



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 186 501**

⑫ Número de solicitud: 200002811

⑬ Int. Cl.

**C07K 14/50** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **23.11.2000**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2003**

Fecha de la concesión: **21.04.2006**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2006**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2006**

⑲ Titular/es: **Universidad de Málaga**  
**Plaza de El Ejido, s/n**  
**29071 Málaga, ES**

⑳ Inventor/es: **Andrades Gómez, José Antonio;**  
**Becerra Ratia, José;**  
**Hall, Frederick L. y**  
**Nimni, Marcel E.**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno.**

㉓ Resumen:

Factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno. La presente invención describe el diseño genético y la expresión a gran escala en *Escherichia coli* de un factor de crecimiento fibroblástico básico, con un dominio de unión específico a colágeno, así como su purificación y renaturalización hasta alcanzar su actividad biológica. La principal característica de este factor es la incorporación de un dominio auxiliar aminoácido modificado, de alta afinidad de unión específica al colágeno, que posibilita su almacenamiento por tiempos prolongados y le permite ser dirigido a lugares específicos donde se precise de su actuación, controlando su liberación y preservando su bioestabilidad. Estas propiedades posibilitan el uso del factor como agente terapéutico, con un papel primordial en la cicatrización de heridas y en otros procesos de reparación tisular.

ES 2 186 501 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCION

Factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno.

### Sector de la técnica

La presente invención tiene su aplicación dentro de la industria biomédica dedicada a la fabricación de agentes que intervienen en la reparación de tejidos en general y, más concretamente, en los procesos de cicatrización de heridas.

### Estado de la técnica

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFS) fueron aislados por primera vez en los años 1970 a partir de extractos de cerebro bovino, basándose en su carácter mitogénico y angiogénico. Posteriores estudios establecieron que los FGFs constituyen una familia de veinte proteínas monoméricas estructuralmente relacionadas (peso molecular entre 16000 y 18000), con diversas actividades, y son producidos en algún momento durante el desarrollo de tejidos tales como epitelio, músculo, conectivo y tejido nervioso. Debido a que los FGFs han perdido la secuencia del péptido señal, el cual determina en otros factores de crecimiento su secreción extracelular vía retículo endoplásmico rugoso/aparato de Golgi, se ha sugerido que su liberación fuera de la célula puede darse siguiendo una ruta exocítica independiente (véase Mignatti P. y colaboradores, *J. Cell Biochem.* (1991), **47**: 201-207). Las lesiones por heridas provocan una importante liberación de FGFS, ya que la membrana plasmática de las células dañadas se vuelve permeable a moléculas grandes, permitiendo una difusión libre hacia el espacio extracelular (véase Mutsukrishnan L. y colaboradores, *J. Cell Physiol.* (1991), **148**: 1-16).

Los FGFs pertenecen al grupo de factores de crecimiento con afinidad de unión a la heparina, y es por ello que se encuentran unidos a proteoglicanos heparán sulfato de la membrana basal, donde se almacenan. De tales uniones, los FGFs son liberados por medio de la acción de heparinasas (véase Saskela O. y colaboradores, *J. Cell Biol.* (1990), **110**: 767-775).

Técnicas inmunoquímicas en aorta de rata revelan que un FGF, el FGF básico (bFGF ó FGF-2), se almacena en el citoplasma de células endoteliales y de músculo liso (véase Villaschi S. y colaboradores, *Am. J. Pathol.* (1993), **143**: 181-190). Estudios realizados en heridas de aorta de rata muestran que se produce una liberación de bFGF desde los lugares donde está almacenado. De hecho, los niveles de bFGF en células endoteliales vasculares en cultivo, son los más elevados durante los primeros días, disminuyendo gradualmente hasta llegar a ser indetectables cuando los microvasos dejan de crecer. El tratamiento de los cultivos con anticuerpos anti-bFGF causan el 40 % de la inhibición de la respuesta angiogénica.

Además de los primeros efectos observados sobre replicación celular y angiogénesis, los FGFs regulan la supervivencia, apoptosis, adhesión, motilidad y la diferenciación celular. Estos efectos de los FGFs sobre las funciones celulares dependen del estado bioquímico y del ambiente de sus células diana. Se ha demostrado que el bFGF desempeña un papel importante en los primeros estadios del proceso de reparación tisular (véase

Pierce G.F. y colaboradores, *Am. J. Pathol.* (1992), **140**: 1375-1388) y es un buen mitógeno para condrocitos y osteoblastos, estimulando la proliferación celular dentro del callo de fractura, así como el crecimiento y desarrollo de tejido óseo en el interior de hidroxiapatita sintética (véase Wang J-S. y colaboradores, *J. Orthop. Res.* (1996), **14**: 316-323; y *Clin. Orthop. Rel. Res.* (1996), **333**: 252-260).

La biología del bFGF humano es compleja. Varias isoformas del factor (de 18, 22, 23 y 24 kDa) pueden ser expresadas a partir de un transcrito de ARNm sencillo (véase Florkiewicz R.Z. y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1989), **86**: 3978-3981). Estas isoformas del bFGF aparecen en distintos lugares del núcleo (la de 22, 23 y 24 kDa), del citoplasma o de la superficie celular (la de 18 kDa). La estructura tridimensional del bFGF humano, determinada por cristalografía de rayos-X, sugiere una conformación globular que muestra dominios separados de unión a su receptor y a la heparina (véase Nimni M.E., *Biomaterials* (1997), **18**: 1201-1225).

A pesar de su gran potencia angiogénica y mitogénica, el bFGF se degrada rápidamente cuando se inyecta o es ingerido, llegándose a perder hasta un 99 % de su actividad mitogénica en poco tiempo. La preservación y estabilización del bFGF se consigue cuando se une el factor a esferas de heparina-sefarosa. Ello permite su almacenaje prolongado, repetidas manipulaciones, así como su liberación lenta y controlada (véase Edelman E.R. y colaboradores, *Biomaterials* (1991), **12**: 619-626).

La familia de los FGFs es un gran grupo de citoquinas que ejercen una profunda influencia en la fisiología de la cicatrización de las heridas. Su modo de acción en la cicatrización de las heridas incluye la modulación de poblaciones de células madre, así como de la expresión de genes específicos que codifican para las proteínas de matriz, receptores celulares, proteinasas de matriz e inhibidores de proteasas.

Numerosos estudios en animales han demostrado la eficacia del FGF exógeno en favorecer la cicatrización de las heridas, lo que ha llevado también a su utilización clínica, para ser empleado en las heridas que se producen como consecuencia de la cirugía, para la reparación ósea, así como para el tratamiento de úlceras (pie, gástricas) y quemaduras en pacientes diabéticos. La aplicación sistémica de una dosis de bFGF en el momento de provocar la herida, ha demostrado la capacidad de acelerar la reparación del tejido, sugiriendo que una dosis única puede aumentar la tasa de recuperación de la herida.

Los estudios clínicos realizados hasta ahora, usando el bFGF como agente terapéutico, no han llegado muy lejos debido a la disponibilidad limitada de este factor en las cantidades que se necesitan. Se requieren disponibilidades de grandes cantidades de bFGF de grado farmacéutico, libre de contaminantes de fácil transmisión, omnipresentes en productos extraídos de animales y, en particular, de fuentes humanas. Por lo tanto, es muy deseable desarrollar mecanismos para preparar grandes cantidades de bFGF maduro sintético, donde además se elimina cual-

quier posibilidad de presencia de material contaminante peligroso en el producto final. Finalmente, la proteína biológicamente activa debe ser diseñada para que alcance específicamente los lugares de la herida donde se pretende su cicatrización.

### Explicación de la invención

En la presente invención se ha llevado a cabo el diseño genético y la expresión a gran escala de un bFGF recombinante humano en la bacteria *Escherichia coli*, así como su purificación y renaturalización hasta alcanzar su máxima actividad biológica. La ventaja que presenta dicho factor es que se le ha incorporado un dominio auxiliar aminoacídico modificado, de alta afinidad de unión específica al colágeno, que le confiere propiedades únicas y exclusivas. De esta forma, este factor de crecimiento, llamado rhbFGF-F2, puede ser almacenado por tiempos prolongados y dirigido a lugares específicos donde se precise de su actuación (por ejemplo reparación/cicatrización de heridas), controlando su liberación y preservando su bioestabilidad, acentuando así su potencial como posible agente terapéutico por su papel en la cicatrización de heridas y en otros procesos de reparación tisular.

La presente invención es útil para generar grandes cantidades de hbFGF biológicamente activo a partir de microorganismos procariotas. Este sistema, a diferencia del desarrollado en células eucariotas a partir del ARNm, donde la disponibilidad de material es el factor limitante, ofrece una fuente prácticamente inagotable para la expresión, síntesis y secreción de proteínas, únicamente dependiente del volumen celular (bacteriano) con el que se comience el cultivo. En el transcurso de la tecnología de fabricación del bFGF en sí, hemos desarrollado un método que, especialmente, aumenta el rendimiento en cuanto a la cantidad de proteína nativa purificada obtenida, la fidelidad en el proceso de renaturación proteica, la eficacia y el acortamiento del procedimiento de diálisis, y la consecución de la máxima tasa de actividad biológica.

La presente invención es, asimismo, útil para fabricar hbFGF en las condiciones descritas anteriormente e incorporarle un dominio molecular aminoacídico auxiliar en su estructura primaria (correspondiente al dominio modificado del factor de von Willebrand, de unión específica al colágeno tipo I). Esta modificación persigue hacer llegar la proteína de fusión resultante, rhbFGF-F2, a dianas celulares-tisulares específicas, para que allí ejerza la función deseada.

Dado el reconocido papel que el FGF desempeña en los primeros estadios del proceso de reparación tisular (véase Pierce G.F. y colaboradores, Am. J. Pathol. (1992), 140: 1375-1388), como se ha indicado en reparaciones óseas (véase Wang J-S. y colaboradores, J. Orthop. Res. (1996), 14: 316-323; y Clin. Orthop. Rel. Res. (1996), 333 252-260), y con especial atención a la velocidad de cicatrización de las heridas, la presente invención aporta un rhbFGF-F2 que acelera significativamente la cicatrización de heridas cutáneas de incisión total o parcial. La utilidad de esta patente en este aspecto, se ve reforzada aún más cuando el FGF producido

se aplica ectópicamente mezclado con un gel de colágeno tipo 1, provocando una mayor velocidad de cicatrización de heridas.

Por otra parte, se ha descrito que el bFGF regula la síntesis y depósito de varios componentes de la matriz extracelular (MEC) (véase, por ejemplo, la solicitud de patente ES 2 132 082 T3), y es sabido que en individuos diabéticos el proceso de cicatrización de heridas se encuentra reprimido, primero, en su estadio de reacción inflamatoria y, segundo, en un estadio posterior de remodelación de la MEC (véase Gospodarowicz D. y colaboradores, Endocr. Rev. (1987), 8: 95-114). En este sentido, la presente invención presenta una utilidad clínica en cuanto a que desarrolla un rhbFGF-F2 que, combinado con un gel de colágeno tipo I y aplicado ectópicamente sobre heridas totales o parciales, reduce el tiempo de cicatrización en animales diabéticos hasta llevarlo a términos comparables a los animales normales.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es la representación del diseño de (A) vector de clonación TA y vector de expresión pET28b; (B) las proteínas de fusión: rhbFGF-F2, que incorpora la secuencia aminoacídica WREP-SFMALS del factor de von Willebrand (vWF), y rhbFGF-F1 que carece de dicha secuencia.

La Figura 2 es el gel SDS de expresión y purificación de las proteínas de fusión. La calle 1 indica el peso molecular del marcador. Las calles 2 y 5 muestran las proteínas rhbFGF-F1 y -F2 respectivamente, antes de la inducción. Las calles 3 y 6 corresponden a las proteínas rhbFGF-F1 y -F2 respectivamente, tras la inducción. Las calles 4 y 7 muestran las proteínas en estado puro. El ligero retraso de la banda en la calle 7 respecto a la banda de la calle 4 corresponde al mayor peso molecular del rhbFGF-F2, introducido por la secuencia aminoacídica correspondiente al factor de von Willebrand.

La Figura 3 muestra (A) un gel de SDS indicando las diferentes condiciones de óxido-reducción ensayadas en la renaturación de la proteína, y la que ofrece mayor rendimiento en cuanto a obtención de proteína, y (B) muestra cómo dicha condición de redox es la que mayor actividad biológica ofrece a cada proteína.

La Figura 4 representa la actividad biológica, en términos de proliferación celular, de la rhbFGF-F2 bajo las diferentes condiciones de diálisis ensayadas. El tampón A con 250 mM de NaCl y 20 % de sacarosa favorece la máxima actividad biológica de la proteína.

La Figura 5 muestra como la actividad biológica, en términos de proliferación celular, de la rhbFGF-F1 (círculo abierto) y de la rhbFGF-F2 (círculo cerrado), obtenidas bajo la condición de diálisis óptima, es comparable a la actividad biológica de la proteína comercial (triángulo).

La Figura 6 representa la fuerza de unión de las proteínas de fusión al colágeno tipo I. Mientras que el <sup>3</sup>H-colágeno unido al rhbFGF-F1 es eluido por completo y rápidamente, el <sup>3</sup>H-colágeno unido al rhbFGF-F2 requiere un fuerte gradiente de urea para ser eluido.

La Figura 7 muestra (A) una cinética de unión dosis-dependiente del <sup>3</sup>H-rhbFGF-F1 y <sup>3</sup>H-rhb-

FGF-F2 al colágeno tipo 1, tras la digestión del colágeno con 0.5 ml de collagenasa (100 U/ml). La afinidad de unión al colágeno que muestra el rhbFGF-F1 obedece a interacciones no específicas. En (B) se observa que ambas proteínas de fusión siguen manteniendo su actividad biológica, en términos de proliferación celular, tras se liberadas del colágeno tipo I.

La Figura 8 es un gráfico de barras correspondiente a los resultados del examen macroscópico en la velocidad de cicatrización de las heridas, tanto en ratas normales como afectadas de diabetes. El tratamiento ectópico de las heridas se indica en cada caso.

#### Descripción detallada de la invención

El procedimiento seguido en la presente invención para la preparación del factor de crecimiento fibroblástico básico, con un dominio de unión específico a colágeno, objeto de la presente invención y la evaluación de su aplicabilidad, consta básicamente de las siguientes etapas:

- Construcción genética del bFGF.
- Expresión proteica de los FGFs.
- Solubilización y purificación de los FGFs.
- Renaturación de los FGFs.
- Actividad biológica de las formas proteicas soluble y unida a colágeno.
- Análisis de la unión específica a colágeno del rhbFGF-F2.
- Aplicabilidad en la cicatrización de heridas.

A continuación se detallan, como una forma de realización preferida de la invención, los métodos y procedimientos seguidos en estas etapas básicas, así como los resultados obtenidos y las conclusiones más relevantes que se derivan de los mismos.

#### Métodos y procedimientos

##### Construcción genética del bFGF

Se obtuvo ARN citoplásmico (ARNc) de células endoteliales umbilicales humanas, y fue transcrito a una cadena sencilla de ADN citoplásmico (ADNc) usando *primers* antisentido correspondientes a la región que codifica para el bFGF. Realizamos amplificación por PCR sobre el ADNc y los productos resultantes se separaron por electroforesis en agarosa. Las bandas que se obtuvieron se purificaron del gel de agarosa mediante el kit Geneclean (Bio 101) y se introdujeron en un vector siguiendo la estrategia de clonación TA (Invitrogen). Los clones seleccionados por el color fueron aislados y analizados mediante mapeo de restricción, seguido de una determinación de la secuencia nucleotídica. Concretamente, el primer que utilizamos para la construcción del bFGF, la proteína de fusión a la que incorporamos el dominio de unión de alta afinidad al colágeno, fue uno de 50 nucleótidos de secuencia 5' -CAT ATG TGG CGC GAA CCG AGC TTC ATG GCT CTG AGC GGT GCT AGC ATG GCA G-3', diseñado para incluir dos partes: 7 nucleótidos correspondientes a la secuencia del bFGF unida a 30

nucleótidos que codifican para un péptido modificado con capacidad de unión al colágeno (véase Tuan T.L. y colaboradores, Connect. Tissue Res. (1996), 34: 1-9). La construcción resultante se introduce en el vector de expresión pET28b (Novagen), el cual posee una secuencia histidínica de purificación en su terminal amino.

Además de la construcción que incorpora el dominio de unión específica a colágeno, pET-hbFGF-F2, hemos desarrollado también la que no incluye dicho dominio (secuencia "standard"), pET-hbFGF-F1, a fin de que pueda servir en todo momento como control del protocolo de diseño, expresión, purificación y comprobación de actividad biológica del factor de fusión. Ambas construcciones, F1 y F2, se mantuvieron en una cepa de *Escherichia coli* marcada con azul XL (Figura 1). La orientación y lectura de la secuencia de cada *insert* se confirmó mediante análisis de secuenciación nucleotídica manual de ADN, por el método de terminación de cadena dideóxida modificado (USB).

##### Expresión proteica de los FGFs

Para la expresión de las proteínas recombinantes, las construcciones pET-hbFGF-F1 y pET-hbFGF-F2 fueron transformadas en la cadena BL21(DE3) de *E. coli*. Se inoculó un clon sencillo en cultivo primario que se diluyó para obtener un volumen final de 500 ml con medio 2YT, el cual contenía kanamicina (100 µg/ml). Tras 2-3 horas de crecimiento del cultivo y alcanzado un nivel de crecimiento adecuado (densidad óptica A600 de 0.7 a 1.0), las proteínas fueron inducidas en presencia de 1mM de IPTG durante 5 horas a 37°C. Los decantados bacterianos se obtuvieron por centrifugación a 5000 g durante 10 minutos, se lavaron con tampón A (20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 0.05% NP-40, pH 8.0) y se lisaron con 0.4 mg/ml de lisozina, 5 ng/ml de ADNasa, 0.8 mM PMSF y 10 mM de β-mercaptoetanol en 1/10 del volumen original de la suspensión celular. La lisis se facilitó realizando sonicación y homogeneización con un Brinkmann Polytron a 25K durante 2 ciclos de 30 segundos cada uno, seguido por una centrifugación a 10000 g durante 20 minutos a 4°C, para obtener por decantación los cuerpos de inclusión bacterianos.

Por electroforesis en gel SDS-PAGE (Figura 2) se determinó que, en presencia de 1 mM de IPTG, los niveles de expresión de rhbFGFs alcanzaron el 50 % de la proteína total celular.

##### Solubilización y purificación de los FGFs

Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en 6 M de guanidina-HCl, 0.1 M tampón fosfato, pH 8.0, a temperatura ambiente en 1/10 del volumen original de células, dejándolo decantar a temperatura ambiente durante 1.5 horas con esporádicas agitaciones. Las proteínas de fusión solubilizadas se separaron de las impurezas insolubles por centrifugación a 20000 g.

La purificación de la proteína de fusión solubilizada se llevó a cabo por cromatografía de Ni-NTA (Qiagen): tras cargar la columna con el solubilizado y dejar reposar las bolitas de sefarosa durante 30 minutos, se realizaron lavados de la columna con 2 volúmenes de urea 8 M en tampón A, pH 8.0, seguido por 2 volúmenes de urea 8 M en tampón A, pH 6.5. Las proteínas recombinantes

(F1 y F2) se eluyeron con 8 M de urea en tampón A, pH 4.0. La concentración proteica se determinó por el método de Bradford (BioRad) utilizando un estándar de albúmina bovina (BSA).

#### *Renaturación de los FGFs*

Tras la purificación de las proteínas por cromatografía de afinidad, las muestras se diluyeron para obtener una concentración de 0.20 mg/ml en 8 M de urea, pH 8.0. El tampón de óxido-reducción A con 2 mM de glutathion reducido (GSH), 0.2 mM de glutathion oxidado (GSSG) y 1 mM de DTT se utilizó para la renaturación. Se enfrió en hielo durante 30 minutos y se fue añadiendo lentamente a las proteínas de fusión purificadas hasta diluir la urea a 1.3 M (factor de dilución 6X) y comenzar la renaturación oxidativa. Tras agitar con intensidad, se dejaron reposar las proteínas de fusión a 4°C durante toda la noche para permitirles alcanzar sus estructuras termodinámicamente estables. Las muestras se mantuvieron dializando toda la noche en tampón S (250 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20 % sacarosa, pH 8.0). Se realizó una centrifugación a 10000 g durante 20 minutos a 4°C, se midió la densidad óptica para calcular la concentración final de proteína, se liofilizaron los preparados y reconstituyeron en 0.1 % de BSA/4 mM HCl antes de congelar.

#### *Actividad biológica de las formas proteicas soluble y unida a colágeno*

La actividad biológica de las formas solubles F1 y F2 se determinó en células endoteliales de vena humana (HVEC) a través de una serie de ensayos de proliferación. Las HVEC se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco Eagles (DMEM) (GIBCO) suplementado con 1 % de penicilina/estreptomomicina y 10 % de suero fetal bovino (FBS) (GIBCO), a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez alcanzada la confluencia del cultivo en monocapa, las células fueron tripsinizadas y luego sembradas en placas de 24 pocillos (Costar) a una densidad de 5x10<sup>3</sup> células/pocillo. Una vez que las células alcanzaron el 50-60 % de confluencia, el DMEM fue sustituido por DMEM al 0.5 % de FBS y las células cultivadas durante 24 horas en estas condiciones de ayuno. Diluciones seriadas de las proteínas de fusión rhbFGF recién renaturadas se fueron añadiendo a los pocillos e incubadas durante 16 horas, seguidas de la adición de timidina tritiada (<sup>3</sup>H-timidina) (1 μCi/pocillo, con actividad específica de 2 Ci/milimol, 74 GBq/milimol) (ICN) y una incubación adicional de 4 horas. El rhbFGF comercial (R&D Systems) fue utilizado como control estándar. Tras la incubación, las células fueron lavadas tres veces con tampón fosfato salino (PBS), y lisadas con 150 μl/pocillo de tampón de lisis (Solvable, ICN) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los extractos celulares resultantes correspondientes a ADN fueron analizados en un equipo de centelleo (Beckman 2000).

Para el caso concreto del rhbFGF-F2 se realizó una segunda medición de actividad biológica. Se tomaron 500 μl de colágeno tipo I (3.0 mg/ml, pH 7.0) procedente de una extracción con pepsina realizada en tendón bovino (véase Nimni, M.E., Biorheology (1980), 17:51-82), se dejó secar

hasta que las moléculas de colágeno se agregaron en fibras sobre la base de cada pocillo de una placa de cultivo de 24 y luego se cubrió con 0.2 % de BSA. Las fracciones renaturadas de rhbFGF-F2 en PBS se añadieron a los pocillos recubiertos de colágeno, se incubaron a 37°C durante 2 horas y luego se lavaron los pocillos tres veces con DMEM. Las HVEC (1.5x10<sup>3</sup> por pocillo en 0.5 % FBS/DMEM) se sembraron e incubaron durante 20 horas a 37°C antes de la adición de <sup>3</sup>H-timidina para determinar la síntesis de ADN como medida de proliferación (según se ha descrito anteriormente).

#### *Análisis de la unión específica a colágeno del rhbFGF-F2*

Se utilizaron dos procedimientos diferentes para comprobar la afinidad de la proteína de fusión rhbFGF-F2 al colágeno. En el primer método, la proteína de fusión recombinante fue primeramente inmovilizada en una columna de Ni-NTA para luego hacer pasar colágeno tipo I (biosintéticamente marcado con <sup>3</sup>H-prolina) a través de la columna, y posteriormente eluido con un gradiente de concentración lineal de tampón fosfato (de 0.15 a 2 M) o urea (de 0 a 4 M).

En el segundo método, los cuerpos de inclusión conteniendo las construcciones del rhbFGF-F1 y rhbFGF-F2 fueron aislados por centrifugación y marcados radioactivamente por un método desarrollado en nuestro laboratorio (véase Cheung D.T. y colaboradores, Anal. Biochem. (1981), 116: 69-74). Brevemente, los cuerpos de inclusión fueron deshidratados con DMF (Sigma) en tubos de ensayo de vidrio, a los que a continuación se añadía 0.5 ml de solución <sup>3</sup>H-NaBH<sub>4</sub> (100 mCi, Amersham)/DMF. Esta suspensión se agita inmediatamente y se deja reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Los decantados se lavan tres veces con DMF y luego PBS. Tras realizar la purificación y renaturación de las proteínas de fusión como se ha descrito anteriormente, se determina la bioactividad. En placas de cultivo de 24 pocillos, se incuban 200 μl de colágeno tipo I (3.0 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C hasta formar una estructura fibrilar. A continuación se añaden 20 μl de <sup>3</sup>H-rhbFGF-F1 y <sup>3</sup>H-rhbFGF-F2 en diluciones seriadas sobre los geles de colágeno fibrilar dejando reposar durante 1 hora a 37°C. Los geles se lavan con 2.0 ml de PBS tres veces, 30 minutos cada una. Se añade 0.5 ml de colagenasa A (100 U/ml, Boehringer Mannheim) y se incuba durante 1 hora a 37°C. Se toman 20 μl de la solución resultante y se mide en el contador de centelleo.

#### *Aplicabilidad en la cicatrización de heridas*

Para determinar la aplicabilidad del rhbFGF-F1 y la posible mejora introducida por el rhbFGF-F2 en la cicatrización de heridas, se han usado 24 ratas Wistar macho, de un peso entre 300 y 350 gramos. Como es conocido, los animales diabéticos suponen un excelente modelo experimental para el estudio de procesos de cicatrización de heridas, puesto que en estos animales dicho proceso se encuentra retrasado e incluso impedido en algunos casos. Por ello, utilizamos 12 ratas diabéticas inducidas en nuestro laboratorio por inyección intramuscular de 45 mg/kg

de estreptozotocina (Sigma). Esta dosis resulta en un 100 % de hiperglucemia y 0 % de mortalidad. A los animales se les midió el contenido de glucosa en sangre diariamente y se consideró que hablan desarrollado la diabetes cuando, durante tres días consecutivos, presentaron 350 mg/dl o más de glucosa en suero.

Bajo anestesia con pentobarbital sódico, a los animales se les afeitó el dorso, se esterilizó la piel con etanol al 70 %, y se les practicaron ocho heridas de 5 mm<sup>2</sup> cada una con profundidad hasta el panículo carnoso. Cada herida estaba separada de la otra por al menos 1.5 cm. Dos heridas por animal (normal y diabético) fueron tratadas con solución salina (0.05 M acetato sódico, 0.001 M EDTA, 0.001 M CaCl<sub>2</sub>, 0.09 M NaCl, pH 6.0), 100 µl (1 µg/µl) de hbFGF comercial (Chemicon International), o la misma dosis de rhbFGF-F1 o rhbFGF-F2. Los factores de crecimiento y su diluyente salino también fueron aplicados a las heridas mezclados en un gel de colágeno tipo I procedente de tendón de cola de rata (Collaborative Research). El colágeno es disuelto en ácido acético 0.1 M, el pH neutralizado a 7.2, y la solución resultante mezclada con DMEM para obtener una concentración final de 0.35 mg/ml. La mezcla de los bFGFs o del diluyente salino y la solución de colágeno tipo I se incuban a 37°C durante 15 minutos para conseguir una fina matriz de gel de colágeno. Se efectúan aplicaciones diarias bajo anestesia durante tres días, para luego realizar un seguimiento macroscópico de la cicatrización. Otros animales son sacrificados por medio de una dosis de 75 mg/kg de Nembutal a los 10 o 21 días desde la realización de las heridas. Se toman piezas de la piel sometida a tratamiento y se procesan histológicamente, se tiñen con hematoxilina-eosina, e inmunocitoquímicamente con anticuerpos anti-colágeno tipo IV, anti-fibronectina y anti-laminina desarrollados en conejo (Chemicon International), a fin de determinar la evolución del proceso de cicatrización.

#### Resultados

##### *Construcción recombinante de las proteínas de fusión hbFGF-F1 y -F2*

Según se muestra en la Figura 1, por técnicas de RT-PCR y tecnología de ADN recombinante, hemos desarrollado dos proteínas de fusión hbFGF. Una de ellas incorpora un dominio molecular de alta afinidad de unión al colágeno tipo I. Se trata de la incorporación a la proteína de un decapeptido procedente del factor von Willebrand (vWF), responsable del reconocimiento de secuencias colagénicas en los vasos sanguíneos, y al que se le ha sustituido la cisteína original por una metionina, con el objeto de facilitar el proceso de renaturación. De esta forma, el decapeptido incorporado es el correspondiente a la secuencia WREPSFMALS, y la proteína de fusión resultante, rhbFGF-F2, desarrolla una capacidad especial de unirse específicamente al colágeno tipo I.

##### *Expresión, solubilización y purificación de las proteínas de fusión*

Las proteínas de fusión rhbFGFs han sido expresadas a altos niveles en bacterias transformadas (la cepa BL21-DE3) que portan el sistema

T7 polimerasa. En presencia de 1 mM de IPTG, los niveles de expresión de rhbFGFs alcanzaron el 50 % de la proteína total celular, como se determinó por electroforesis en gel SDS-PAGE (Figura 2). Las proteínas fueron aisladas de los cuerpos de inclusión recolectados tras una lisis celular bacteriana. Para prevenir la co-sedimentación de las células y restos celulares, la lisis inicial fue mejorada con la combinación de un tratamiento enzimático con lisozima (0.4 mg/ml), homogeneización y sonicación. Debido a que las proteínas con origen en cuerpos de inclusión contienen cantidades variables de uniones intercatenarias tipo disulfito, se añadió 10 mM de β-mercaptoetanol al tampón de lisis a fin de romper tales uniones.

A pesar de que denatürantes fuertes tales como guanidina-HCl 6 M y urea 8 M son bastante efectivos en la solubilización de proteínas del tipo de las FGFs procedentes de cuerpos de inclusión, la guanidina 6 M fue la que mostró un mejor rendimiento. Tras la solubilización y antes de la renaturación, se abordó el proceso de purificación, con idea de eliminar primero otros tipos de proteínas solubles que pudieran llegar a ofrecer interacciones indeseables con las bFGFs, así como evitar degradaciones por el contacto con proteínas solubles renaturadas presentes en la misma mezcla. La purificación de rhbFGF-F1 y -F2 se llevó a cabo por cromatografía Ni-NTA realizada bajo condiciones denatürantes en presencia de guanidina 6 M. Para preparar las proteínas para los siguientes pasos de renaturación, las muestras unidas a la columna fueron lavadas con urea 8 M, pH 8.0, seguido de un lavado más intenso con urea 8 M, pH 6.5, seguido por una elución final de las proteínas purificadas con urea 8 M a pH 4.0. Aproximadamente, el rendimiento fue de 6 mg de rhbFGF-F1 y 8 mg de rhbFGF-F2 purificadas, a partir de 100 ml de cultivo bacteriano.

##### *Renaturación de las proteínas de fusión rhbFGF*

Puesto que el control de las condiciones de óxido-reducción es un factor clave en la correcta renaturación de proteínas de fusión, nosotros hemos probado varias concentraciones de GSH y GSSG a fin de incrementar la tasa y rendimiento de F1 y F2 correctamente renaturadas. Como se muestra en las Figuras 3A y 3B respectivamente, un sistema redox compuesto por 2.0 mM/0.2 mM de GSH/GSSG proporciona el máximo rendimiento de ambas proteínas, así como la máxima actividad biológica relativa específica, cuando se midió proliferación utilizando cultivos de HVEC.

##### *Concentración de las proteínas de fusión rhbFGF*

Asociado con la propia cinética y termodinámica de la renaturación de monómeros proteicos, la formación de agregados (provenientes de interacciones entre precursores proteicos a medio camino de la renaturación) compite extraordinariamente con la renaturación de proteínas del tipo de bFGF. En consecuencia, y puesto que la agregación conlleva una disminución en la concentración de proteína resultante, en cada ensayo de renaturación establecimos un límite de concentración, que fue de 20 gg/ml para rhbFGF-F1 y algo más bajo, 18 gg/ml, para rhbFGF-F2, debido al aumento de interacciones hidrofóbicas asociado a la

secuencia decapeptídica de vWF.

Aunque la eliminación de los agentes solubilizantes y los componentes del proceso de renaturación se eliminan por simple diálisis, parámetros tales como el tampón de diálisis, el pH, las fuerzas iónicas y agentes estabilizantes de la estructura proteica, son de especial importancia para prevenir la precipitación de la proteína recién renaturada. El mayor rendimiento en términos de proteína soluble activa tras la diálisis se obtuvo con el tampón A suplementado con 20% de sacarosa a pH 8.0. A pH 6.5 se producía precipitación y a pH 11.0, aunque no ocurría precipitación alguna, se perdía totalmente la actividad biológica específica. El resultado en cuanto a valores de actividad biológica específica varió según las diferentes condiciones de diálisis que ensayamos, como muestra la Figura 4 para la proteína rhbFGF-F2. En ningún caso se añadieron solventes orgánicos al tampón de diálisis para prevenir la agregación, lo que habla en favor de la idoneidad de las mezclas de diálisis ensayadas.

Una vez se determinó la concentración proteica final, las proteínas rhbFGF-F1 y rhbFGF-F2 se liofilizaron. La reconstitución del liofilizado proteico para su posterior uso se hizo con una solución 4 mM HCl y 0.1% de BSA. Sin embargo, en estas condiciones detectamos una pérdida de actividad biológica de dos unidades respecto a las muestras recién dializadas. El problema se soluciona cuando las muestras dializadas simplemente se congelan a -20°C.

#### *Actividad biológica de las proteínas de fusión*

La actividad biológica de las proteínas de fusión rhbFGF-F1 y rhbFGF-F2 se comprobó en un ensayo *in vitro* de proliferación utilizando cultivos celulares de HVEC, donde el rhbFGF comercial sirvió como control positivo. Como muestra la Figura 5, a cultivos celulares privados de suero durante 24 horas, se añadieron fracciones proteicas dializadas desde 5 a 30 µ/ml, en concentraciones comprendidas entre 50 y 200 pg/ml durante 16 horas, tras las cuales se obtuvieron actividades proliferativas comparables a las conseguidas con el factor de crecimiento comercial.

#### *Capacidad de unión de rhbFGF-F2 al colágeno tipo I*

La comprobación de la afinidad de la proteína de fusión rhbFGF-F2 al colágeno tipo I se abordó por medio de dos estrategias. En primer lugar, se cargaron 100 ng de la proteína recién dializada en una columna de Sephadex G15 recubierta de colágeno. En principio, toda la proteína cargada quedó unida a la columna, según un análisis proteico inmediato realizado al eluyente. Los intentos de eluir la proteína de la columna utilizando un gradiente de NaCl o urea 2 M, soluciones usualmente empleadas en la elución de proteínas en estas condiciones, fueron inútiles, sugiriendo que la rhbFGF-F2 se había unido fuertemente a la columna.

En una segunda estrategia, la rhbFGF-F2 se cargó en una columna Ni-NTA, para posteriormente hacer pasar una solución de <sup>3</sup>H-colágeno tipo I. La mayor parte del colágeno radioactivo cargado quedó retenido en la columna, según un análisis proteico inmediato realizado al eluyente. La columna se lavó con un gradiente li-

neal de NaCl desde 0.15 a 2 M, sin conseguir ninguna elución de colágeno radioactivo, lo que daba muestra de la fuerte unión al rhbFGF-F2. Como se muestra en la Figura 6, sólo la aplicación de un gradiente lineal de urea desde 0 a 4 M fue capaz de eluir todo el <sup>3</sup>H-colágeno. En cambio, cuando el proceso se repite con la rhbFGF-F1 (carece del dominio aminoacídico vWF), que, en este caso, sirvió también como control positivo de la técnica, sólo trazas de <sup>3</sup>H-colágeno fue retenido por la columna. Estos resultados demostraron que el dominio aminoacídico de unión específico a colágeno tipo I es el responsable de la alta interacción específica desarrollada por el rhbFGF-F2 al colágeno.

La conclusión de estos estudios nos permitieron, además, demostrar dos hechos fundamentales: i) que la unión del rhbFGF-F2 al colágeno tipo I era dosis dependiente, siendo la unión del rhbFGF-F1 de muy baja afinidad y motivada por interacciones no específicas, como se muestra en la Figura 7A; y ii) que cuando el rhbFGF-F2 se libera del colágeno tipo I mediante digestión enzimática con collagenasa, la proteína de fusión mantiene su actividad biológica completa, como se muestra en la Figura 7B.

Este conjunto de experimentos demuestra que el dominio molecular de unión específica al colágeno tipo I incorporado a la proteína rhbFGF-F2, provoca que la proteína de fusión sea secuestrada por la matriz de colágeno, y que la digestión colagénica específica de la misma libere la rhbFGF-F2 con su actividad biológica intacta.

#### *Efecto de la aplicación de las proteínas de fusión a la cicatrización de heridas*

Hemos ensayado las dos proteínas de fusión obtenidas en la tasa de cicatrización de heridas cutáneas en ratas normales y diabéticas. Como se muestra en la Figura 8, las heridas de animales normales, tratadas ectópicamente sólo con el vehículo de disolución del factor (solución salina), en aplicaciones de una al día durante tres días, comenzando el mismo día de la lesión, cicatrizaron a los 12 días. En los animales diabéticos, la cicatrización completa tuvo un retraso de 7 días respecto a las ratas normales, lo que indicaba que la diabetes afecta negativamente al proceso de cicatrización (p<0.001). Cuando las heridas se trataron con 1 µg de hbFGF comercial, la tasa de cicatrización se aceleró significativamente en 3 días, tanto en animales normales como diabéticos. Cuando las heridas fueron tratadas con 1 µg de la proteína de fusión con afinidad de unión por el colágeno 1, rhbFGF-F2, el proceso de cicatrización se redujo en 2 días en ratas normales y en 1 día en ratas diabéticas, cuando se compara con el tratamiento con el hbFGF comercial. Muy significativo fue el resultado obtenido cuando las heridas fueron tratadas con 1 µg de rhbFGF-F2 mezclado con colágeno I. En estas condiciones se redujo aún más el proceso de cicatrización, especialmente en ratas diabéticas (2 días comparado con el rhbFGF-F2 solo, y 3 días comparado con el hbFGF comercial). El tratamiento de las heridas con el rhbFGF-F1 originó resultados similares a los obtenidos con el hbFGF comercial, tanto en animales normales como diabéticos. El colágeno

tipo I solo se comportó de igual forma que la solución salina en términos de cicatrización.

#### Discusión

Con el fin de dirigir el hbFGF a espacios celulares-tisulares específicos e incrementar la vida media de este potente factor de crecimiento mitogénico, hemos diseñado una proteína de fusión que incorpora un dominio molecular de diez aminoácidos, el cual confiere al factor la capacidad de unirse con muy alta afinidad al colágeno tipo I. Esta proteína de fusión, a la que hemos denominado rhbFGF-F2, puede ser conducida a la MEC directamente o mezclada con matrices colagénicas implantables (en forma de geles o sólidas). El dominio aminoacídico utilizado en esta construcción ha sido el decapeptido WREPSFMALS, que corresponde a una modificación del factor de von Willebrand, el cual presenta una alta afinidad específica de unión a colágeno o gelatina (véase Takagi J. y colaboradores, *Biochem.* (1992), **31**: 8530-8534). Hemos demostrado que la sustitución en el decapeptido de la cisteína por la metionina en posición 7 (para mejorar las condiciones de renaturación) no interfiere en dicha afinidad. Con respecto a la proteína de fusión en sí, el rhbFGF-F2 tampoco presenta merma alguna en su proceso de renaturación, cuando se compara con el rhbFGF-F1 (carece del dominio aminoacídico), manteniendo una actividad biológica comparable al hbFGF comercial, cuando se mide tasa de proliferación en cultivos de HVEC.

La renaturación de proteínas agregadas en cuerpos de inclusión bacterianos a conformaciones biológicamente activas, requiere una serie de pasos interdependientes unos de otros: la solubilización, la renaturación oxidativa y la eliminación de denatürantes, cada uno de los cuales representa un desafío para su optimización (véase Handl C.E. y colaboradores, *Protein Expr. Purif.* (1993), **4**: 275-281; y Cardamone M. y colaboradores, *Biochem.* (1995), **34**: 5773-5794). Nuestros resultados demuestran una notable mejora en cada uno de ellos. 1) Hemos determinado que un denaturante iónico fuerte, guanidina 6 M, fue más efectivo que la urea 8 M en la solubilización de los cuerpos de inclusión. Sin embargo, en el análisis proteico tras cada paso de renaturación con solución de guanidina-HCl, detectamos que la actividad de las proteínas de fusión era notablemente más baja que cuando se empleaba urea. Algunos autores han demostrado que la guanidina-HCl podría interferir negativamente con el proceso de renaturación (véase Cardamone M. y colaboradores, *Biochem.* (1995), **34**: 5773-5794). Por esta razón, en nuestro estudio hemos utilizado inicialmente guanidina-HCl como denaturante para solubilizar los cuerpos de inclusión y optimizar el rendimiento proteico, para luego ser sustituido por guanidina-HCl con urea 8 M para desarrollar la purificación. 2) La renaturación oxidativa se realizó en urea 1.3 M, pH 8.0. 3) Puesto que la retirada de denaturantes por diálisis simple provoca abundante precipitación proteica, hemos realizado una dilución inicial del denaturante de seis veces (de urea 8 M a urea 1.3 M) en un tampón de óxido-reducción, el cual es capaz de mantener tanto la concentración de urea como las condiciones redox durante un in-

tervalo de 48 horas. El resultado es que, en ese tiempo, las proteínas solubles se rearmen en sus conformaciones nativas y la actividad biológica aumenta considerablemente sin precipitación alguna. Las moléculas pequeñas, tales como el glicerol, la sacarosa, el poli-etilenglicol PEG 200-2000, la albúmina de suero bovina o la L-arginina, se añaden normalmente a los tampones de diálisis para prevenir la precipitación proteica (véase Rudolph R. y Lilie H., *FASEB J.* (1996), **10**: 49-56). También la concentración de sales y el pH son factores claves a tener en cuenta en la diálisis, puesto que la estabilidad proteica depende de los estados de ionización de residuos laterales (véase Schumann J. y colaboradores, *Protein Sci.* (1993), **2**: 1612-1620). En consecuencia, hemos determinado que las condiciones ideales de diálisis para las proteínas de fusión rhbFGFs son 250 mM NaCl, 20% de sacarosa y pH 8.0. Como se ha descrito (véase Gary A.M. y colaboradores, *Science* (1990), **247**: 1328-1330), la inclusión de dominios moleculares auxiliares puede dificultar el proceso de renaturación. Sin embargo, con las adaptaciones realizadas, tanto moleculares, como niveles de óxido-reducción, pH, concentración de proteínas, adición de moléculas pequeñas y condiciones de diálisis, hemos mejorado el rendimiento de obtención de las proteínas rhbFGF- F1 y -F2 en un 30%.

El bFGF es un factor de crecimiento multifuncional cuyas propiedades biológicas sugieren un papel principal en la cicatrización de heridas. Este es un complejo proceso que se inicia con una fase inflamatoria y la liberación de componentes de la sangre a la herida, que activan una cascada de formación de coágulos y proporcionan una matriz para la afluencia de células inflamatorias. Después se inicia el tejido de encarnamiento para formar una población densa de fibroblastos y macrófagos embebidos en una matriz holgada de colágeno, fibronectina y ácido hialurónico, es decir la MEC. Proliferan las células endoteliales en la herida y se forman nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para suministrar nutrientes y oxígeno a la zona lesionada, aportación esencial para la síntesis, el depósito y la organización de la MEC (véase Satoh H. y colaboradores, *Jpn. J. Pharmacol.* (1997), **73**: 59-71). Se ha demostrado que el bFGF es un mitogénico potente para las células vasculares endoteliales. Además, es producido y liberado en tejidos dañados, contribuyendo a la proliferación de fibroblastos así como a la inducción a la síntesis de MEC por dichas células (véase Clark R.A.F., *Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (1996), 3-50).

Puesto que el bFGF es un agente pleiotrópico que estimula, inhibe y modula procesos celulares de manera tiempo- y dosis-dependiente, es esencial controlar su liberación al lugar deseado y su biodisponibilidad mientras se necesite de su acción como agente terapéutico. En nuestro estudio, el tratamiento de las heridas con el rhbFGF-F2 aceleró el proceso de cicatrización tanto en ratas normales como diabéticas, obteniéndose la máxima significancia cuando la proteína de fusión fue aplicada a la herida combinada con colágeno tipo I en forma de gel. Este apóposito, no sólo consi-

guió acelerar el cierre de la herida en ratas normales comparado con el hbFGF comercial, sino que también anuló el retraso que se producía en la respuesta de cicatrización en los animales diabéticos (cicatrización completa a los 13 días, aproximadamente el mismo tiempo que necesitan las heridas de ratas normales para cicatrizar cuando se las trata únicamente con la solución salina). Según los resultados confirmados *in vitro*, podemos pensar que el dominio molecular de unión específica a colágeno estaría incorporando a la proteína rhbFGF-F2 la capacidad de unirse específicamente al colágeno tipo I que está sirviendo de *carrier*. Una vez que este apósito (colágeno + factor) es colocado en la herida fresca, la presencia de enzimas del tipo collagenasa, cuya presencia en los primeros días de cicatrización ha sido demostrada (véase Edelman E.R. y colaboradores, Biomaterials (1991), 12: 619-629), estarían ocasionando una lenta liberación del rhbFGF-F2 desde la matriz colagénica a la que está unido hacia el amplio componente celular implicado en la cicatrización (fibroblastos, encargados de sintetizar más matriz de colágeno, células endoteliales, células inflamatorias), consiguiéndose así una

mayor y mejor disponibilidad del factor por las células diana. En este caso, el colágeno tipo I estaría actuando como modulador fisiológico en la liberación de la proteína hacia los elementos diana. Este hecho ha sido recientemente discutido por los autores de esta patente para un factor de crecimiento rhTGF-131 (véase Gordon E.M. y colaboradores, Hum. Gene Ther. (1997), 8: 1385-1394; y Andrades J.A. y colaboradores, Exp. Cell Res. (1999), 250:485-498).

Debido a que la actividad mitogénica del bFGF se pierde rápidamente cuando el factor es inyectado, se ha demostrado que cuando la proteína se combina con determinados materiales (por ejemplo, la heparina) se consigue aumentar la estabilidad proteica, así como preservar su actividad biológica (véase Edelman E.R. y colaboradores, Biomaterials (1991), 12: 619-629). El hecho de que la máxima tasa de cicatrización, tanto en animales normales como diabéticos, se halla conseguido cuando el rhbFGF-F2 se aplicaba combinado con colágeno tipo I, refuerza la idea de que el dominio aminoacídico WREPSFMALS esté incorporando una mayor y/o más duradera actividad biológica a la proteína de fusión resultante.

## REIVINDICACIONES

1. Factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno, obtenido por ingeniería recombinante (rhbFGF-F2) y **caracterizado** porque incluye un dominio de diez aminoácidos, correspondiente al factor de von Willebrand modificado, que le permite combinarse con el colágeno tipo I en fase de gel o sólida.

2. Factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno (rhbFGF-F2), de acuerdo con la reivindicación 1 que, en combinación con el colágeno tipo I, sirve para vehiculizar la proteína hacia lugares necesitados de reparación, tales como úlceras, quemaduras de diferente etiología y reparaciones de fracturas óseas.

3. Factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno (rhbFGF-F2), de acuerdo con la reivindicación 1 que, solo o combinado con el colágeno tipo I, tiene aplicación para acelerar la cicatrización de heridas en tejidos blandos, como las heridas cutáneas y dérmicas, tanto de incisión total o parcial.

4. Uso del factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno (rhbFGF-F2), de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de composiciones de aplicación ectópica para mejorar la tasa de cicatrización de heridas.

5. Método de preparación por ingeniería recombinante del factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno (rhbFGF-F2) de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por la incorporación a un vector de autorreplicación de un fragmento purificado de ADN que incluye:

- Una secuencia de ADN que codifica para una señal de purificación del tipo de (His)<sub>n</sub>, de ribonucleasa S, o de hemaglutinina A.

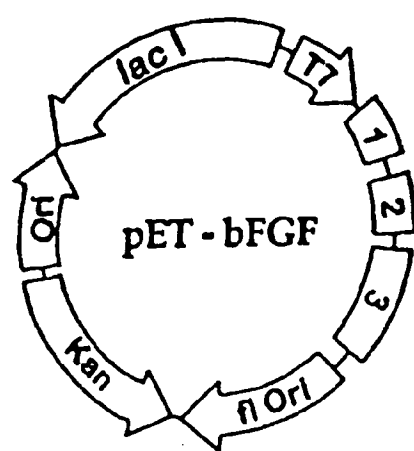
- Una secuencia de ADN que codifica para una proteinasa del grupo de la trombina, plasmina, tripsina, elastasa, pepsina, quimosina o termolisina.

- Una secuencia de ADN que codifica para una región de unión a matriz extracelular del tipo de colágeno, fibronectina o de superficie celular.

- Una secuencia de ADN que codifica para el fragmento activo del factor de crecimiento fibroblástico básico humano.

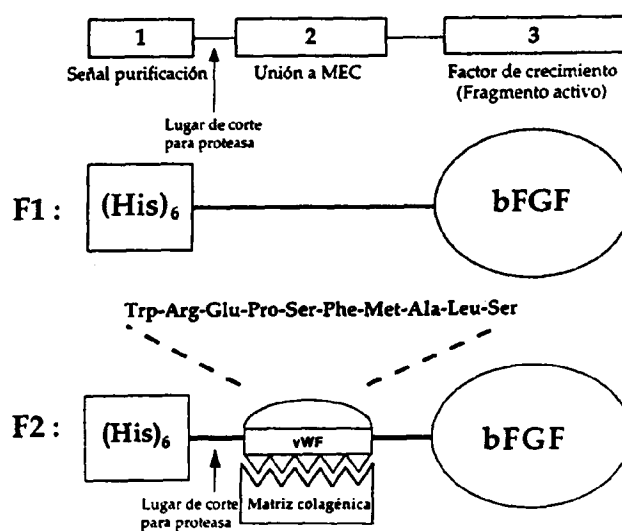
6. Método de obtención del factor de crecimiento fibroblástico básico con un dominio de unión específico a colágeno (rhbFGF-F2), maduro y activo, codificado por un fragmento de ADN de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende las siguientes fases:

- el aislamiento de la fracción proteica que contiene la región madura del rhbFGF-F2;
- la expresión de la proteína en bacterias transformadas que portan el sistema T7 polimerasa, en presencia de IPTG;
- la denaturación de la fracción proteica en un tampón denaturante con urea, Tris-HCl, NaCl y NP-40, a pH 8.0;
- la purificación de la proteína de fusión por cromatografía de Ni-NTA mediante urea a diferentes pH;
- la dilución del polipéptido maduro rhbFGF-F2 a una concentración óptima de 0.2 mg/ml;
- y la renaturación por diálisis en un tampón de óxido-reducción y DTT, seguido de un tampón con Tris-HCl, NaCl y sacarosa, a pH 8.0.



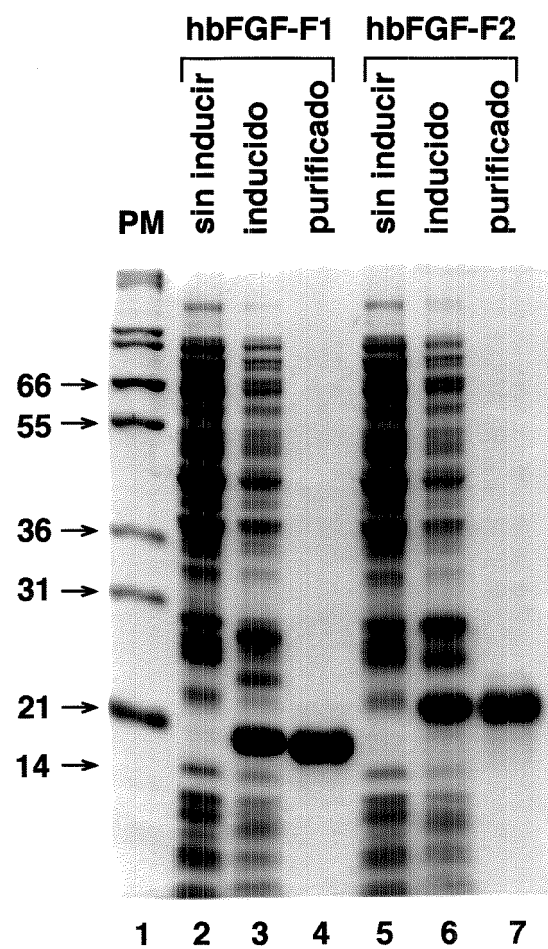
T7: promotor.

A

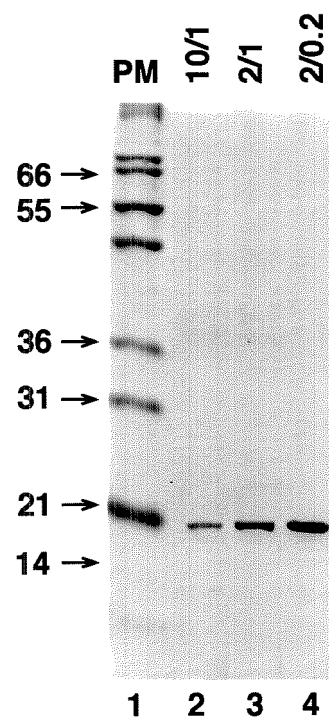


B

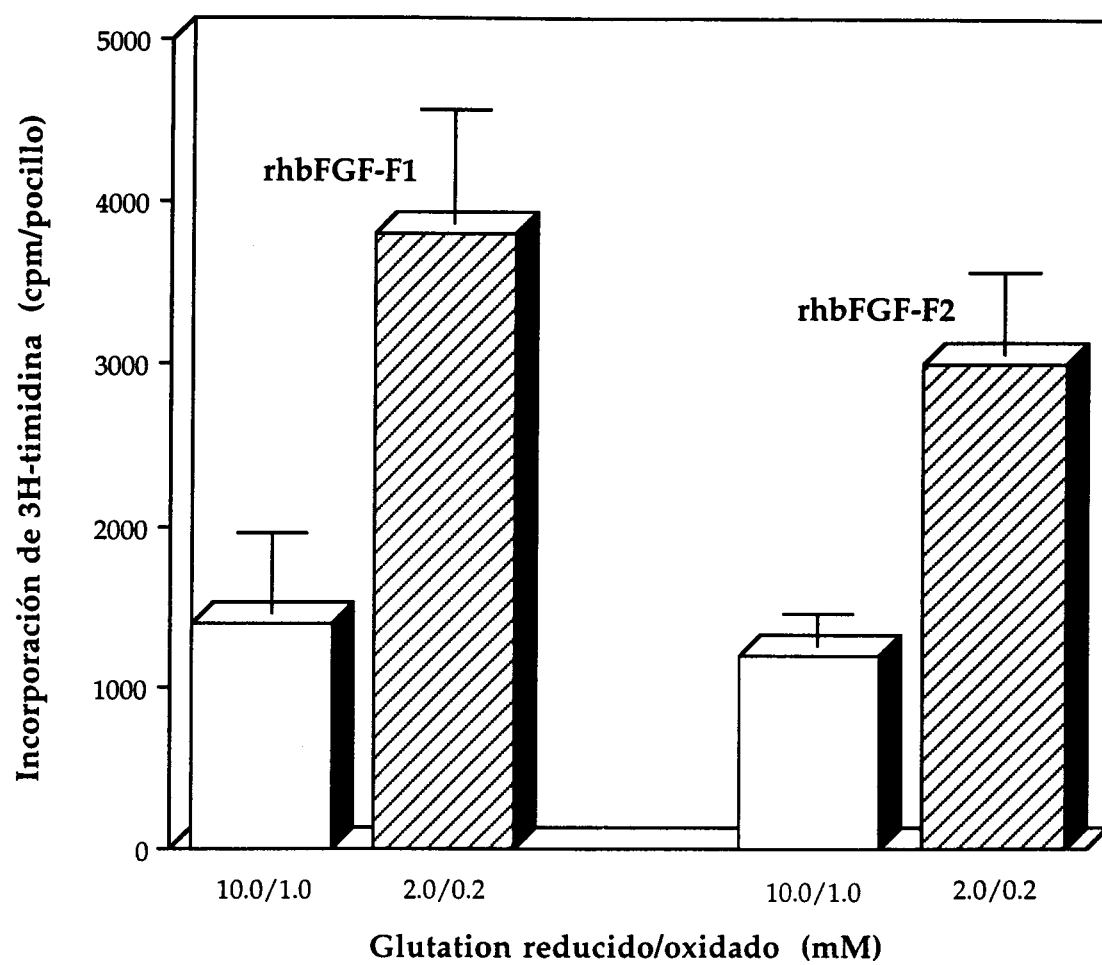
FIG. 1



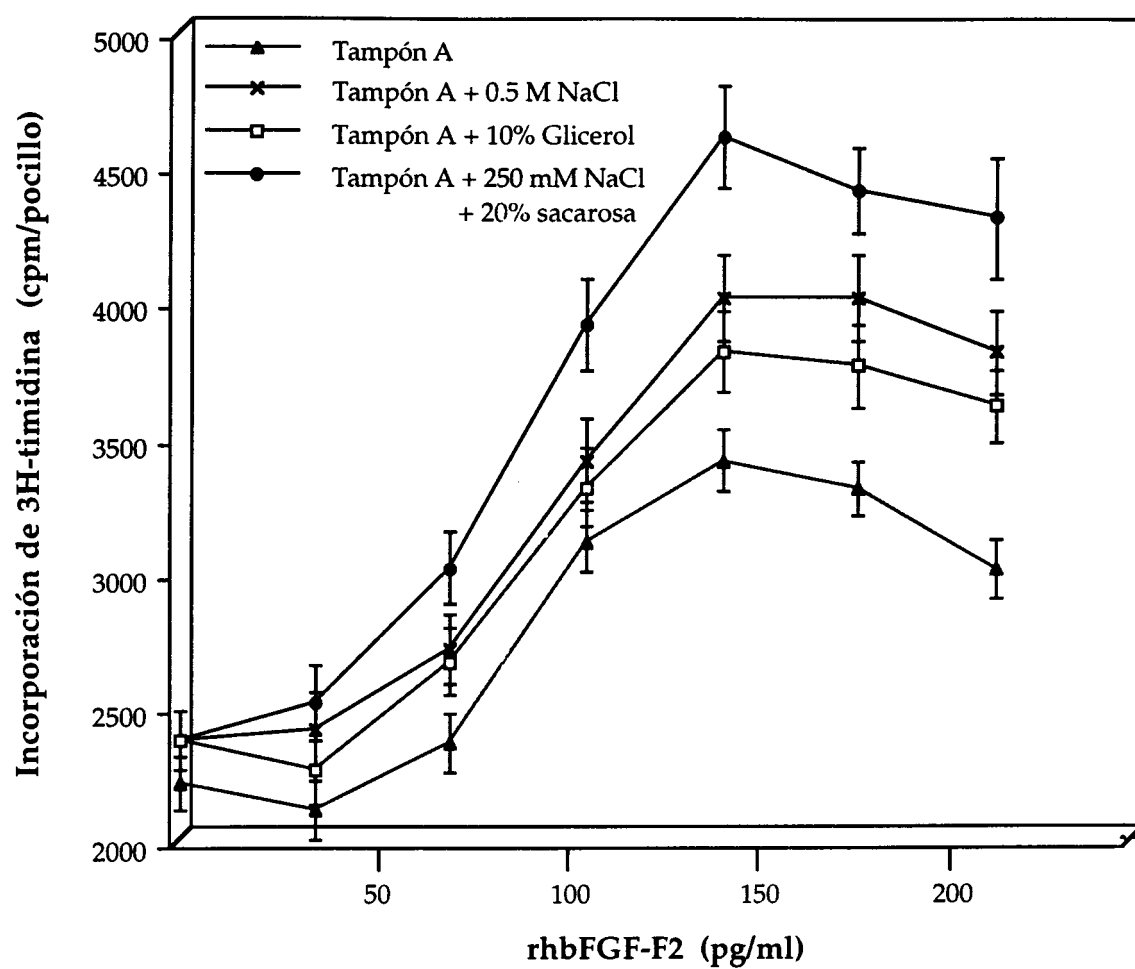
**FIG. 2**



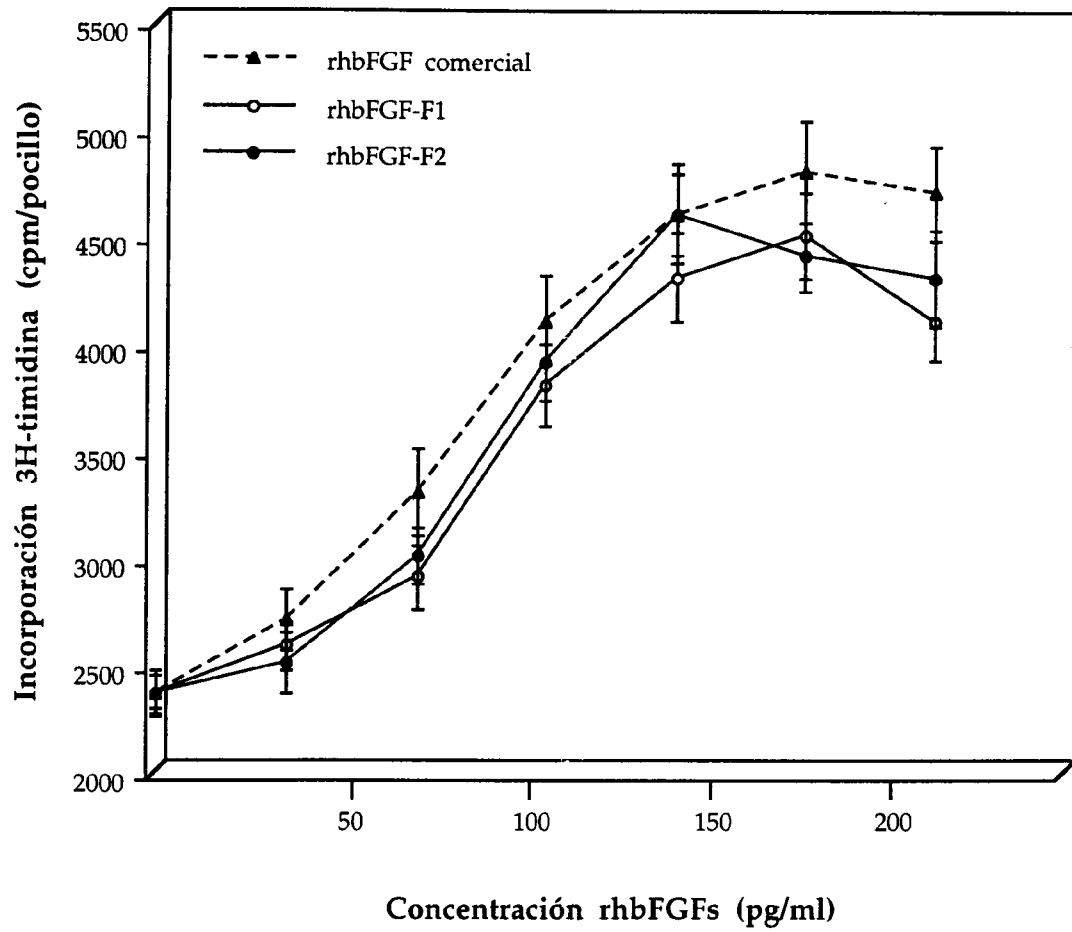
**FIG. 3A**



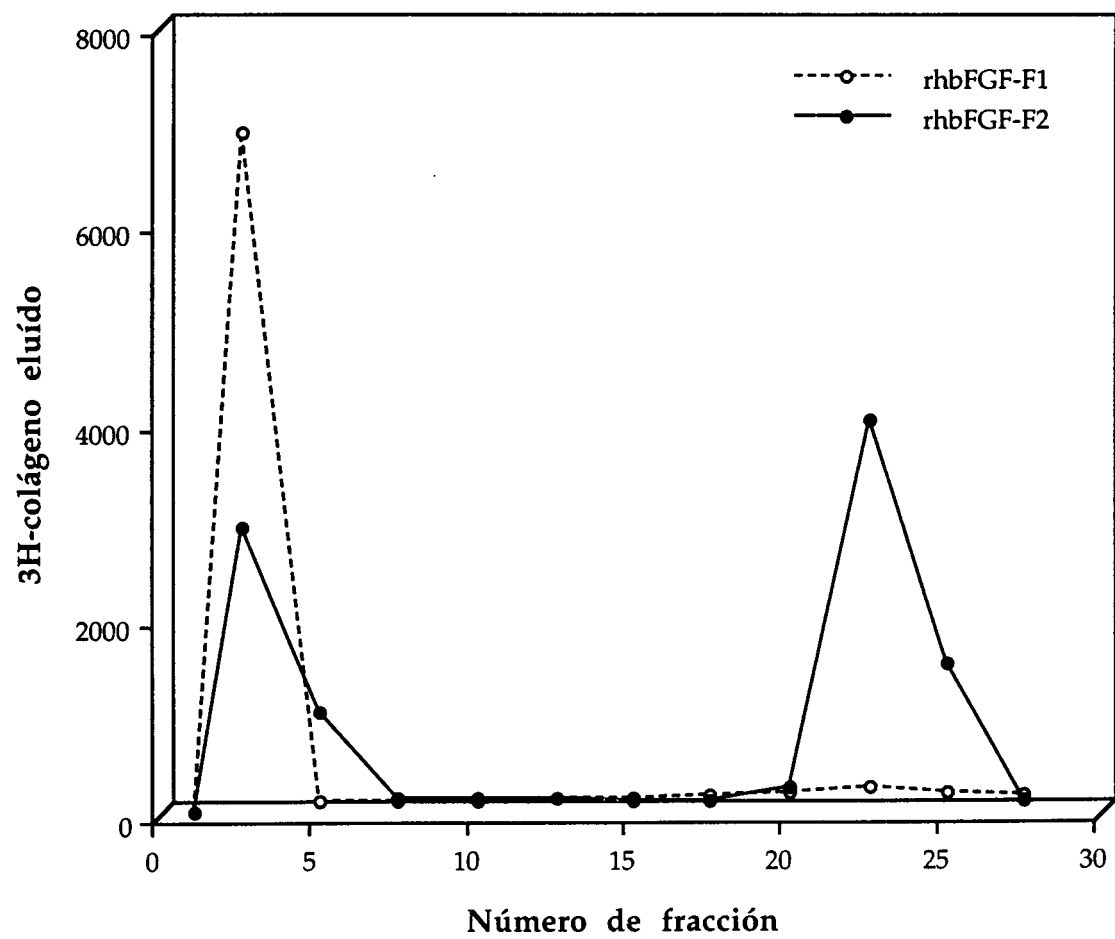
**FIG. 3B**



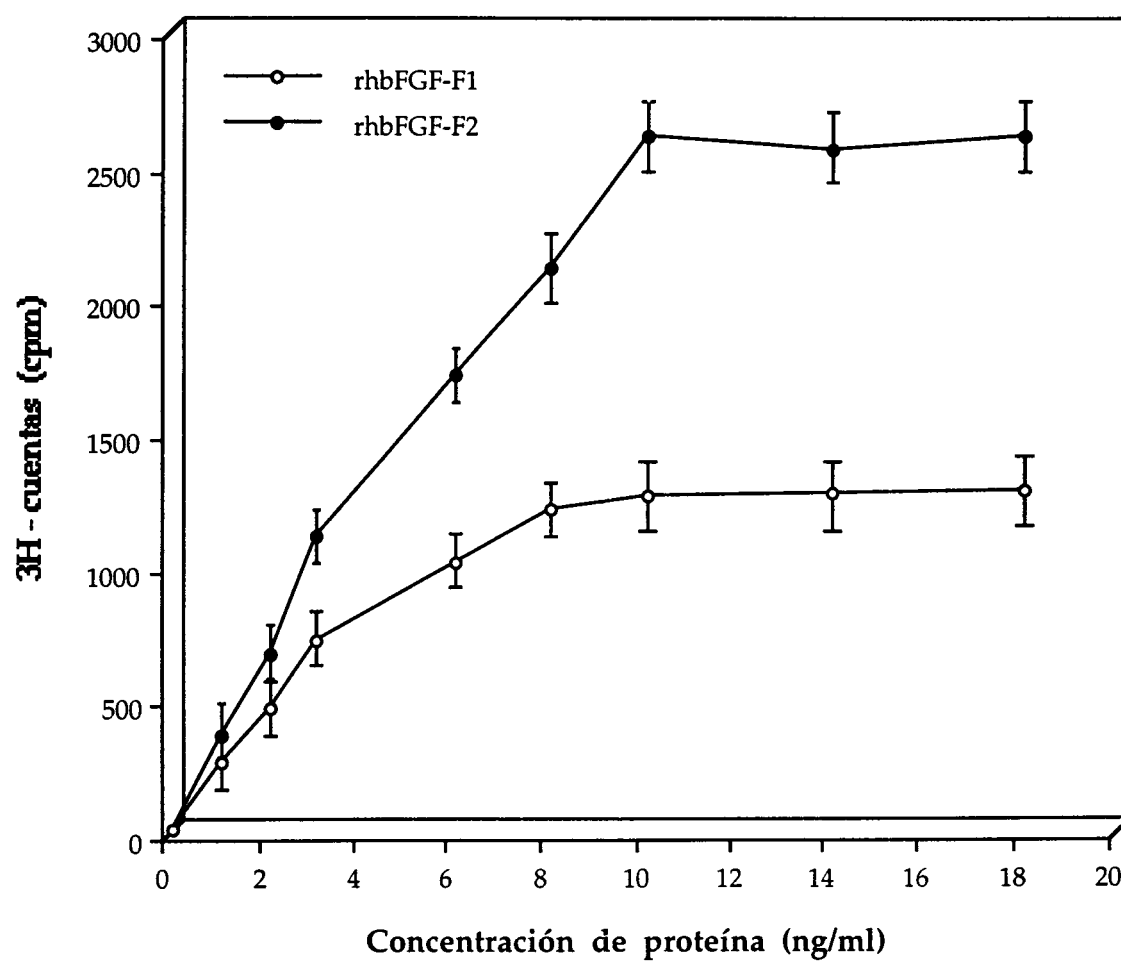
**FIG. 4**



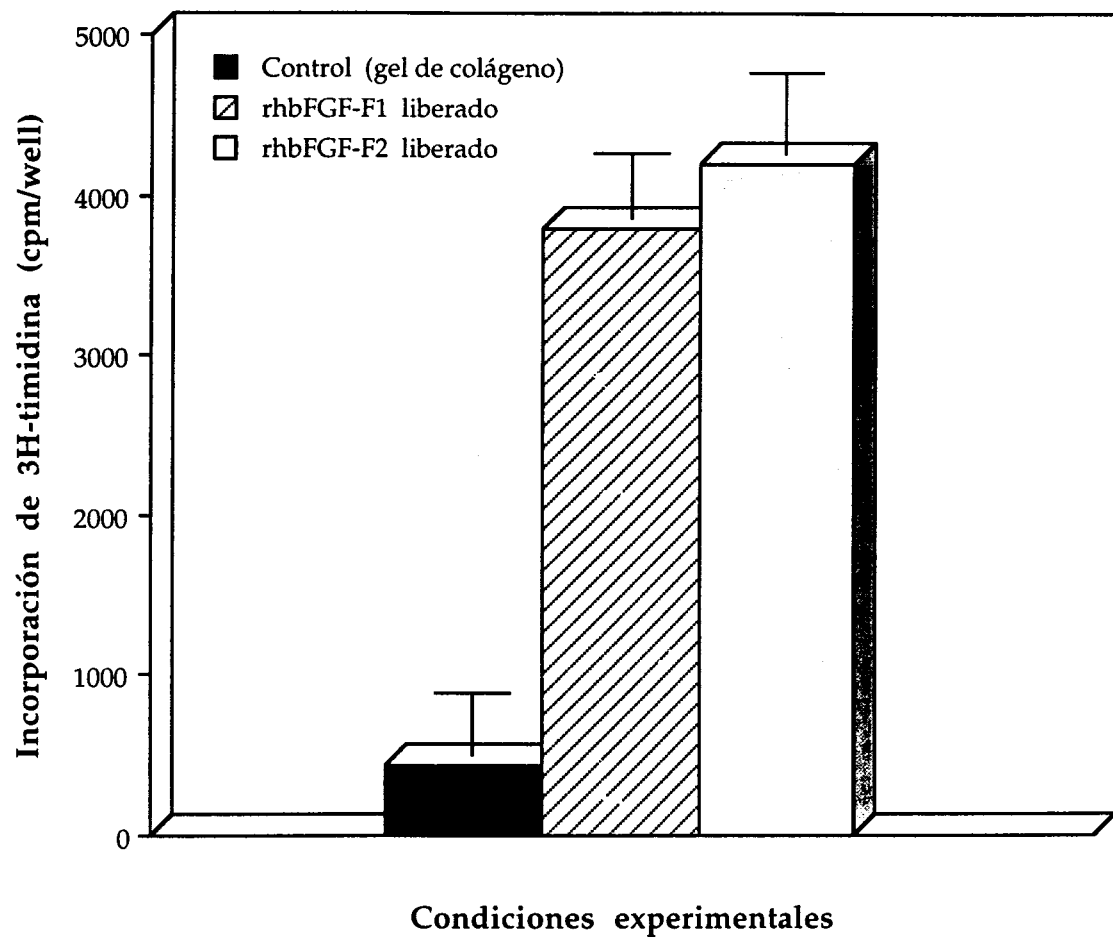
**FIG. 5**



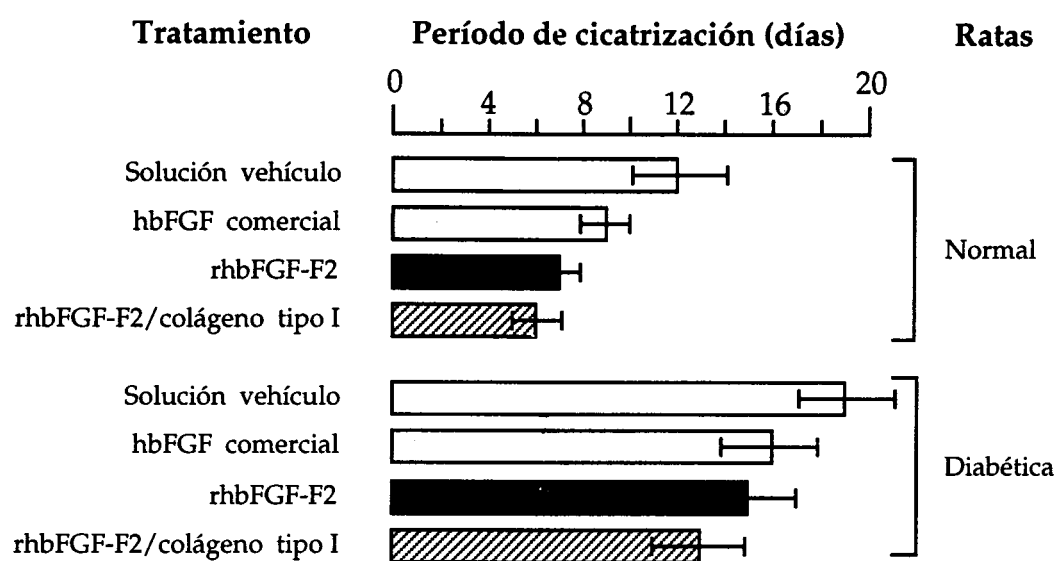
**FIG. 6**



**FIG. 7A**



**FIG. 7B**



**FIG. 8**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 186 501

⑫ Nº de solicitud: 200002811

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 23.11.2000

⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C07K 14/50, A61K 38/18, A61P 17/02

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X         | WO 9844938 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 15.10.1998, todo el documento, especialmente página 11, líneas 17-30; página 15, líneas 2-16.                                                                                                                                                        | 1-6                        |
| X         | WO 0006195 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 10.02.2000, todo el documento, especialmente página 13, líneas 9-20.                                                                                                                                                                                 | 1-6                        |
| X         | WO 0049159 A1 (TERUMO KABUSHIKI KAISHA) 24.08.2000, todo el documento, especialmente página 22, líneas 5-9.                                                                                                                                                                                            | 1-6                        |
| Y         | NISHI, N. et al. Collagen-binding growth factors: Production and characterization of functional fusion proteins having a collagen-binding domain". PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Vol. 95, junio 1998, páginas 7018-7023, todo el documento.                                                              | 1-6                        |
| Y         | ANDRADES, J.A. et al. "A recombinant human TGF-Beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth and differentiation of bone marrow mesenchymal cells". EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, Vol. 250, 1999, páginas 485-498. Todo el documento, especialmente página 487, figura 1. | 1-6                        |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.02.2002

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1