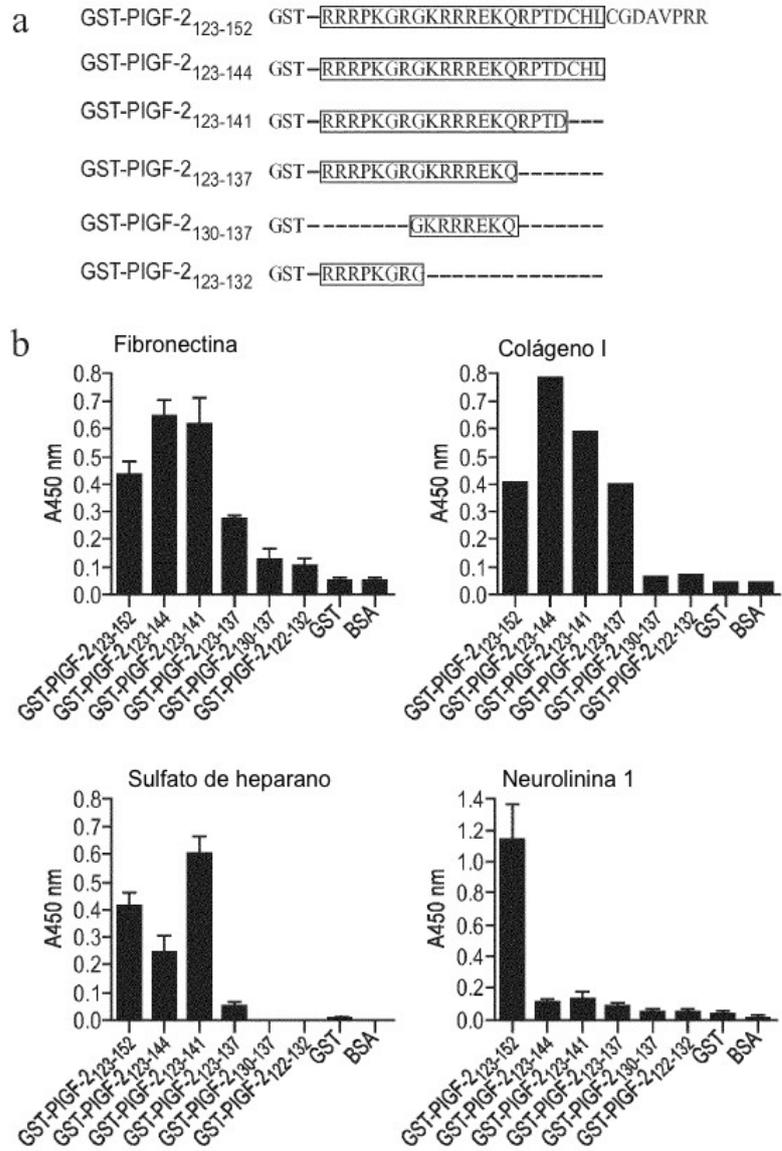


FIG. 2

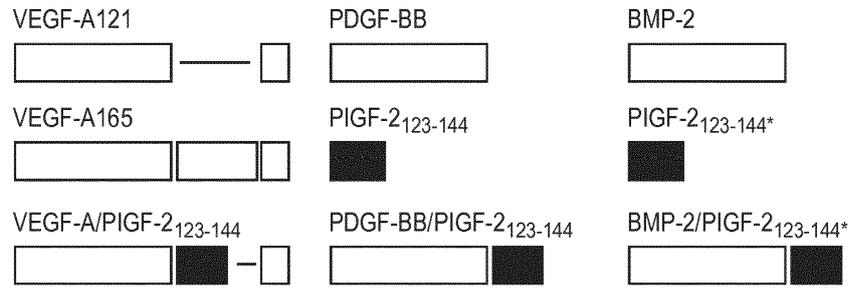


FIG. 3

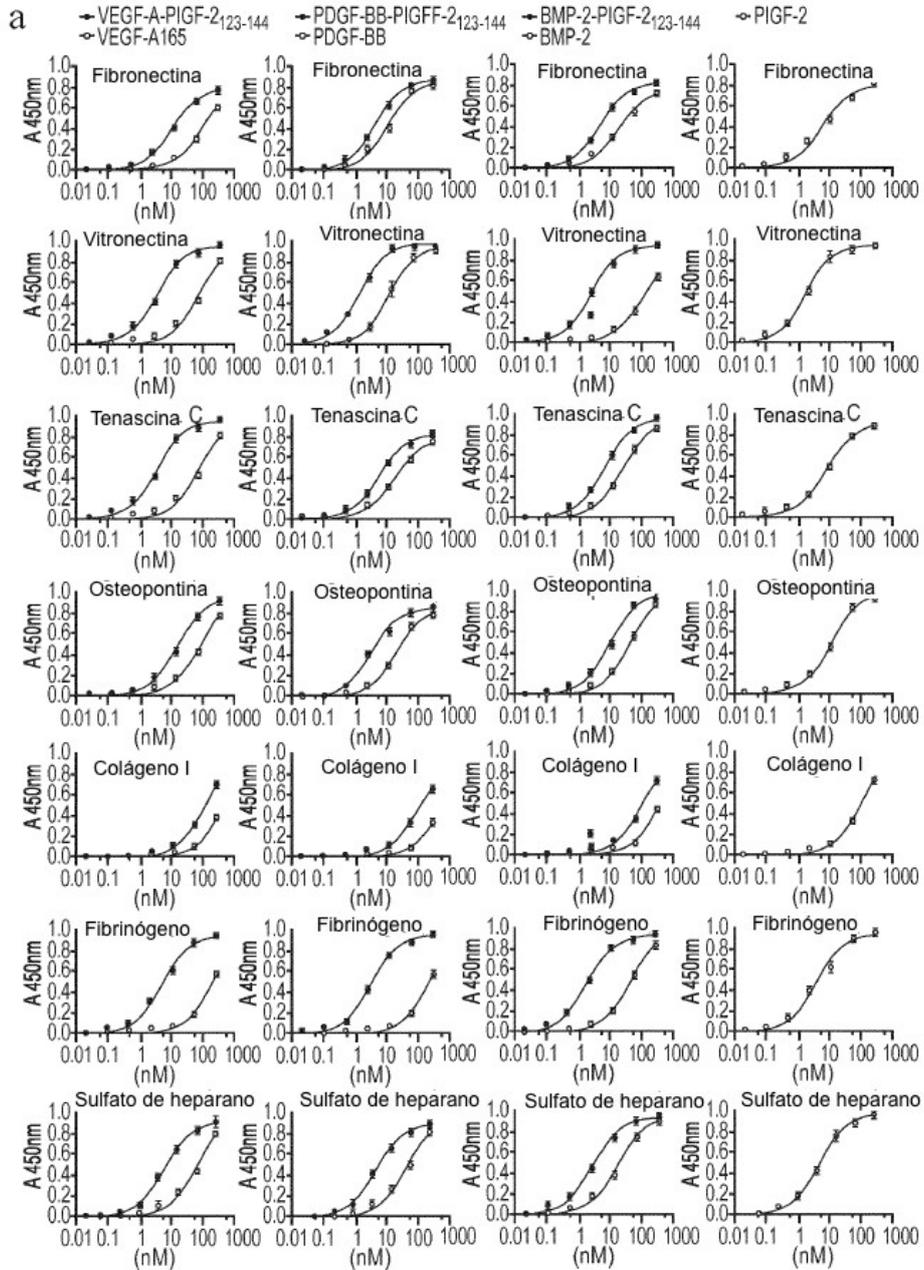


FIG. 4-1

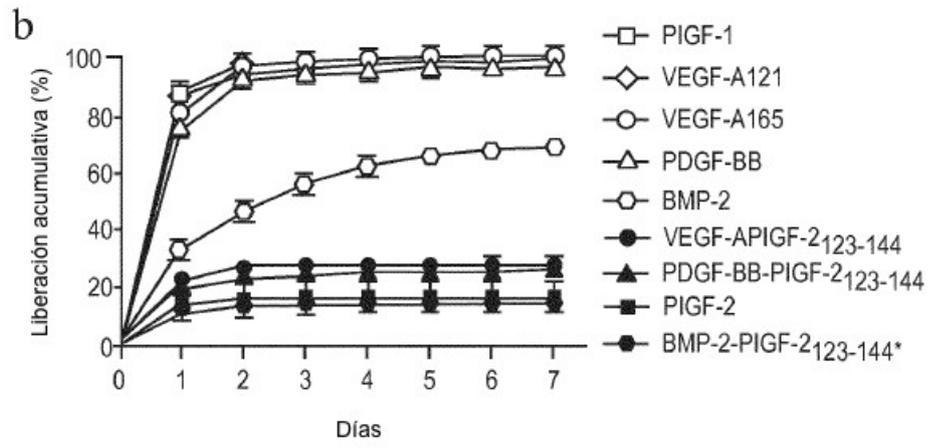


FIG. 4-2

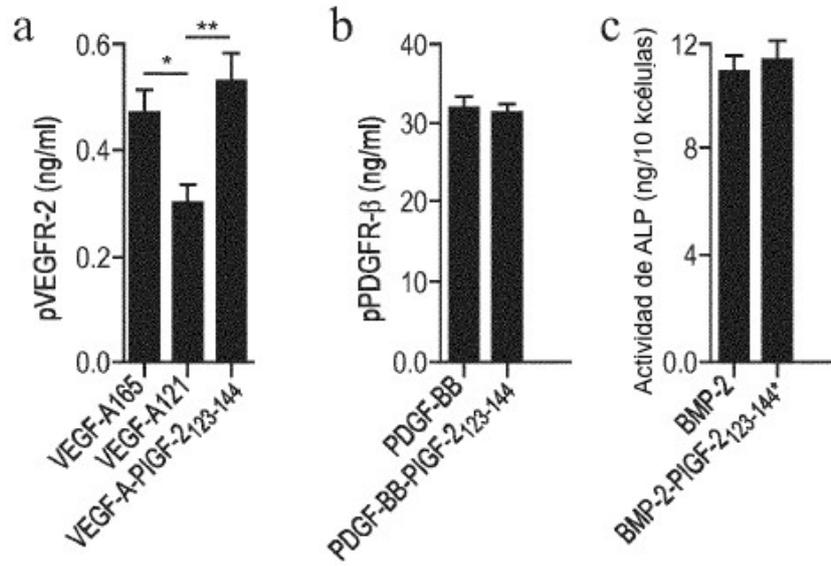


FIG. 5

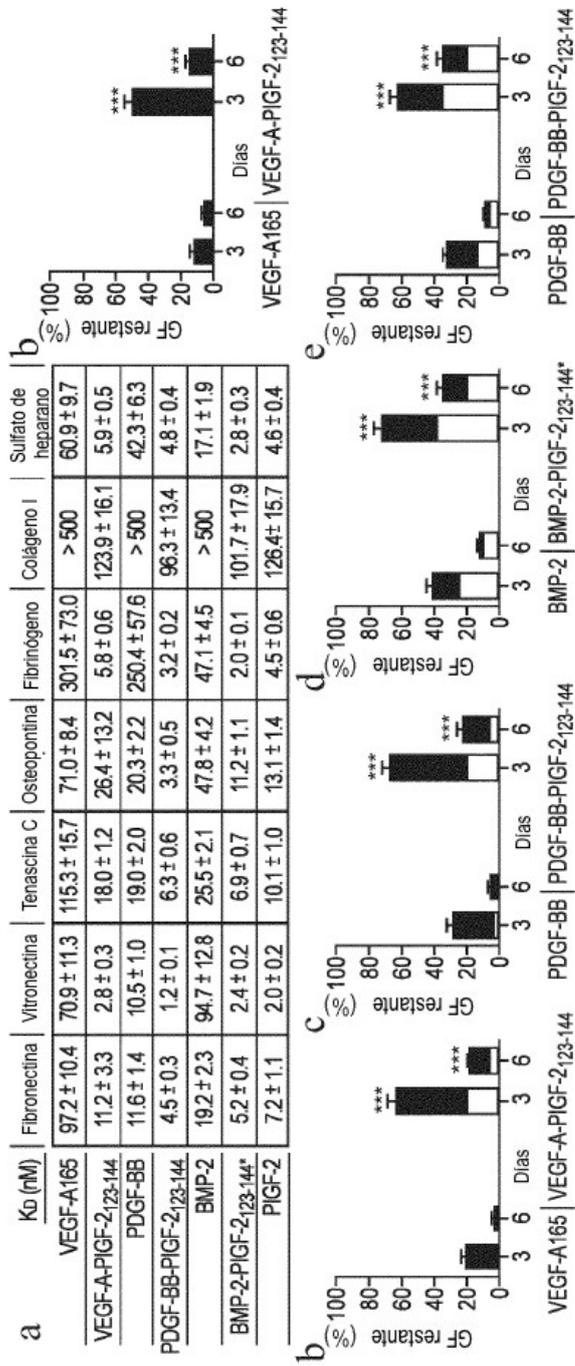


FIG. 6

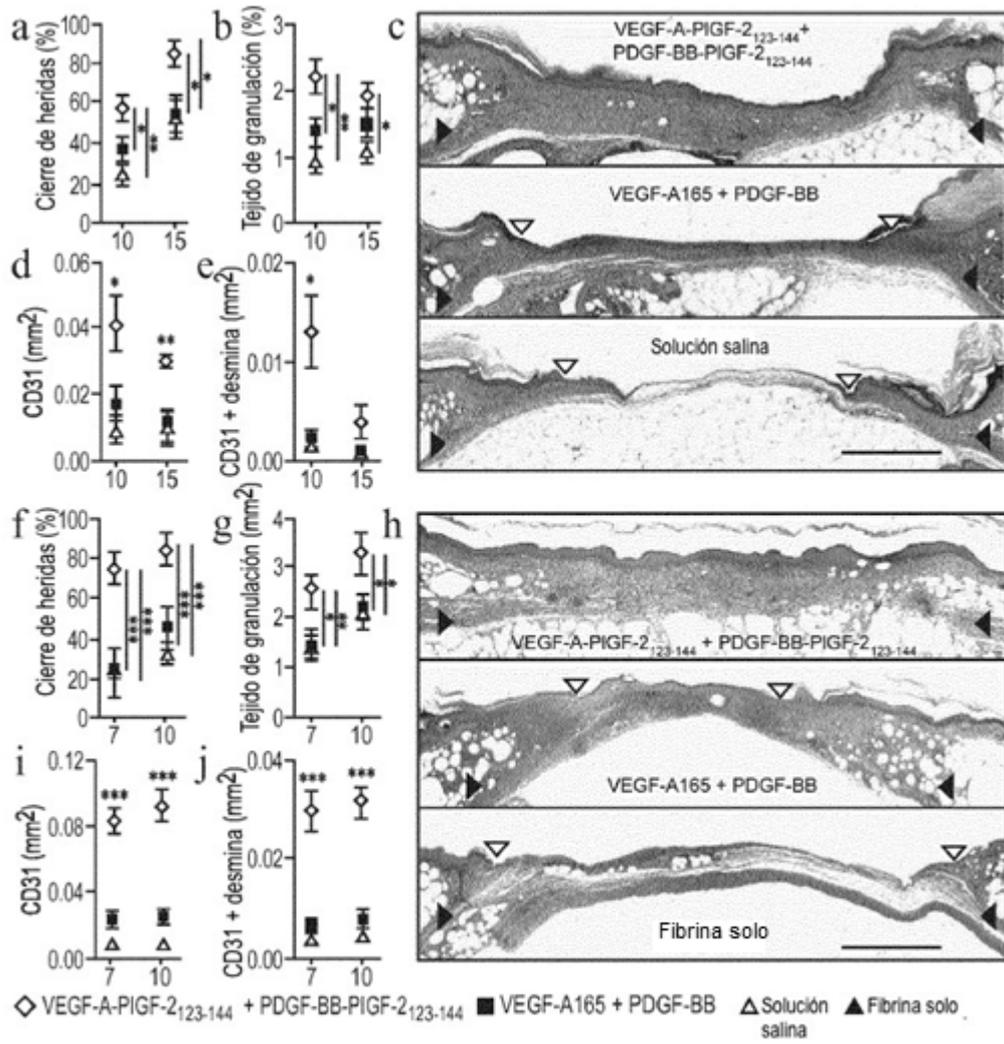


FIG. 7



FIG. 8

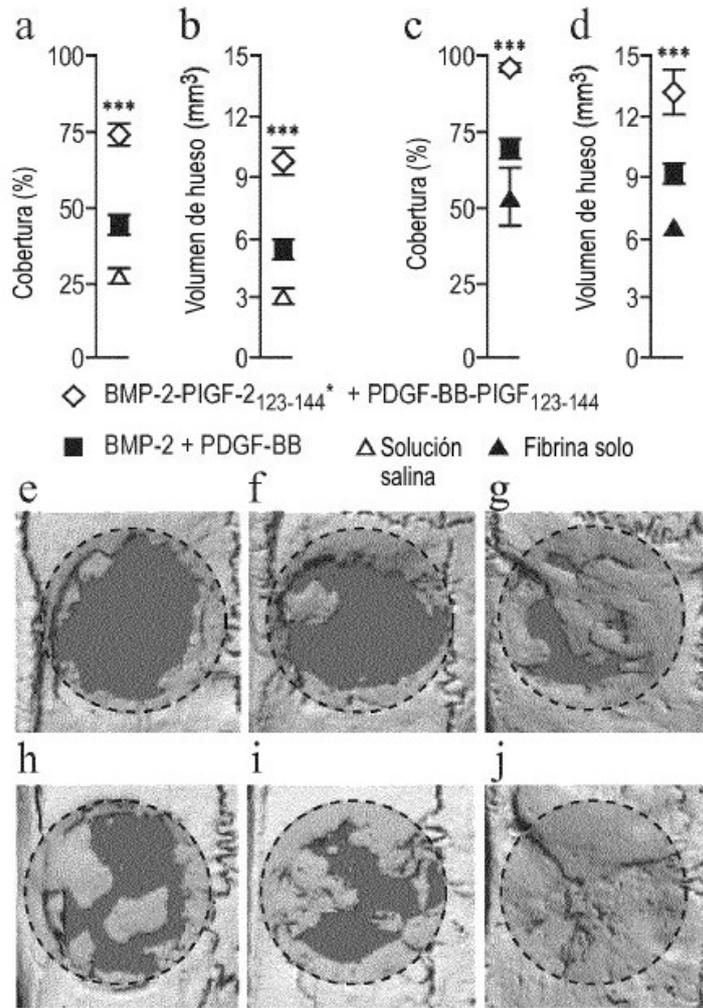


FIG. 9