

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 419 657**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2009 E 09736873 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 2337796**

54 Título: **Proteínas recombinantes con actividad hemostática capaces de inducir la agregación plaquetaria**

30 Prioridad:

24.09.2008 FR 0856423

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

21.08.2013

73 Titular/es:

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
DIJON (100.0%)
1 boulevard Jeanne D'arc
21000 Dijon, FR**

72 Inventor/es:

**VANDROUX, DAVID;
DE MAISTRE, EMMANUEL y
PROST, EDOURD**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 419 657 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

Proteínas recombinantes con actividad hemostática capaces de inducir la agregación plaquetaria.

- 5 La presente invención se refiere a unas proteínas recombinantes constituidas por el ensamblaje de secuencias peptídicas descritas para interactuar con los receptores plaquetarios de los colágenos. Estas proteínas tienen una actividad pro-agregante, independiente de la formación de una triple hélice. Pueden ser producidas en bacterias y en células de mamíferos.
- 10 Los colágenos son los constituyentes estructurales principales de la matriz extracelular de todos los organismos multicelulares. Se trata de una familia de proteínas compuesta por 28 tipos diferentes que desempeñan un papel durante el desarrollo y en la homeostasis tisular. Son capaces de ensamblarse en diferentes estructuras supramoleculares en forma de fibrillas, de microfibrillas o también de red.
- 15 Los colágenos presentan la característica común de contener uno o varios dominios que tienen una estructura en triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas, o cadenas α , arrolladas unas a las otras. Esta característica está permitida por la presencia, en los tres aminoácidos, de una glicina a nivel de los motivos helicoidales que están constituidos por secuencias repetidas de tipo G-X-Y, en la que X es frecuentemente una prolina e Y una hidroxiprolina. Esta hidroxiprolina es esencial para la estabilización de la triple hélice y es característica de los
- 20 colágenos. Los residuos de prolinas están hidroxilados esencialmente por la prolil-4-hidroxilasa (P-4-H) en 4-hidroxiprolina. Existe una segunda hidroxilasa, la prolil-3-hidroxilasa que permite la hidroxilación de la prolina cuando ésta se encuentra en posición X, mientras que en la posición Y ya se encuentra una prolina hidroxilada por la P-4-H. En una molécula de colágeno, las cadenas alfa pueden ser idénticas o todas diferentes.
- 25 Las moléculas de colágeno están formadas por dominios helicoidales (o dominios colagenosos) rodeados de dominios no helicoidales, denominados N y C propéptidos. El reconocimiento de las tres cadenas α que forman una molécula y el principio de su ensamblaje están bajo el control del extremo C-terminal (C-propéptido). Se realiza a nivel del retículo endoplásmico. Después, los N y C propéptidos son extirpados durante la maduración del colágeno, dejando subsistir secuencias cortas no helicoidales, los telopéptidos.
- 30 Los colágenos desempeñan un papel importante a nivel de las paredes de los vasos manteniendo su integridad y su elasticidad. Esta pared está formada por los colágenos de tipo I y III, fibrilares, y por el colágeno de tipo IV, en red. Se debe señalar que el colágeno de tipo III está asimismo fuertemente expresado a nivel de las placas de ateroma. Por otra parte, los colágenos son capaces de modular las funciones de ciertas células mediante interacción directa
- 35 con unos receptores celulares específicos. Así, los colágenos, principalmente los tipos I y III, son potentes activadores de la función plaquetaria.
- El colágeno de tipo III es un homotrímero constituido por 3 cadenas $\alpha 1$ dispuestas en triple hélice. Dos tripletes G-P-P (potencialmente hidroxilados), presentes en el extremo C-terminal de las cadenas $\alpha 1$, serían después suficientes y necesarios para la nucleación y para el repliegue de la triple hélice (Bulleid *et al.*, EMBO J. 17 de nov. de 1997; 16(22): 6694-701). Sin embargo, estos dos tripletes no son suficientes para permitir la asociación inicial de las tres cadenas. Es interesante señalar que Bulleid *et al.* (1997) han observado una mejor eficacia de formación de la triple hélice cuando se mantienen tres tripletes, siendo esta eficacia incluso más elevada que para la molécula salvaje. Varias proteínas están implicadas en el proceso de ensamblaje de las cadenas monoméricas: la HSP47 (Heat Shock Protein) y la PD1 (Protein Disulfide Isomerase). El propéptido-C, situado en el extremo C terminal de las cadenas monoméricas, aparece implicado en la alineación de las cadenas α y en la formación de los puentes disulfuros necesarios para la estabilización de la proteína (Bulleid *et al.*, EMBO J. 17 de nov. de 1997; 16(22): 6694-701). Este propéptido-C sería por lo tanto requerido únicamente para asegurar la asociación de las cadenas monoméricas. Diferentes puntos a tener en cuenta en lo que se refiere a ello:
- 50
- está constituido por una secuencia discontinua de 15 aa que determina el ensamblaje tipo específico de las cadenas $\alpha 1$ (Hulmes DJ, J Struct Biol. ene.-feb. de 2002; 137(1-2): 2-10.).
 - un dominio "coiled-coil" situado al principio del propéptido-C está implicado en la trimerización del colágeno III (Bulleid *et al.*, EMBO J. 17 de nov. de 1997; 16(22): 6694-701). Este dominio está constituido por 4 heptapéptidos (McAlinden *et al.*, J Biol Chem. 24 de oct. de 2003; 278(43): 42200-7).
 - contiene 8 residuos de cisteína que permiten la formación de puentes disulfuros intra- e inter-catenarios.
- 60 La presencia de puentes disulfuros entre las cadenas a nivel del telopéptido-C o del propéptido-C no siempre se requiere para la asociación de las cadenas y la formación de la triple hélice (Bulleid *et al.*, Biochem J. 1 de jul. de 1996; 317 (Pt 1): 195-202.). Se debe señalar que los experimentos se llevan a cabo con el propéptido-N. Las nociones de trímero y de triple hélice alfa aparecen paradójicamente como independientes. En la ausencia de propéptido-N, parece juicioso dejar la cisteína 2 del propéptido C, o bien las dos cisteínas del telopéptido-C. Este último motivo, denominado "the knot sequence" (GPCCG), permitiría la formación de los puentes disulfuros
- 65

únicamente gracias a un fenómeno previo de ensamblaje y de repliegue de las cadenas $\alpha 1$ (Boudko y Engel, J Mol Biol. 30 de ene. de 2004; 335(5): 1289-97).

Ya sea de origen traumático o la consecuencia de la aterosclerosis, el daño de la pared arterial se acompaña de la destrucción del endotelio vascular y la exposición de componentes trombógenos, tales como el colágeno. Esto va seguido de la adhesión de plaquetas a nivel del sitio dañado, en contacto con superficies ricas en colágeno o en fragmentos de colágeno, su activación y la formación de un trombo. La adhesión y la estabilización de las plaquetas en contacto con este colágeno están permitidas por unas interacciones múltiples, de altas afinidades, entre unos receptores presentes en la superficie de las plaquetas y el colágeno. Esta adhesión puede intervenir indirectamente tras la unión del dominio A1 del factor von Willebrand (vWF) con el complejo plaquetario formado por las glicoproteínas (GP) GpIb-V-IX, unido a su vez al colágeno por su dominio A3, o por interacción directa ente un receptor plaquetario y el colágeno. Varios receptores pueden enlazar unas moléculas de colágeno a nivel de secuencias peptídicas muy específicas. Se trata de la integrina $\alpha 2\beta 1$, que desempeña un papel importante en la estabilización de la plaqueta en contacto con el colágeno, y de GpVI, considerado como el receptor más importante para la activación plaquetaria. Otro receptor, TIIICBP (type III collagen-binding protein), se ha descrito como capaz de enlazar directamente el colágeno.

La velocidad del flujo a nivel de los vasos es un determinante mayor que define el tipo de receptores plaquetarios del colágeno reclutado. A velocidad de flujo elevada, las plaquetas interactúan con el colágeno por medio del vWF a través del receptor GpIb y después son activadas por la fijación vía GpVI, interviniendo la integrina $\alpha 2\beta 1$ sólo como estabilizador de la unión plaqueta-colágeno. A velocidad de flujo lenta, las plaquetas se unen al colágeno por medio de la integrina $\alpha 2\beta 1$ que está seguida por la fijación a GpVI, que conduce a su activación, que es la etapa que prepara la agregación plaquetaria. Asimismo, otros receptores plaquetarios del colágeno estarían implicados como TIIICBP. En todos los casos, GpVI desempeña un papel principal en la activación de las plaquetas.

La adhesión plaquetaria es un proceso que se disocia ahora de la activación plaquetaria. En efecto, numerosos péptidos, que corresponden a cortos motivos peptídicos de colágeno, son capaces de inducir la adhesión de las plaquetas sin llevar a su activación. Algunos de estos péptidos presentan, no obstante, la capacidad de inducir la activación de las plaquetas y presentan una actividad denominada pro-agregante. Su estructuración en forma de triple hélice parece ser un pre-requisito indispensable para esta actividad. Se debe señalar que cuando algunos de estos péptidos permanecen en forma monomérica, éstos presentan una actividad anti-agregante mediante un mecanismo que queda por identificar pero que podría ser la ocupación de los sitios que se vuelven no disponibles para el colágeno nativo.

La mayoría de los trabajos que pretenden identificar las secuencia peptídicas implicadas en la adhesión de las plaquetas con el colágeno de tipo III utiliza el fragmento $\alpha 1(III)CB4$ que corresponde al fragmento de digestión por el CNBr que presenta la actividad más fuerte de agregación.

En estos últimos años, se han descrito diferentes motivos peptídicos como capaces de unir y activar las plaquetas. Se han ensayado en forma de péptidos, que pueden ser de dos tipos:

- emparentados con el colágeno, formados por la repetición de motivos conservados GPO repetidos n veces, no presentes en la secuencia nativa del colágeno de tipo III.
- o corresponden a unos péptidos formados por los motivos peptídicos presentes a nivel de la secuencia $\alpha 1(III)CB4$, principalmente obtenidos por síntesis química (Farndale *et al.*, Biochem Soc Trans. abril de 2008; 36 (Pt 2): 241-50).

La integrina $\alpha 2\beta 1$ es un receptor para los colágenos, la laminina y otros ligantes en diferentes tipos celulares, entre ellos las células endoteliales y las plaquetas. La $\alpha 2\beta 1$ une el colágeno por medio de su dominio I a nivel de los motivos peptídicos presentes en la secuencia de los colágenos fibrilares. Se han descrito diferentes motivos con la afinidad más fuerte para GFOGER presente a nivel de la cadena $\alpha 1$ del colágeno de tipo I. Para el colágeno de tipo III, y contrariamente al colágeno de tipo I, parece que son necesarios varios motivos de tipo GXYGER para una unión óptima, con GLOGER, GMOGER, GROGER y GAOGER como motivos principales (Kim *et al.*, J Biol Chem. 16 de sep. de 2005; 280(37): 32512-20). Se han descrito otros motivos, tales como GLOGEN y GLKGEN pero presentan una afinidad baja para $\alpha 2\beta 1$ (Raynal *et al.*, J Biol Chem. 17 de feb. de 2006; 3281(7): 3821-31). Se debe señalar que el conjunto de los péptidos sintetizados a partir de estos motivos presenta una actividad de adhesión sólo cuando están organizados en forma de triple hélice.

La glicoproteína VI (GPVI) es una glicoproteína transmembranaria de tipo I de 60-65 kDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Está constitutivamente expresada en la superficie de las plaquetas en forma de complejo no covalente con la cadena γ común a los receptores de Ig (FcR γ). Los péptidos descritos para interactuar con este receptor son unos péptidos emparentados con el colágeno formados por la repetición de 4 a 10 veces del triplete GPO (Morton *et al.*, Biochem J. 1 de marzo de 1995; 306 (Pt 2): 337-44 y Smethurst *et al.*, J Biol Chem. 12 de enero de 2007; 282(2): 1296-304). A pesar de estar formado por el 10% de motivo GPO, el número

máximo de repeticiones de este triplete no excede de tres en la secuencia nativa del colágeno de tipo III. Cabe señalar también en este caso que la formación de la triple hélice o de una forma polimérica, obtenida químicamente tras una modificación de los residuos de cisteína o lisina, es indispensable para conferir a estos péptidos una actividad pro-agregante. Además, la presencia de una hidroxiprolina en posición 3 es indispensable para esta actividad. A la inversa, cuando están en forma monomérica, estos péptidos presentan una actividad anti-agregante (Asselin *et al.*, *Biochem J.* 15 de abril de 1999; 339 (Pt 2): 413-8). Recientemente, Jarvis *et al.* han identificado el motivo peptídico en la secuencia del colágeno de tipo III que presenta la actividad de adhesión más fuerte. Está compuesto por los residuos GAOGLRGGAGPOGPEGGKGAAGPOGPO localizados a nivel de los aminoácidos 523 a 549 de I(III) CB4 (Jarvis *et al.*, *Blood.* 15 de mayo de 2008; 111(10): 4986-96). Este motivo peptídico está compuesto por 3 GPO, que son no consecutivos y que parecen ser el número mínimo necesario para una buena interacción con GpVI.

La interacción indirecta entre el receptor plaquetario Gplb y el colágeno es dependiente del factor vWF. Este vWF es una proteína multimérica plasmática segregada por las células endoteliales y las plaquetas en respuesta a daños vasculares o tras un aumento de las tensiones parietales. Desempeña un papel mayor en el reclutamiento de las plaquetas a nivel de los sitios dañados de los territorios vasculares sometidos a velocidades de flujo elevadas. Este factor está compuesto por tres dominios denominados A1, A2 y A3. Se fija al colágeno por medio de su dominio A3 y une el receptor Gplb por su dominio A1. El colágeno de tipo III parece poseer un sitio único, de alta afinidad para el dominio A3 del vWF, que está presente asimismo en el colágeno de tipo II. Este motivo peptídico está localizado entre los aminoácidos 403 a 413 y se compone de GPRGQOVMGFO con ciertos aminoácidos cítricos para la fijación al vWF (Lisman T *et al.*, *Blood.* 1 de diciembre de 2006; 108(12): 3753-6). Verkleij *et al.* han identificado como potencial sitio de unión, los aminoácidos 541 a 558 compuestos por GAAGPOGPOGSAGTOGLQ (Verkleij *et al.*, *Blood* 15 de mayo de 1998; 91(10): 3808-16). Este motivo peptídico está localizado entre el motivo vWF descrito por Lisman *et al.* y el motivo de unión a la integrina $\alpha 1\beta 2$ GMOGER.

El equipo de Fauvel-Lafève ha descrito la existencia de un octapéptido, KOGEOGPK, localizado entre los aminoácidos 655 a 662 del fragmento $\alpha 1$ (III) CB4. El receptor plaquetario reconocido por este octapéptido se ha identificado y denominado TIIICBP (type III collagen binding protein) (Monnet E *et al.*, *J Biol Chem.* 14 de abril de 2000; 275(15): 10912-7). Este octapéptido es capaz de inhibir la interacción de las plaquetas con el colágeno de tipo III, pero no con el colágeno de tipo I, al mismo tiempo en condición estática y en condición de flujo. Más recientemente, Pires *et al.* han demostrado que este octapéptido posee una actividad inhibitoria de la agregación únicamente cuando está en forma de homotrímero. Al contrario, su estructuración en forma de triple hélice mediante la adición a sus extremos de cisteínas y de GPP le confiere una actividad pro-agregante (Pires *et al.*, *Eur J Med Chem.* mayo de 2007; 42(5): 694-701).

Las propiedades biológicas y ultraestructurales de los colágenos, y en particular su capacidad de unión a receptores membranaarios, abren un campo de aplicaciones importante debido a su papel múltiple a nivel de los tejidos. Sin embargo, estas aplicaciones tienen un sentido sólo si es posible disponer de preparaciones homogéneas de estos colágenos en cantidades importantes y de manera reproducible.

Se han utilizado dos modos de producción para ello. Los trabajos y los desarrollos llevados a cabo en estos dos campos lo son generalmente de manera muy específica para una aplicación dada. Así, la síntesis química permite producir péptidos cortos que representan sólo una ínfima parte de la proteína, en general unos motivos peptídicos de interés. Su aplicación principal se refiere a la hemostasis y más precisamente a la modulación de la unión del colágeno a las plaquetas.

Sin embargo, estos péptidos poseen en general una sola de las actividades buscadas y ésta puede depender de la conformación tridimensional del péptido y en particular de la formación de una triple hélice. Así, existe una necesidad importante de desarrollo de proteínas recombinantes de colágenos funcionalizados que pueden ser producidas por unos sistemas biológicos que ofrecen una alta productividad. Un obstáculo principal son las dificultades de producción y de purificación de estas proteínas derivadas del colágeno debido a su tendencia a la agregación y a la adhesión.

Hoy en día, las secuencias peptídicas cortas (inferiores a 50 aminoácidos) han sido todas producidas por síntesis química y no por medio de unos sistemas de producción celular (Farndale *et al.*, *Biochem Soc Trans.* abril de 2008; 36 (Pt 2): 241-50). Además, estos motivos se han sintetizado de manera aislada. A la inversa, la síntesis de colágeno de tipo III recombinante, que presenta una actividad de unión a las plaquetas, se ha realizado por medio de unos sistemas de producción celular, y es la totalidad de la secuencia, por ejemplo el pro $\alpha 1$ (III), la que ha sido utilizada. El objetivo buscado es la síntesis de un procolágeno entero capaz de organizarse en triple hélice (WO 9307889). Estos colágenos recombinantes tienen en principio múltiples aplicaciones, las que soporta la secuencia total del colágeno. El documento WO-A-0134647 (Fibrogen) describe una porción del colágeno III mucho más larga que la SEC ID nº 1.

Se trata por lo tanto de sintetizar unas proteínas de estructura más simple, más pequeñas y por lo tanto menos exigentes en términos de producción, pero que conservan las actividades biológicas de interés de la proteína nativa.

La invención se refiere así a unas proteínas recombinantes que poseen los motivos necesarios para obtener una actividad pro-agregante, sintetizada en forma de un monómero incapaz de estructurarse en forma de triple hélice. La imposibilidad de formación de esta triple hélice es la consecuencia de la ausencia: i) de los motivos de reconocimiento de las cadenas α entre sí, ii) de los dominios N- y C-terminales no helicoidales de los colágenos así como iii) de los dos tripletes GPO necesarios para el inicio de la triple hélice. De manera sorprendente, la actividad pro-agregante se obtiene en ausencia de formación de triple hélice.

La solicitante ha mostrado de manera sorprendente que era posible reagrupar tres tipos de secuencias peptídicas dentro de una sola y misma proteína, de tipo monomérica, que tiene una actividad pro-agregante.

Las proteínas recombinantes de la presente invención reagrupan así:

- unas motivos peptídicos que presentan como mínimo una repetición de 4 tripletes GPO,
- unas secuencias peptídicas descritas como que presentan una actividad de unión a los diferentes receptores plaquetarios presentes a nivel de la secuencia nativa de los colágenos,
- unas secuencias de unión entre estos motivos formados por la repetición de tripletes GXY.

La producción de estas proteínas por unas bacterias y unas células de mamíferos permite disponer en cantidades importantes de estos colágenos recombinantes de nueva generación, resultados de la asociación de secuencias peptídicas emparentadas con el colágeno y de secuencias presentes en la forma nativa de los colágenos. Este tipo de proteínas no necesita privilegiar unas células que no producen de manera constitutiva unos colágenos como células hospedantes para esta producción. En efecto, su secuencia no permite el reconocimiento de las cadenas alfa de los diferentes colágenos nativos. Al contrario, es necesario privilegiar unas células productoras de colágenos que expresan unas enzimas claves de la maduración de los colágenos tales como la prolil-4-hidroxilasa (P4H) y la HSP47. Los sistemas de producción de colágenos recombinantes actuales utilizan al contrario unas células no productoras naturales de colágeno (Olsen *et al.*, *Acly Drug Deliv Rev.* 28 de noviembre de 2003; 55(12): 1547-67 y Ruggiero y Koch, *Methods.* mayo de 2008; 45(1): 75-85). Esto implica co-transfectar el gen que codifica para las enzimas como la P4H.

Las proteínas recombinantes según la invención presentan numerosas ventajas, entre ellas:

- el reagrupamiento de los motivos de interés dentro de proteínas de pequeño tamaño, más fáciles de producir con la ayuda de sistemas celulares de producción,
- una actividad pro-agregante en ausencia de una estructura en triple hélice,
- la ausencia en su secuencia de los sitios de reconocimiento de colagenasas pero la presencia de ellos para la HSP47, que permite su producción por unas células productoras de colágenos,
- su actividad biológica demostrada por unos ensayos de referencia (ensayos de agregación plaquetaria) que se utilizan para la observación de los tratamientos anti-plaquetarios actuales y la exploración de las funciones plaquetarias.

Las propiedades biológicas de las proteínas recombinantes según la invención permiten considerar numerosas aplicaciones.

La primera aplicación se refiere a la utilización de estas proteínas como herramienta de diagnóstico en la exploración de la enfermedad trombótica: ensayos de agregación plaquetaria, modelos de trombosis *in vitro* y evaluación de la eficacia de los tratamientos antiplaquetarios actuales (aspirina, clopidrogel) y futuros. Las proteínas producidas se derivan de proteínas humanas y presentan en su secuencia unos sitios de unión para ciertos receptores plaquetarios descritos por su papel en la adhesión y la activación plaquetaria. Los ensayos actuales utilizan unos colágenos de origen animal cuyas secuencias no presentan todas una homología perfecta con el ser humano. Por otra parte, la variación del número y de la localización de los sitios de interacción con los receptores plaquetarios entre las diferentes proteínas permite proponer unos ensayos de validación de diana más pertinentes. Existen unos fragmentos peptídicos que permiten trabajar más específicamente sobre cada uno de los receptores plaquetarios pero su modo de producción es diferente del de la presente invención, con una síntesis química frente una producción natural por unas células (importancia de las modificaciones post-traduccionales).

La presente invención puede intervenir en la composición de apósitos hemostáticos (reforzando así el reclutamiento *in situ* de las plaquetas en caso de lesión vascular), o de adhesivos hemostáticos para prevenir el riesgo de sangrado (contexto quirúrgico). Esos productos están comercializados actualmente, pero con un colágeno de fuente animal.

Otra aplicación es la utilización de estas proteínas para activar la cicatrización. La cicatrización de ciertas heridas

necesita la migración, la adhesión y la diferenciación *in situ* de ciertas poblaciones celulares, entre ellas las plaquetas. Estos procesos son dependientes de las integrinas de superficie de estas células. Algunas de los motivos peptídicos presentes en la estructura de las proteínas de la presente invención son capaces de interactuar con estas integrinas favoreciendo así la cicatrización.

5 En un campo muy parecido, estas proteínas recombinantes podrían ser propuestas en la composición de ciertas cremas dermatológicas.

10 Otra aplicación de las proteínas inhibidoras de la función plaquetaria es el tratamiento de la aterotrombosis. Los receptores plaquetarios son unas dianas terapéuticas futuras para luchar contra las complicaciones de la enfermedad aterotrombótica. Hoy en día, no existe ninguna molécula capaz de bloquear la fase inicial de adhesión de las plaquetas al sub-endotelio. Las diferentes estructuras proteicas de las proteínas de la presente invención permiten su interacción con estos receptores que conducen a efectos anti-adhesión plaquetaria (enmascaramiento de los sitios) y/o pro-adhesión plaquetaria. Los diferentes efectos pueden ser obtenidos con la misma proteína modulando sus propiedades fisicoquímicas.

15 La presente invención permite por lo tanto disponer de un agente reactivo biológico que presenta numerosas aplicaciones que pueden entrar en la composición de equipos reactivos: para la evaluación de las funciones plaquetarias, para activar la diferenciación celular para el diagnóstico de disfunciones hematológicas, para detectar mediante proyección de imágenes unas zonas de fibrosis. La presente invención puede asimismo entrar en la composición: de apósitos hemostáticos para al reclutamiento *in situ* de las plaquetas (en el caso de lesión vascular), de adhesivos hemostáticos para prevenir el riesgo de sangrado, o también en cremas dermatológicas.

20 Descripción de las secuencias

25 SEC ID nº 1: proteína recombinante collIII-like
SEC ID nº 2: polinucleótido que codifica la proteína recombinante collIII-like
SEC ID nº 3-6: Cebadores

30 **Descripción de la invención**

La invención se refiere a unos polipéptidos aislados que tienen la secuencia del polipéptido de la SEC ID nº 1 o del polipéptido de la posición 25 a la posición 152 de la SEC ID nº 1.

35 La invención tiene asimismo por objeto unos polipéptidos aislados que presentan por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la SEC ID nº 1 o con el polipéptido de la posición 25 a la posición 152 de la SEC ID nº 1, y capaces de inducir una agregación de las plaquetas sanguíneas humanas superior al 30% en un tromboagregómetro a 37°C con una agitación de 1000 rpm.

40 En un modo de realización preferido, estos polipéptidos comprenden los motivos peptídicos siguientes:

- GX₁X₂GER en la que X₁ y X₂ representan independientemente un aminoácido seleccionado de entre A, R, N, D, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V y O;
- 45 - (GPX₃)_n, estando n comprendido entre 4 y 10, y X₃ representa P u O;
- GPRGQX₄GVMGFX₅ en la que X₄ y X₅ representan independientemente P u O. P es la prolina y O la hidroxiprolina.

50 En otro modo preferido de realización, estos polipéptidos comprenden los motivos peptídicos siguientes:

- GAPGER,
- KPGEPGPK,
- (GPP)_n, estando n comprendido entre 4 y 10,
- 55 - RGD

Otro objeto de la invención es un polinucleótido aislado caracterizado porque codifica para un polipéptido según la invención.

60 En un modo de realización preferido, el polinucleótido tiene la secuencia del polinucleótido de la SEC ID nº 2.

Otro objeto de la invención es un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la SEC ID nº 1.

65 La invención se refiere asimismo a unos casetes de expresión que comprenden, en el sentido de la transcripción:

- un promotor funcional en un organismo hospedante,

- un polinucleótido según la invención,
- una secuencia terminadora funcional en el mismo organismo hospedante.

5 Otro objeto de la invención es un vector que comprende un polinucleótido según la invención y/o un casete de expresión según la invención.

Otro objeto de la invención es un organismo hospedante transformado con un polinucleótido según la invención, un casete de expresión según la invención y/o un vector según la invención.

10 La invención se refiere asimismo a unas composiciones para su utilización como medicamento, que comprenden un polipéptido según la invención, un polinucleótido según la invención, un casete de expresión según la invención, un vector según la invención y/o un organismo hospedante según la invención.

15 En un modo de realización preferido, la invención se refiere a unas composiciones para el tratamiento de las enfermedades trombóticas.

En otro modo de realización preferido, la invención se refiere a unas composiciones para el tratamiento de los trastornos de la hemostasis.

20 La invención se refiere asimismo a la utilización de estas composiciones para su utilización como agente cicatrizante.

Por último, la invención tiene por objeto unas composiciones cosmetológicas que comprenden un polipéptido tal como se ha descrito anteriormente.

25 La invención se refiere a unos polipéptidos aislados que tienen la secuencia del polipéptido de la SEC ID nº 1 o del polipéptido de la posición 25 a la posición 152 de la SEC ID nº 1.

30 El péptido de la posición 1 a la posición 24 de la SEC ID nº 1 corresponde al péptido señal que permite la secreción de la proteína recombinante por una célula hospedante. Este péptido señal podrá estar ausente o sustituido por otro péptido señal según unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia. El experto en la materia sabrá seleccionar el péptido señal homólogo o heterólogo apropiado para la expresión y la secreción de los polipéptidos de la presente invención en diferentes sistemas de expresión procariontes o eucariotes. Preferentemente, los polipéptidos de la presente invención se producen en células u organismos eucariotes y en particular en células de mamíferos. En un modo de realización particular de la invención, los polinucleótidos de la presente invención comprenden un péptido señal que permite su secreción en el medio extracelular. En otro modo de realización, la invención se refiere al polipéptido maduro obtenido después de la escisión del péptido señal.

40 Los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad biológica y en particular una actividad pro-agregante sobre las plaquetas sanguíneas humanas detectada con la ayuda de un tromboagregómetro (compañía Regulest, Florange, Francia), según la técnica de referencia (Born 1962). El plasma rico en plaquetas (PRP) se pone en contacto con un agonista (10 µl en 290 µl de PRP) y la aclaración del medio (relacionada con la formación de agregados que caen al fondo del tubo) se sigue en tiempo real (curva de agregación). En ausencia de agregación plaquetaria, la señal permanece plana (medio turbio persistente). Es posible verificar la ausencia o la presencia de agregados con el examen del tubo al final de la medición. La evaluación de la respuesta en ensayos de agregación plaquetaria se efectúa a 37°C, en agitación continua (1000 rpm). El aparato se calibra: 0% de agregación con el plasma rico en plaquetas (preparación obtenida por centrifugación lenta y concentración ajustada a 300 x 10⁹/l) y 100% de agregación con el plasma pobre en plaquetas (preparación obtenida por centrifugación rápida). La calidad de las preparaciones plaquetarias se ha validado verificando la respuesta de los agonistas de referencia (ADP 5 µm y colágeno 1 µg/ml), utilizados para el desarrollo de las terapias antiplaquetarias. Se considera que una proteína es pro-agregante cuando es capaz de inducir una agregación superior al 30%, y de manera irreversible.

50 Los motivos peptídicos de reconocimiento de receptores expresados en la superficie de numerosos tipos celulares confieren al polipéptido una actividad:

- 55
- de adhesión celular,
 - de reclutamiento celular.

60 El efecto pro-agregante del polipéptido independiente de su estructuración en triple hélice es la consecuencia de la activación de uno o varios receptores presentes en la superficie de las plaquetas (α 1 β 2, TIIICBP y GPVI).

65 La invención se refiere asimismo a unos fragmentos del polipéptido de la SEC ID nº 1 que conservan por lo menos una de las actividades del polipéptido de la SEC ID nº 1. El término "fragmento" de un polipéptido designa un polipéptido que comprende una parte, pero no la totalidad, del polipéptido del cual se deriva. La invención se refiere asimismo a un polipéptido que comprende un fragmento de por lo menos 100, 110, 120, 130, 140 o 150 aminoácidos del polipéptido de la SEC ID nº 1.

Estos fragmentos del polipéptido de la SEC ID nº 1 conservan por lo menos una de las actividades del polipéptido de la SEC ID nº 1. En particular, una actividad pro-agregante sobre las plaquetas sanguíneas humanas. La invención se refiere por lo tanto a los fragmentos biológicamente activos del polipéptido de la SEC ID nº 1. El término "fragmento biológicamente activo" designa un fragmento de un polipéptido que conserva la función del polipéptido del cual se deriva. Los fragmentos biológicamente activos del polipéptido de la SEC ID nº 1 conservan así por lo menos una de las funciones de este polipéptido y preferentemente conservan todas las actividades biológicas del polipéptido de la SEC ID nº 1. Los métodos de preparación de fragmentos de un polipéptido así como las técnicas de medición de las actividades biológicas de los polipéptidos de la presente invención son bien conocidos por el experto en la materia.

La invención tiene asimismo por objeto unos polipéptidos que tienen por lo menos una de las actividades del polipéptido de la SEC ID nº 1 y que presentan por lo menos el 70% de aminoácidos idénticos con el polipéptido de la SEC ID nº 1. Preferentemente, estos polipéptidos tienen las mismas propiedades y en particular las mismas actividades biológicas que el polipéptido de la SEC ID nº 1. La invención tiene por objeto unos polipéptidos que presentan por lo menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de aminoácidos idénticos con el polipéptido de la SEC ID nº 1. Por aminoácidos idénticos, se entiende unos aminoácidos invariables o sin cambios entre dos secuencias. Estos polipéptidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polipéptido de la SEC ID nº 1.

La invención tiene asimismo por objeto unos polipéptidos que presentan por lo menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de homología con el polipéptido de la SEC ID nº 1. Por homología, se entiende la medición del parecido entre secuencias proteicas. Estos polipéptidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polipéptido de la SEC ID nº 1. El grado de homología entre dos secuencias, cuantificado por un resultado, se basa en el porcentaje de identidades y/o de sustituciones conservadoras de las secuencias.

Los polipéptidos de la presente invención que presentan un cierto grado de homología o de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 1 comprenden por lo menos 100 o 150 aminoácidos.

Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de homología entre polipéptidos son conocidos por el experto en la materia. Se pueden emplear por ejemplo Vector NTi 9,1,0, el programa de alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>). Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto.

Los polipéptidos según la invención son aislados o purificados de su entorno natural. Los polipéptidos pueden ser preparados por medio de diferentes procedimientos. Estos procedimientos son en particular la producción de polipéptidos recombinantes por unas células hospedantes apropiadas y su purificación ulterior, la producción por síntesis química o, por último, una combinación de estos diferentes enfoques. Estos diferentes procedimientos de producción son bien conocidos por el experto en la materia. Preferentemente, los polipéptidos de la presente invención son producidos por unas células procariotas o eucariotas recombinantes. Los polipéptidos de la presente invención pueden así ser producidos en bacterias o en células de mamíferos.

La invención tiene asimismo por objeto unas proteínas de fusión, unas proteínas o unas proteínas quiméricas que comprenden los polipéptidos según la invención. El término "polipéptido" designa asimismo unas proteínas, así como unos polipéptidos modificados.

En un modo de realización de la invención, los polipéptidos según la invención están glicosilados. El polipéptido de la SEC ID nº 1 posee en particular unos sitios de O-glicosilación que presentan en los aminoácidos unas lisinas presentes en la posición 102 y 141 (en posición 3 de un triplete GXY). En un modo de realización preferido, el residuo de asparagina en la posición 93 del polipéptido de la SEC ID nº 1 está glicosilado.

La invención tiene asimismo por objeto unos polinucleótidos que codifican para los polipéptidos definidos anteriormente. Según la presente invención, se entiende por "polinucleótido" una cadena nucleotídica monocatenaria o su complementario, que puede ser de tipo ADN o ARN, o una cadena nucleotídica bicatenaria que puede ser de tipo ADN complementario o genómico. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular de ADN bicatenario. El término "polinucleótido" designa asimismo los polinucleótidos modificados. Los polinucleótidos de la presente invención están aislados o purificados de su entorno natural. Preferentemente, los polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar mediante las técnicas clásicas de biología molecular, tales como las descritas por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) o por síntesis química.

En un primer modo de realización, la invención se refiere al polinucleótido de la SEC ID nº 2. En un segundo modo de realización, la invención se refiere al polinucleótido de la SEC ID nº 2, cuya secuencia está comprendida entre la posición 73 y la posición 459 de la SEC ID nº 1. Estos polinucleótidos codifican para los polipéptidos definidos anteriormente.

La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos que presentan por lo menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%,

el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de identidad con el polinucleótido de la SEC ID nº 2 o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 73 y la posición 459 de la SEC ID nº 2. Estos polinucleótidos codifican preferentemente para un polipéptido que conserva las actividades biológicas del polipéptido de la SEC ID nº 1.

5 Por nucleótidos idénticos, se entiende unos nucleótidos invariables o sin cambios entre dos secuencias. Estos polinucleótidos pueden presentar una deleción, una adición o una sustitución de por lo menos un nucleótido con respecto al polinucleótido de referencia.

10 La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos que presentan por lo menos el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% y preferentemente por lo menos el 99% de homología con el polinucleótido de la SEC ID nº 2 o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 73 y la posición 459 de la SEC ID nº 2. Estos polinucleótidos codifican preferentemente para un polipéptido que conserva las actividades biológicas del polipéptido de la SEC ID nº 1.

15 Por homología, se entiende la medición del parecido entre secuencias nucleicas. Estos polinucleótidos pueden presentar una deleción, una adición o una sustitución de por lo menos un nucleótido con respecto al polinucleótido de referencia. El grado de homología entre dos secuencias, cuantificado por un resultado, se basa en el porcentaje de identidades y/o de sustituciones conservadoras de las secuencias.

20 Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de homología entre las secuencias de ácidos nucleicos son bien conocidos por el experto en la materia. Se pueden emplear por ejemplo Vector NTI 9.1.0, el programa de alineación AlignX (Clustal W algorithm) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>). Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto.

25 La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos capaces de hibridarse de manera selectiva con el polinucleótido de la SEC ID nº 2 o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 73 y la posición 459 de la SEC ID nº 2. Preferentemente, la hibridación selectiva se efectúa en condiciones de astringencia media y preferentemente en condiciones de astringencia alta. Estos polinucleótidos codifican preferentemente para
 30 unos polipéptidos que tienen las actividades biológicas del polipéptido de la SEC ID nº 1. Por "secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva" se entiende, según la invención, las secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de manera significativa. El nivel de la señal generada por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces, más intenso que el de la interacción de otras secuencias de
 35 ADN que generan el ruido de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes que permiten una hibridación selectiva son bien conocidas por el experto en la materia. En general, la temperatura de hibridación y de lavado es inferior a por lo menos 5°C a Tm de la secuencia de referencia a un pH dado y para una fuerza iónica dada. Típicamente, la temperatura de hibridación es de por lo menos 30°C para un polinucleótido de 15 a 50 nucleótidos y de por lo menos 60°C para un polinucleótido de más de 50 nucleótidos. A título de ejemplo, la hibridación se realiza
 40 en el tampón siguiente: 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de EDTA, el 0,02% de PVP, el 0,02% de Ficoll, el 0,02% de BSA, 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los lavados se realizan, por ejemplo, sucesivamente a astringencia baja en un tampón 2X SSC, el 0,1% de SDS, a astringencia media en un tampón 0,5X SSC, el 0,1% de SDS y a astringencia alta en un tampón 0,1X SSC, el 0,1% de SDS. La hibridación se puede efectuar, por supuesto, según otros métodos habituales bien conocidos por el experto en la materia (véase en particular Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Preferentemente, los polinucleótidos que se hibridan de manera selectiva a un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia.

La invención se refiere de manera general a los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos según la invención. Debido a la degeneración del código genético, diferentes polinucleótidos pueden codificar un mismo polipéptido.

La invención se refiere asimismo a unos casetes de expresión que comprenden en el sentido de la transcripción:

- un promotor funcional en un organismo hospedante,
- un polinucleótido según la invención,
- una secuencia terminadora funcional en el mismo organismo hospedante.

Según un modo de realización de la invención, un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la invención se inserta en un casete de expresión utilizando unas técnicas de clonación bien conocidas por el experto en la materia. Este casete de expresión comprende los elementos necesarios para la transcripción y para la traducción de las secuencias que codifican para los polipéptidos según la invención.

Ventajosamente, este casete de expresión comprende al mismo tiempo unos elementos que permiten hacer producir un polipéptido por una célula hospedante y unos elementos necesarios para la regulación de esta expresión.

65 Cualquier tipo de secuencia promotora puede ser utilizado en los casetes de expresión según la invención. La

elección del promotor dependerá en particular del organismo hospedante seleccionado para la expresión del gen de interés. Algunos promotores permiten una expresión constitutiva mientras que otros promotores son, por el contrario, inducibles. Entre los promotores funcionales en las bacterias, se citará en particular el de la ARN polimerasa del bacteriófago T7. Entre los promotores funcionales en las levaduras, se citará el promotor del gen GAL1 o los promotores GAL4 y ADH de *S. cerevisiae*. Entre los promotores funcionales en las células de eucariotas superiores y en particular en las células de mamíferos, se citará CMV (Cytomegalo virus), SV40, RSV (Rous Sarcoma Virus), beta-actina humana o de pollo, beta-globina, PGK (Phosphoglicérate kinase), EF1alfa, timidina quinasa, MMTV (Mouse mammary tumor virus). Todos estos promotores están descritos en la bibliografía y son bien conocidos por el experto en la materia.

Los casetes de expresión, según la presente invención, pueden incluir además cualquier otra secuencia necesaria para la expresión de los polipéptidos o de los polinucleótidos como, por ejemplo, unos elementos de regulación o unas secuencias señal que permiten la secreción de los polipéptidos producidos por el organismo hospedante. Se puede utilizar en particular cualquier secuencia de regulación que permita aumentar el nivel de expresión de la secuencia codificante insertada en el casete de expresión. Según la invención, se pueden utilizar, en particular, en asociación con la secuencia de regulación promotora, otras secuencias de regulación, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como unos activadores de transcripción ("enhancer").

Se puede utilizar una gran variedad de secuencias terminadoras en los casetes de expresión según la invención, permitiendo estas secuencias la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Se puede utilizar cualquier secuencia terminadora funcional en el organismo hospedante seleccionado.

La presente invención tiene asimismo por objeto un polinucleótido que comprende un casete de expresión según la invención, estando ventajosamente los casetes de expresión según la presente invención insertados en un vector.

La presente invención se refiere por lo tanto asimismo a unos vectores de replicación o de expresión para la transformación de un organismo hospedante que comprende por lo menos un polinucleótido o un casete de expresión según la presente invención. Este vector puede corresponder en particular a un plásmido, a un cósmido, a un bacteriófago o a un virus en el que se inserta un polinucleótido o un casete de expresión según la invención. Las técnicas de construcción de estos vectores y de inserción de un polinucleótido de la invención en estos vectores son bien conocidas por el experto en la materia. De manera general, se puede utilizar cualquier vector capaz de mantenerse, de auto-replicarse o de propagarse en una célula hospedante con el fin de inducir en particular la expresión de un polinucleótido o de un polipéptido. El experto en la materia seleccionará los vectores apropiados en función del organismo hospedante a transformar, y en función de la técnica de transformación aplicada.

Los vectores de la presente invención se utilizan en particular para transformar un organismo hospedante con vistas a la replicación del vector y/o de la expresión de un polipéptido según la invención en el organismo hospedante.

La invención se refiere asimismo a un método para preparar un polipéptido según la invención que comprende las etapas siguientes:

- se transforma un organismo hospedante con un vector de expresión que comprende un casete de expresión según la invención y/o con un polinucleótido según la invención,

- se aíslan los polipéptidos producidos por el organismo hospedante.

La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de transformación de un organismo hospedante por integración en dicho organismo hospedante de por lo menos un polinucleótido o de un casete de expresión o de un vector según la invención. El polinucleótido puede estar integrado en el genoma del organismo hospedante o replicarse de manera estable en el organismo hospedante. Los métodos de transformación de los organismos hospedantes son bien conocidos por el experto en la materia y están ampliamente descritos en la bibliografía.

La presente invención se refiere asimismo a un organismo hospedante transformado con un polinucleótido, un casete de expresión o un vector según la invención. Por organismo hospedante se entiende, en particular según la invención, cualquier organismo mono o pluricelular, inferior o superior, en particular seleccionado de entre las bacterias, las levaduras y las células de eucariotas superiores, en particular las células de mamíferos tales como CHO (Chinese hamster ovary cells), BHK (baby hamster kidney), HEK-293 (human embryonic kidney cell line), NSO (línea de mieloma de ratón), Per.C6 (Crucell), YB2/0 (ATCC n° CRL 1662). Por organismo hospedante se entiende un organismo no humano.

La invención se refiere asimismo a unas composiciones para su utilización como medicamento que comprenden un polipéptido según la invención, un polinucleótido según la invención, un casete de expresión según la invención, un vector según la invención y/o un organismo hospedante según la invención. La invención se refiere por lo tanto también a unas composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido según la invención, un polinucleótido según la invención, un casete de expresión según la invención, un vector según la invención y/o un organismo hospedante según la invención.

En un modo de realización preferido, la invención se refiere a unas composiciones para la prevención y/o el tratamiento de las trombosis.

5 En otro modo de realización, la invención se refiere a unas composiciones para la prevención o el tratamiento de los trastornos de la hemostasis.

La invención se refiere asimismo a estas composiciones para su utilización como agente cicatrizante.

10 En otro modo de realización, la invención se refiere a unas composiciones que pueden servir también:

- como reactivos de diagnósticos para detectar:

15 * ciertas disfunciones plaquetarias
* unas enfermedades hematológicas

- como componentes activos de apósitos y adhesivos hemostáticos en la composición de cremas dermatológicas y cosméticas.

20 La invención se refiere asimismo a unos métodos de tratamiento terapéutico de las trombosis que comprenden la administración a un individuo de una cantidad eficaz de un polipéptido según la invención, de un polinucleótido según la invención, de un casete de expresión según la invención, de un vector según la invención y/o de un organismo hospedante según la invención.

25 La invención se refiere por último a la utilización de los polipéptidos, polinucleótidos y organismos hospedantes transformados de la presente invención para la fabricación de medicamentos.

La invención se refiere a unas composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido, un polinucleótido o un organismo hospedante transformado, tales como los definidos en la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente apropiado.

30 Estas composiciones pueden ser formuladas para la administración a los mamíferos, incluyendo el ser humano. La posología varía según el tratamiento y según la afección en cuestión. Estas composiciones están realizadas de manera que puedan ser administradas por vía digestiva o parenteral.

35 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el ingrediente activo se puede administrar en formas unitarias de administración, en mezcla con unos soportes farmacéuticos clásicos, a los animales o a los seres humanos. Las formas unitarias de administración apropiadas comprenden las formas por vía oral, tales como los comprimidos, las cápsulas, los polvos, los gránulos y las soluciones o suspensiones orales, las formas de administración sublingual y bucal, las formas de administración sub-cutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal o intraocular y las formas de administración rectal.

40 Cuando se prepara una composición sólida en forma de comprimidos, se mezcla el ingrediente activo principal con un vehículo farmacéutico tal como la gelatina, el almidón, la lactosa, el estearato de magnesio, el talco, la goma arábica, o análogos. Se puede revestir los comprimidos con sacarosa o con otras materias apropiadas, o también se pueden tratar de tal manera que tengan una actividad prolongada o retrasada y que liberen de manera continua una cantidad predeterminada de principio activo.

50 Se obtiene una preparación en cápsulas mezclando el ingrediente activo con un diluyente y vertiendo la mezcla obtenida en unas cápsulas blandas o duras.

Una preparación en forma de jarabe o de elixir puede contener el ingrediente activo conjuntamente con un edulcorante, un antiséptico, así como un agente saborizante y un colorante apropiado.

55 Los polvos o los gránulos dispersables en agua pueden contener el ingrediente activo en mezcla con unos agentes de dispersión o unos agentes humectantes, o unos agentes de puesta en suspensión, al igual que con unos correctores de sabor o unos edulcorantes.

60 La invención se refiere asimismo a unas composiciones cosmetológicas que comprenden un polipéptido tal como se ha descrito anteriormente.

65 Estas composiciones pueden comprender además unos principios activos utilizados clásicamente en dermatología, tales como los emolientes, los principios activos hidratantes, los agentes reestructurantes de la barrera cutánea, los agentes anti-irritantes o los agentes calmantes. Las composiciones cosmetológicas según la invención pueden ser formuladas en forma de diferentes preparaciones adecuadas para una administración tópica. Según un modo de

realización preferido, las diferentes preparaciones son adecuadas para la administración tópica e incluyen las cremas, las emulsiones, las leches, las pomadas, las lociones, los aceites, las soluciones acuosas o hidroalcohólicas o glicólicas, los polvos, los sprays, las gelatinas, los geles, hidrogeles o cualquier otro producto para aplicación externa. Estas composiciones cosméticas pueden contener asimismo unos antioxidantes, unos conservantes, etc. La invención se refiere además a un método de tratamiento cosmético, de cuidado higiénico, de embellecimiento y/o a un método para perfumar unas mucosas y/o unas pieles normales, secas, grasas, mixtas, deshidratadas, envejecidas, sensibles, irritadas, incómodas, intolerantes, que presentan un desequilibrio relacionado con el envejecimiento intrínseco, extrínseco u hormonal o relacionado con las agresiones exógenas (contaminantes, UV, estrés, etc.), con tendencia alérgica, que presentan unos trastornos de la pigmentación, caracterizada porque consiste en aplicar una composición según la invención.

Figuras

Figura 1: Expresión de los ARN mensajeros que codifican para la proteína en células CHO-S adherentes transfectadas de manera transitoria.

Figura 2: la figura 2 representa la agregación plaquetaria inducida por un medio acondicionado de células CHO-S adherentes, transfectadas de manera transitoria, en presencia o no de epinefrina.

Figura 3: la figura 3 representa la expresión de los ARN mensajeros que codifican para la proteína en un clon celular estable.

Figura 4: la figura 4 muestra la detección mediante transferencia Western de la presencia de la proteína-6X-histidina en las diferentes fracciones bacterianas obtenidas después de la purificación.

Figura 5: la figura 5 muestra la agregación plaquetaria inducida por la proteína producida en la bacteria.

Figura 6: la figura 6 muestra la validación por transferencia Western de la especificidad del suero de conejo obtenido después de 89 días de inmunización.

Ejemplos

A. Producción transitoria por células de mamíferos

1. Construcción de los vectores

Plásmido 1 (NVH001-A)

El plásmido NVH001-A contiene los elementos siguientes:

- un intrón que procede del plásmido pCIneo (Promega: pCIneo Mammalian Expression Vector)
- la proteína de interés de la presente invención BVH001 que procede del vector pUC57-NVH001 (pedido a genecust) y que posee el péptido señal del colágeno de tipo III (NP 000081)
- una cola polyA que procede del ARNm de hGH (NM_000515)
- un promotor CMV que procede de pCDFI-MCSI-EFI-copGFP (System Biosciences: pCDF cDNA cloning and Expression Lentivectors).

Plásmido 2 (NVH001-B1), 3 (NVH001-B2), 4 (NVH001-C1) y 5 (NVH001-C2)

Los plásmidos *NVH001-B1* y *NVH001-C1* contienen los elementos siguientes:

- un origen SV40 que procede del plásmido derivado pSV2-Neo (ori SV40: 1-989 en el vector, ATCC 37149)
- un promotor (enhancer) que puede ser uno de los descritos en Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- un casete de higromicina que procede de pMono-hygro-mcs (Invivogen)
- la proteína de interés de la presente invención NVH001 que procede del vector pUC57-NVH001 (pedido a Genecust) y que posee el péptido señal del colágeno de tipo III (NP 000081)
- un propéptido C que procede del plásmido pUC57-proC (pedido a Genecust)

- una cola polyA que procede de ARNm de hGH (NM 000515).

Los plásmidos *NVH001-B2* y *NVH001-C2* contienen los mismos elementos que los plásmidos *NVH001-B1* y *C1*, salvo el propéptido C

Todos los plásmidos finales son secuenciados para verificar que no se ha introducido ninguna mutación en el ADN de la proteína de interés y en los elementos aportados.

2. Transfección de células de mamíferos

Plásmido 1 (*NVH001-A*)

1. El vector *NVH001-A* se transfecta, de manera transitoria, en unas células CHO-S hechas adherentes y cultivadas en un medio RPMI que contiene el 5% de suero de ternera fetal con la ayuda del kit de lipofectamine 2000 de Invitrogen.
2. Los sobrenadantes de cultivo se recolectan en los días 3 y 4, las proteínas producidas son purificadas y después su actividad de unión a las plaquetas se someten a ensayo con la ayuda de un agregómetro.

Plásmido 2 (*NVH001-B1*), 3 (*NVH001-B2*), 4 (*NVH001-C1*) y 5 (*NVH001-C2*) 1.

1. Los vectores *NVH001-B1*, *NVH001-B2*, *NVH001-C1* y *NVH001-C2* son transfectados de manera transitoria en unas células CHO-S hechas adherentes y cultivadas en un medio RPMI que contiene el 5% de suero de ternera fetal, con la ayuda del kit de lipofectamine 2000 de Invitrogen.

Los ARN de las células transfectadas son extraídos en los días 1, 2, 3, 4 y 5 mediante adición de 800 µl de TRIZOL (Invitrogen). Los ADNc correspondientes se obtienen por transcripción inversa a partir de 1 µg de ARN totales. Una amplificación por PCR se realizó sobre los ADNc. Los amplicones se detectaron después de la migración sobre un gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 125V. Se han realizado también un control positivo (plásmido transfectado) y un control negativo. El marcador de peso molecular (a la izquierda) permite verificar el tamaño de los amplicones.

Se observa la expresión en las células transfectadas del ARNm que codifica la proteína de la presente invención a partir del día 1. Esta expresión aumenta ligeramente con el tiempo y se mantiene después de 5 días. El seguimiento de la expresión de los ARNm está representado en la figura 1.

2. Los sobrenadantes de cultivo son recogidos en los días 3 y 4, las proteínas producidas son purificadas y después su actividad de unión a las plaquetas se somete a ensayo con la ayuda de un agregómetro.

3. Actividad biológica de la proteína de la presente invención: agregación plaquetaria

La actividad de unión de la proteína de la presente invención a las plaquetas se evalúa mediante agregometría. Una extracciones sanguíneas en tubo citrato, obtenidas de donantes sanos voluntarios después de firmar un consentimiento, son centrifugadas a 150 g, durante 15 minutos con el fin de obtener un plasma rico en plaquetas (PRP). La concentración se ajusta a 300 giga/l. Los ensayos de agregación se realizan con la ayuda de un tromboagregómetro Régulest[®], bajo agitación (1000 rpm) a 37°C. Esta técnica se basa en la lectura fotométrica según el método de Born, que consiste en medir la evolución de la transmisión luminosa de un medio turbio, el PRP, en respuesta a un activador de la función plaquetaria. En caso de formación de agregados plaquetarios, el medio se aclara y se observa un aumento de la transmisión luminosa. Se considera que una molécula tiene un efecto pro-agregante cuando se observa un aumento de más del 30% de esta transmisión asociada a una ruptura de la pendiente que corresponde a este aclaramiento.

La figura 2 representa la agregación plaquetaria inducida por un medio acondicionado de células CHO-S adherentes, transfectadas de manera transitoria, en presencia o no de epinefrina.

La mezcla de reacción está compuesta por 290 µl de PRP al que se añaden 30 µl de medio acondicionado en presencia o no de 0,1 µm de epinefrina. La medición de la respuesta plaquetaria se sigue durante 10 minutos. La autoagregación (-○-) define la línea de base. La adición de epinefrina a 0,1 µm induce un ligero desplazamiento de la línea de base, estable durante los 10 minutos (-●-). La adición de 30 µl de medio acondicionado induce una respuesta limitada (18%) después de 2 minutos (-∇-). Este desplazamiento es estable durante los 10 minutos de observación. La adición de epinefrina durante 2 minutos, seguida de la adición de 30 µl de medio acondicionado induce una agregación total de las plaquetas en 5 minutos (-▼-). Esta agregación no es reversible, lo cual sugiere que los agregados formados son estables.

La adición de 30 µl de medio acondicionado de células CHO-S adherentes no transfectadas no induce ninguna

agregación (resultado no presentado).

B. Producción estable por unas células de mamíferos

5 1. Construcciones de los vectores

Plásmido 1 (NVH001-A)

- 10 1. El conjunto intrón-NVH001-hGHpA se retira del vector construido para la expresión transitoria y se clona en un vector de producción que contiene un casete de higromicina que procede de pMono-hygro-mcs (Invivogen).
- 15 2. El vector final se secuencian para verificar que no se ha introducido ninguna mutación en el ADN de la proteína de interés y en los elementos aportados.
3. El vector linealizado se transfecta de manera estable en unas células CHO hechas adherentes con la ayuda del kit de lipofectamine 2000 de Invitrogen. Las células transfectadas se seleccionan por niveles progresivos de higromicina B.

20 La figura 3 representa la expresión de los ARN mensajeros que codifican para la proteína en un clon celular estable.

Los ARN de las células son extraídos en los días 1, 2, 3 y 4, mediante adición de 800 µl de TRIZOL (Invitrogen). Los ADNc correspondientes se obtienen por transcripción inversa a partir de 1 µg de ARN totales. Se realizó una amplificación por PCR sobre los ADNc con la ayuda de los cebadores 5'-AGCTGGCGCGCCGCCACCATG-3' (S) y 5'-GCTTCCGGGAGGCCCTGGCTTCCCATC-3' (AS). Los amplicones se detectan después tras la migración sobre un gel de agarosa al 2% durante 30 minutos a 125 V. Se utiliza un control positivo, que corresponde al ADN plasmídico. El marcador de peso molecular (a la derecha) permite verificar el tamaño de los amplicones. Se observa una expresión estable en el clon celular.

30 C. Producción en bacterias

1. Construcción

35 El ADN de la molécula de interés (NVH001) se amplifica por PCR sobre el vector pUC57-NVH001 con la ayuda de los cebadores tagNVH001-sentido: GCTGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGTGC GCCGGG-AGCTCCTGGAGAGAGAGGATTG y tagNVH001-antisentido: GCACGGATCCTATTAGCCAGGGCAAGGTC-CAGGGGCTC que permiten añadir un tag-6X histidina por el lado N-terminal de la proteína NVH001. Los productos PCR son clonados en el vector pET3d (pET3d-NVH001) que permiten la producción de la molécula en bacterias (New England Biolab).

40 La presencia y la secuencia correcta del ADN son verificadas por secuenciación.

2. Producción

- 45 1. El vector pET3d-NVH001 se transfecta en unas bacterias BL21 que permiten la producción en masa de proteína.
2. Las bacterias son inoculadas en 1 l de medio nutritivo y se incuban a 37°C hasta obtener una DO_{600nm} en la que las bacterias están en fase exponencial.
- 50 3. La producción de la proteína se induce mediante IPTG durante 5 horas a 30°C.
4. Las bacterias son sedimentadas, lisadas y la proteína de la presente invención se purifica en la fracción soluble (sobrenadante) e insoluble (cuerpo de inclusión) de las bacterias sobre unas columnas anti-tag-6Xhistidina de Macherey-nagel.
- 55

La figura 4 muestra la detección por transferencia Western de la presencia de la proteína-6X-histidina en las diferentes fracciones bacterianas obtenidas después de la purificación.

60 Se depositan 40 µl de cada fracción obtenida después de la elución de la columna anti-tag-6Xhistidina sobre un gel al 16% de poliacrilamida. La electroforesis se efectúa en un tampón de migración (192 mM de glicina, 25 mM de Tris-HCl, pH 6,8 y 0,1 de SDS) a 18 mA, en presencia de marcadores de peso molecular (Amersham) con la ayuda del sistema de migración Mini-Protean 3 (Biorad). Las proteínas separadas en el gel son transferidas sobre una membrana de PVDF (Biorad) durante 60 minutos a 70 V. Las fijaciones no específicas son bloqueadas por incubación de la membrana durante 120 minutos a 37°C y bajo agitación, en una disolución salina de Tris + 0,1% de Tween-20 (TBS-T) que contiene el 5% de leche desnatada. La membrana se incubaba después durante una noche a

65

4°C con un anticuerpo monoclonal anti-tag-6Xhistidina (Cell Signaling) diluido al 1/1000 en TBS-T. Después de 3 lavados de 5 minutos en TBS-T, la membrana se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente en un anticuerpo anti-ratón acoplado a la peroxidasa (Jackson Laboratories) diluido al 1/10000. La membrana se lava de nuevo tres veces durante 5 minutos en TBS. La revelación se obtiene mediante la técnica de quimioluminiscencia con la ayuda del kit ECL (Amersham).

Se observa la presencia de la proteína en las diferentes fracciones. La banda principal obtenida a un peso molecular de aproximadamente 19 kDa corresponde a la forma monomérica de la proteína. Se puede observar asimismo la presencia en ciertas fracciones de bandas que corresponden a proteínas de pesos moleculares 26, 43 y 60 kDa.

3. Demostración de su actividad biológica: agregación plaquetaria

La actividad de unión de la proteína de la presente invención a las plaquetas se evalúa por agregometría. Unas extracciones sanguíneas en tubo citrato, obtenidas de donantes sanos voluntarios después de firmar un consentimiento, se centrifugan a 150 g durante 15 minutos con el fin de obtener un plasma rico en plaquetas (PRP). La concentración se ajusta a 300 giga/l. Los ensayos de agregación se realizan con la ayuda de un tromboagregómetro Régulest[®], bajo agitación (1000 rpm) a 37°C. Esta técnica se basa en la lectura fotométrica según el método de Born, que consiste en medir la evolución de la transmisión luminosa a través del PRP, que es al principio un medio turbio, en respuesta a un activador plaquetario. En caso de formación de agregados plaquetarios, el medio se aclara y se observa un aumento de la transmisión luminosa. Se considera que una molécula tiene un efecto pro-agregante cuando se observa un aumento de más del 30% de esta transmisión asociada a una ruptura de la pendiente que corresponde a este aclaramiento.

La figura 5 muestra la agregación plaquetaria inducida por la proteína producida en la bacteria.

Las diferentes fracciones eluidas a partir de la columna anti-tag-6Xhistidina que contiene la proteína detectada por transferencia Western se agrupan y se obtiene un liofilizado por centrifugación. Una parte de este liofilizado se incuba en presencia del 0,25% de glutaraldehído durante 3 horas a 4°C y después se dializa durante una noche contra PBS 1X a 4°C antes de su utilización en agregometría.

La mezcla de reacción está compuesta por 290 µl de PRP al que se añaden 30 µl de PBS que contiene la proteína. La medición de la respuesta plaquetaria se sigue durante 25 minutos. Las líneas -○- y -∇- muestran la respuesta obtenida después de la adición de una disolución de PBS y de PBS-glutaraldehído dializado, respectivamente: no se observa ningún agregado. La adición de PBS que contiene la proteína no agregada por el glutaraldehído (-▼-) o agregada por el glutaraldehído y dializada (-●-) muestra una agregación importante 10 minutos después de su adición. Esta agregación alcanza respectivamente el 90% (-▼-) y el 100% (-●-) después de 20 minutos.

D. Producción de anticuerpos antiproteína de interés en el conejo

1. La proteína está producida en gran cantidad en unas bacterias BL21 como se ha descrito anteriormente.
2. Dos conejos son inmunizados 4 veces en 3 semanas de intervalo con la proteína purificada adicionada (v/v) de adyuvante de Freund, es decir a D0, D21, D42 y D63.
3. Los conejos son sacrificados al final del protocolo a D89 y se recuperan los sueros mediante centrifugación después del desangrado de los animales.
4. Los IgG son purificados por cromatografía de afinidad sobre una columna específica con el fin de eliminar las proteínas plasmáticas.

La figura 6 muestra la validación por transferencia Western de la especificidad del suero de conejo obtenido después de 89 días de inmunización.

Se depositan 10 µl de dos preparaciones de proteínas producidas en bacterias, cuya actividad pro-agregante se validó por agregometría, sobre un gel al 16% de poliacrilamida. La electroforesis se efectúa en un tampón de migración (192 mM de glicina, 25 mM de Tris-HCl, pH 6,8 y el 0,1% de SDS) a 18 mA, en presencia de marcadores de peso moleculares (Amersham) con la ayuda del sistema de migración Mini-protean 3 (Biorad). Las proteínas separadas en el gel son transferidas sobre una membrana de PVDF (Biorad) durante 60 minutos a 70 V. Las fijaciones no específicas son bloqueadas por incubación de la membrana durante 120 minutos a 37°C y bajo agitación, en una disolución salina de Tris + el 0,1% de Tween-20 (TBS-T) que contiene el 5% de leche desnatada. La membrana se incuba después durante una noche a 4°C o bien con suero de conejo, se extrae al día 89 del protocolo de inmunización y se diluye al 1/100, o bien con un anticuerpo monoclonal anti-tag-6Xhistidina (Cell Signaling) diluido al 1/100 en TBS-T. Después de 3 lavados de 5 minutos en TBS-T, la membrana se incuba durante 60 minutos a temperatura ambiente en un anticuerpo anti-ratón o anti-conejo acoplado a la peroxidasa (Jackson Laboratories) diluido al 1/10000. La membrana se lava de nuevo tres veces durante 5 minutos en TBS. La revelación

se obtiene mediante la técnica de quimioluminiscencia con la ayuda del kit ECL (Amersham).

La revelación muestra la presencia de una banda doble, presente en las dos preparaciones proteicas (A, pocillos 1 y 2), de un peso molecular de 60 kDa. Esta banda es detectada asimismo por el anticuerpo anti-tag-X6histina que muestra que se trata efectivamente de la proteína de la presente invención (B, pocillos 1 y 2). Cabe señalar que ya no se observan las otras bandas detectadas por el anticuerpo anti-tag-6Xhistina sobre las fracciones purificadas de bacterias. Este resultado sugiere que la inmunización fue eficaz sólo para la forma multimérica de la proteína de la presente invención o que la proteína de la presente invención se ensambla en un multímero una vez purificada.

10 **Referencias**

Asselin *et al.*, *Biochem J.* 15 de abril de 1999; 339 (Pt 2): 413-8
 Born *et al.*, *Nature* junio de 1962, 194: 927-9
 Boudko y Engel, *J Mol Biol.* 30 de enero de 2004; 335(5): 1289-97
 15 Bulleid *et al.*, *EMBO J.* 17 de noviembre de 1997; 16(22): 6694-701
 Bulleid *et al.*, *Biochem J.* 1 de julio de 1996; 317 (Pt 1): 195-202
 Farndale *et al.*, *Biochem Soc Trans.* abril de 2008; 36 (Pt 2): 241-50
 Hulmes DJ, *J Struct Biol.* Enero-febrero de 2002; 137(1-2): 2-10
 Jarvis *et al.*, *Blood.* 15 de mayo de 2008; 111(10): 4986-96
 20 Kim *et al.*, *J Biol Chem.* 16 de septiembre de 2005; 280(37): 32512-20
 Lisman T *et al.*, *Blood.* 1 de diciembre de 2006; 108(12): 3753-6
 McAlinden *et al.*, *J Biol Chem.* 24 de octubre de 2003; 278(43): 42200-7
 Monnet E *et al.*, *J Biol Chem.* 14 de abril de 2000; 275(15): 10912-7
 Morton *et al.*, *Biochem J.* 1 de marzo de 1995; 306 (Pt 2): 337-44
 25 Olsen *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev.* 28 de noviembre de 2003; 55(12): 1547-67
 Pires *et al.*, *Eur J Med Chem.* mayo de 2007; 42(5): 694-701
 Raynal *et al.*, *J Biol Chem.* 17 de febrero de 2006; 281(7): 3821-31
 Ruggiero y Koch, *Methods.* mayo de 2008; 45(1): 75-85
 Smethurst *et al.*, *J Biol Chem.* 12 de enero de 2007; 282(2): 1296-304
 30 Verkleij *et al.*, *Blood.* 15 de mayo de 1998; 91(10): 3808-16

Listado de secuencias

- 35 <110> Centre Hospitalier Universitaire Dijon VANDROUX, David DE MAISTRE, Emmanuel PROST, Edouard
 <120> Proteínas recombinantes con actividad hemostática capaces de inducir la agregación plaquetaria
 <130> D26270
 40 <150> FR 0856423
 <151> 24/09/2008
 <160> 8
 45 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 152
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Proteína recombinante colIII-like
 55 <400> 1

ES 2 419 657 T3

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

5 <210> 2
 <211> 459
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia que codifica la proteina recombinante colVIII-like

<400> 2

atgatgagct tcgtgcagaa ggggagctgg ctgcttctcg ctctgcttca tctactatt 60
 atcctggcac aggggcgccc cggagctcct ggagagagag gattgcctgg acctccaggg 120
 cccagaggag ctgctggaga acctggcaga gatggcgtcc ctggaggacc aggaatgagg 180
 ggcattgccc gaagcccagg aggaccagga agcgatggga agccagggcc tcccgaagc 240
 cagggagaaa gcggcagacc aggacctcct ggagagaacg gaaagcctgg agaaccaggc 300
 ccaaaggag atgccggacc acctggccca ccaggccctc ccggaccacc tggacctcca 360
 ggcctcctg gcctcctgg acctcctgga ccacctggac ctccaggccc aagaggcgac 420
 aaggacctc ctggagcccc tggaccttgc cctggctaa 459

15 <210> 3

ES 2 419 657 T3

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador S

<400> 3

10 agctggcgcg cgcaccat g 21

<210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador AS

20 <400> 4

gctccggga ggcctggct tccatc 27

<210> 5
 25 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Cebador tagNVH001-sentido

<400> 5

gctgccatgg gcagcagcca tcatcatcat catcacggtc gcccgggagc tcctggagag 60

agaggattg 69

35 <210> 6
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Cebador tagNVH001-antisentido

<400> 6

45 gcacggatcc tattagccag ggcaaggctc aggggctc 38

<210> 7
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido motivo

55 <400> 7

Gly Ala Pro Gly Glu Arg 15

60 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido motivo

5 <400> 8

Lys Pro Gly Glu Pro Gly Pro Lys
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado, caracterizado porque tiene la secuencia del polipéptido de la SEC ID nº 1 o del polipéptido de la posición 25 a la posición 152 de la SEC ID nº 1.
- 10 2. Polipéptido aislado, caracterizado porque:
- presenta por lo menos el 70% de identidad en toda su longitud con el polipéptido de la SEC ID nº 1 o con el polipéptido de la posición 25 a la posición 152 de la SEC ID nº 1,
 - es capaz de inducir una agregación de las plaquetas sanguíneas humanas superior al 30% en un tromboagregómetro a 37°C con una agitación de 1000 rpm.
- 15 3. Polipéptido aislado según la reivindicación 2, caracterizado porque comprende por lo menos los motivos peptídicos siguientes:
- GX_1X_2GER en la que X_1 y X_2 representan independientemente un aminoácido seleccionado de entre A, R, N, D, Q, E, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V y O;
 - 20 - $(GPX_3)_n$, estando n comprendido entre 4 y 10, y X_3 representa P u O;
 - $GPRGQX_4GVMGF_5$ en la que X_4 y X_5 representan independientemente P u O.
- 25 4. Polipéptido aislado según la reivindicación 2, caracterizado porque comprende por lo menos los motivos peptídicos siguientes:
- GAPGER,
 - KPGEPGPK,
 - 30 - $(GPP)_n$, estando n comprendido entre 4 y 10,
 - RGD.
5. Polinucleótido aislado, caracterizado porque codifica para un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 6. Polinucleótido aislado según la reivindicación 5, caracterizado porque tiene la secuencia del polinucleótido de la SEC ID nº 2.
7. Casete de expresión que comprende, en el sentido de la transcripción:
- 40 - un promotor funcional en un organismo hospedante,
 - un polinucleótido según una de las reivindicaciones 5 a 6,
 - una secuencia terminadora funcional en el mismo organismo hospedante.
- 45 8. Vector caracterizado, porque comprende un polinucleótido según una de las reivindicaciones 5 a 6 y/o un casete de expresión según la reivindicación 7.
9. Organismo hospedante, con la exclusión del ser humano, transformado con un polinucleótido según una de las reivindicaciones 5 a 6, un casete de expresión según la reivindicación 7 y/o un vector según la reivindicación 8.
- 50 10. Composición para su utilización como medicamento, caracterizada porque comprende un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 4, un polinucleótido según una de las reivindicaciones 5 a 6, un casete de expresión según la reivindicación 7, un vector según la reivindicación 8 y/o un organismo hospedante según la reivindicación 9.
- 55 11. Composición para su utilización como medicamento según la reivindicación 10 para el tratamiento de las enfermedades trombóticas.
- 60 12. Composición para su utilización como medicamento según la reivindicación 10 para el tratamiento de los trastornos de la hemostasis.
13. Composición según la reivindicación 10 para su utilización como agente cicatrizante.
14. Composición cosmética, caracterizada porque comprende un polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 4.

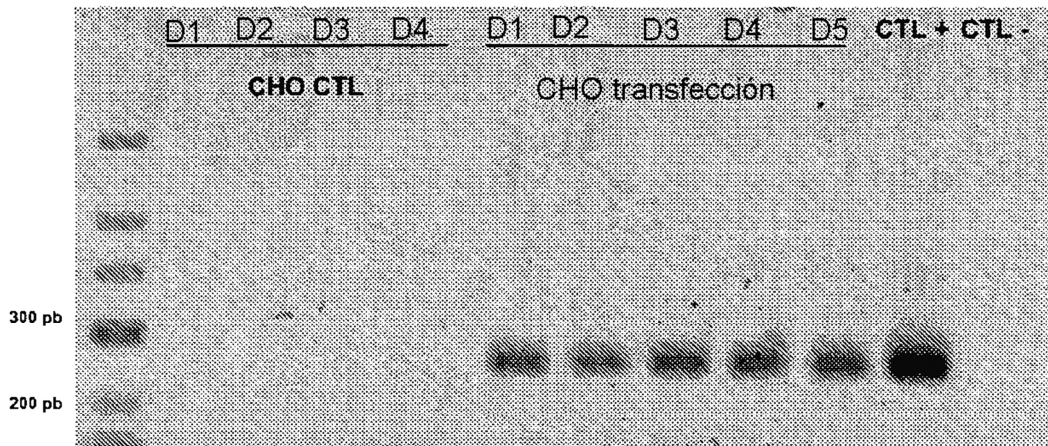


FIG. 1

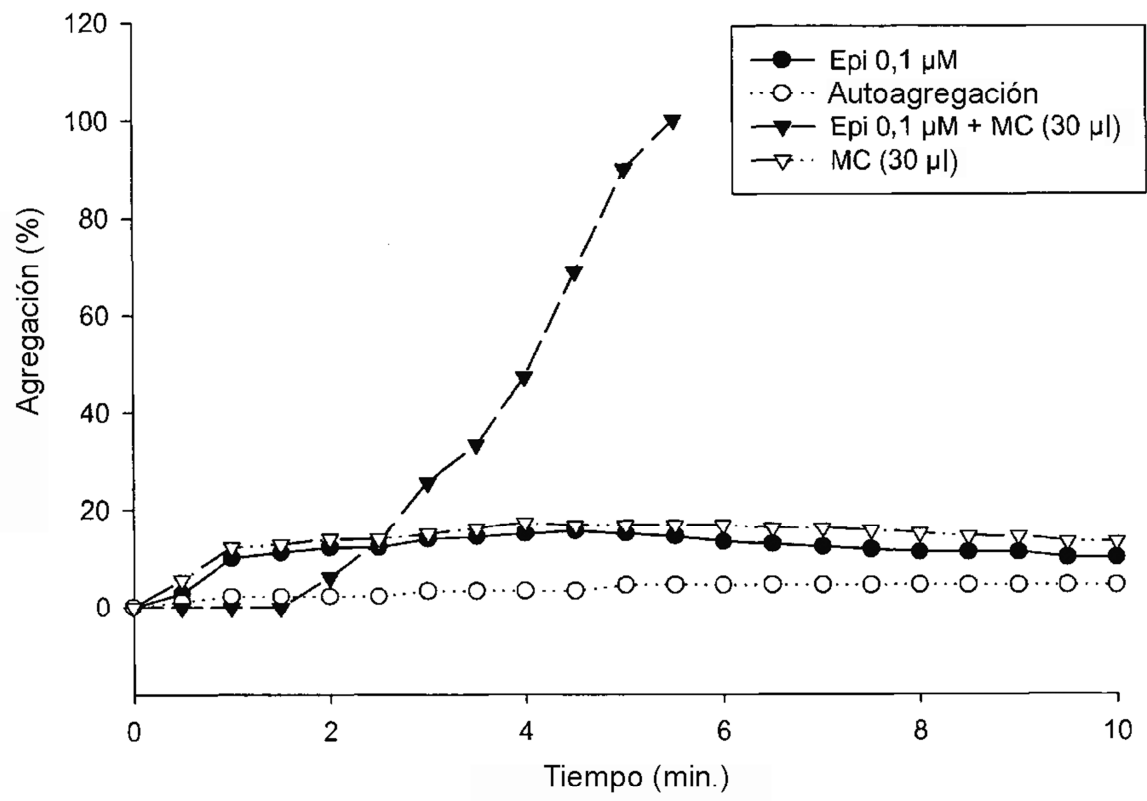


FIG. 2

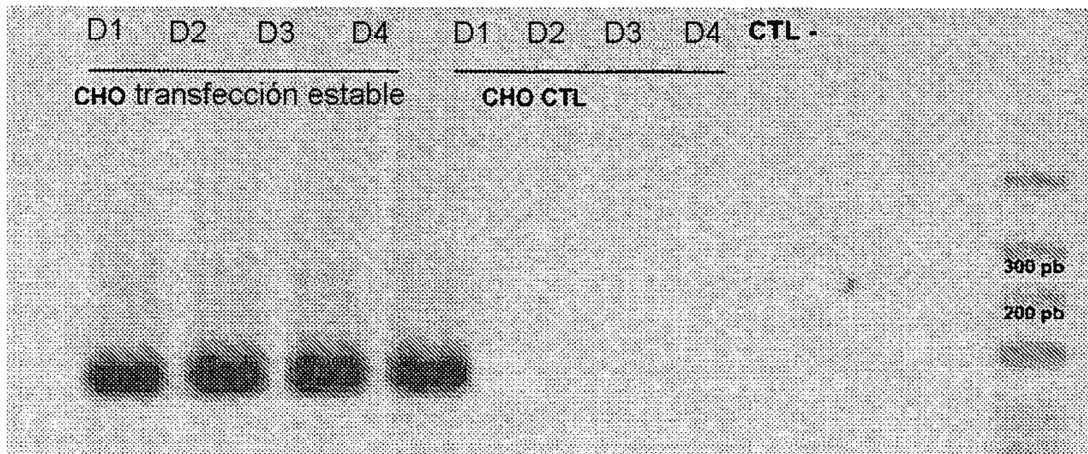


FIG. 3

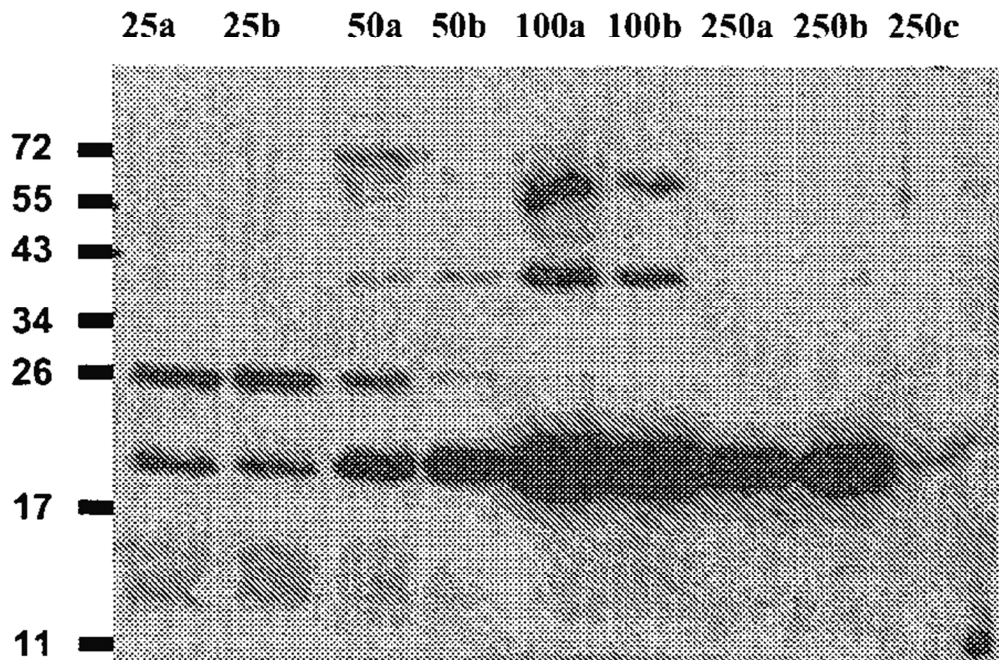


FIG. 4

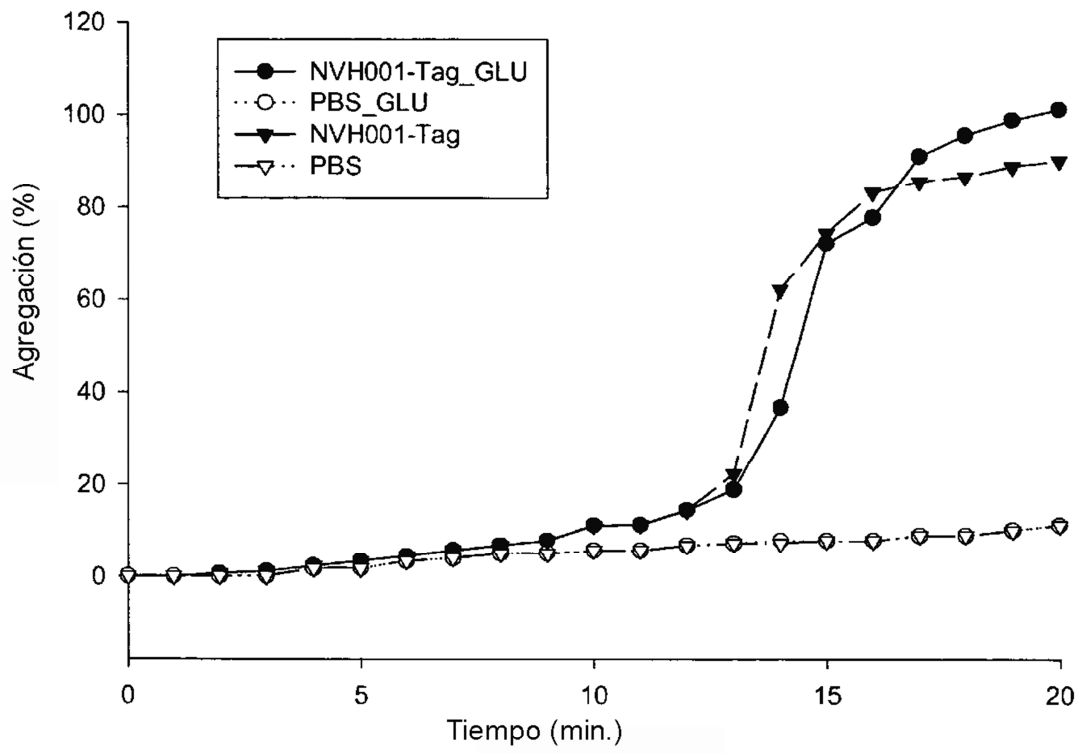


FIG. 5

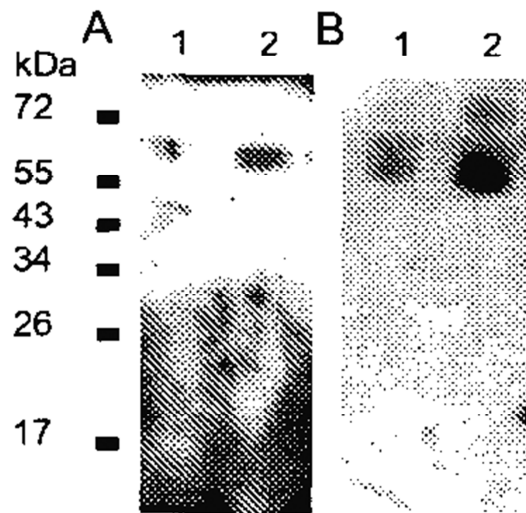


FIG. 6