



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 367 039**

⑤① Int. Cl.:
C07K 14/65 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 38/29 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **06717668 .5**
⑨⑥ Fecha de presentación : **06.01.2006**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1833847**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

⑤④ Título: **Polipéptidos de fusión IGF-1 y usos terapéuticos de los mismos.**

③⑩ Prioridad: **07.01.2005 US 642229 P**
25.02.2005 US 656583 P

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.10.2011

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.10.2011

⑦③ Titular/es: **REGENERON PHARMACEUTICALS, Inc.**
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591, US

⑦② Inventor/es: **Glass, David, J.;**
Yancopoulos, George, D.;
Daly, Thomas, J. y
Papadopoulos, Nicholas, J.

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 367 039 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

Polipéptidos de fusión IGF-1 y usos terapéuticos de los mismos

5 **Antecedentes****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a polipéptidos del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF1) y del factor de crecimiento 2 similar a la insulina (IGF2), a procedimientos de producir dichos polipéptidos y a procedimientos terapéuticos para administrar dichos polipéptidos.

Descripción de la técnica relacionada

15 Loas factores de crecimiento similar a la insulina (IGF) constituyen una familia de proteínas que tienen propiedades estimulantes del crecimiento similares a las de la insulina. Los IGF muestran una estrecha homología estructural con la proinsulina y provocan efectos biológicos similares. El IGF1 humano (también conocido como somatomedina C) es un péptido básico de 70 aa (pi 8,4) que tiene las secuencias proteicas y de ADN que se muestran en las SEC ID N° 1-2 que tiene una homología del 43 % con la proinsulina (Rinderknecht y col. (1978) J. Biol. Chem. 253:2769-2776).
20 El IGF2 es un péptido básico de 67 aminoácidos que tiene las secuencias proteicas y de ADN que se muestran en las SEC ID N° 3-4. Las proteínas de unión específicas de alto peso molecular que tienen una capacidad de unión muy alta por IGF1 e IGF2 actúan como proteínas transportadoras o como moduladores de las funciones de IGF1 (Holly y col. (1989) J. Endocrinol. 122:611-618).

25 El IGF1 y el IGF2 y variantes de los mismos se han usado para tratar seres humanos que sufren deficiencias de hormona de crecimiento, emaciación tisular, incluidas quemaduras, traumatismos esqueléticos, infección, cáncer, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne, distrofia de Becker, distrofia recesiva autosómica, polimiositis, así como miopatías y SIDA (patente de EE.UU. n° 5.622.932).

30 **Breve resumen de la invención**

En el presente documento se describen composiciones y procedimientos que proporcionan moléculas variantes de IGF1 e IGF2 a un sujeto que lo necesite. Más específicamente, en el presente documento se describen polipéptidos de fusión que comprenden variantes de IGF1 e IGF2 terapéuticas o análogos de los mismos fusionados a un
35 componente de fusión (F). La presente invención proporciona una proteína de fusión, que comprende: (a) al menos un componente polipeptídico variante de IGF1; y (b) un componente de fusión que comprende el dominio Fc de la IgG humana, en el que el componente variante de IGF es una proteína IGF-1 humana de SEC ID N° 1, que comprende una delección de los aminoácidos en las posiciones 1-3 y 37 ($\Delta 1-3$, $\Delta 37$). Los polipéptidos de fusión de la invención son capaces de permanecer terapéuticamente activos y disponibles durante un periodo más prologado de
40 tiempo CPU la molécula natural y aguantan la inactivación por una proteína de unión del IGF. Los polipéptidos de fusión de la invención también se pueden usar en diversos ensayos diagnósticos y pronósticos *in vivo* e *in vitro*.

En el presente documento también se describe un polipéptido de fusión IGF1, que comprenden (a) al menos un
45 componente variante de IGF1, (b) un componente de fusión (F) y, opcionalmente, (c) una secuencia señal, en la que el componente variante de IGF1 es la proteína IGF1 humana de la SEC ID N° 1, que comprende (i) una modificación del extremo C seleccionada del grupo constituida por delección de 3 a 6 aminoácidos, por ejemplo, 68-70($\Delta 68-70$), $\Delta 67-70$, $\Delta 66-70$, $\Delta 65-70$, delección de Lys68($\Delta 68$), sustitución del aminoácido 68 por otro aminoácido, delección de los aminoácidos 65-70($\Delta 65-70$), delección de Lys65($\Delta 65$), y sustitución del aminoácido 65 por otro aminoácido; (ii) una modificación del extremo N seleccionada del grupo constituido por la delección de los aminoácidos 1-3 ($\Delta 1-3$) y
50 sustitución de Glu3 por un aminoácido diferente y/o (iii) una modificación en Arg36 y/o Arg37 seleccionada del grupo constituido por la delección de Arg36 ($\Delta 36$), delección de Arg37 ($\Delta 37$), sustitución de Arg36 por un aminoácido diferente, por ejemplo Arg36Ala y sustitución de Arg37 por un aminoácido diferente, por ejemplo Arg37Ala. En una realización específica, la proteína de fusión de IGF1 tiene una delección de los aminoácidos 1-3 y Arg37 (2D-IGF1-Fc)($\Delta 1-3$, Δ Arg37). En otra realización específica, la proteína de fusión de IGF1 tiene una delección de los
55 aminoácidos 1-3, Arg37 y los aminoácidos 68-70 (3D-IGF1-FC)($\Delta 1-3$, Δ Arg37, $\Delta 68-70$).

En el presente documento se describe adicionalmente un polipéptido de fusión IGF2, que comprenden (a) al menos un
60 componente variante de IGF2, (b) un componente de fusión (F) y, opcionalmente, (c) una secuencia señal, en la que el componente variante de IGF es la proteína IGF2 humana de la SEC ID N° 3, que comprende (i) una modificación del extremo C seleccionada del grupo constituida por delección de 3 aminoácidos, por ejemplo, 65-67($\Delta 65-67$), delección de Lys65($\Delta 65$) y sustitución del aminoácido 65 por otro aminoácido; (ii) una modificación del extremo N seleccionada del grupo constituido por la delección de los aminoácidos 1-6 ($\Delta 1-6$) y sustitución de Glu6 por un aminoácido diferente y/o (iii) una modificación en Arg37 y/o Arg38 seleccionada del grupo constituido por la delección de Arg37 ($\Delta 37$), delección de Arg38 ($\Delta 38$), sustitución de Arg37 por un aminoácido diferente, por ejemplo
65 Arg37Ala y sustitución de Arg38 por un aminoácido diferente, por ejemplo Arg38Ala.

El componente de fusión (F) descrito en el presente documento es cualquier componente que potencia la funcionalidad del polipéptido de fusión. Por tanto, por ejemplo, un F puede potenciar la actividad biológica del polipéptido de fusión, ayudar en su producción y/o recuperación o potenciar una propiedad farmacológica o el perfil farmacocinético del polipéptido de fusión, por ejemplo, potenciando su semivida en suero, la penetrabilidad tisular, la falta de inmunogenicidad o la estabilidad. El componente de fusión puede permitir que el componente variante de IGF evada las proteínas de unión en suero que pueden secuestrar el IGF en un compartimento menos biológicamente activo.

En realizaciones preferidas descritas en el presente documento, F es un componente multimerizante del grupo constituido por (i) una secuencia de aminoácidos de una longitud entre 1 a aproximadamente 500 aminoácidos, que opcionalmente comprende al menos un residuo de cisteína, (ii) una cremallera de leucina, (iii) un motivo de bucle en hélice, (iv) un motivo hélice-hélice y (v) un dominio de inmunoglobulina. El componente de fusión puede comprender un dominio derivado de inmunoglobulina de, por ejemplo, IgG, IgM o IgA humana. En realizaciones específicas, el dominio derivado de inmunoglobulina se selecciona del grupo constituido por el dominio Fc y la cadena pesada de la IgG. El dominio Fc de la IgG puede seleccionarse de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo.

En el presente documento también se describe un polipéptido de fusión de IGF1, que comprende (i) un componente variante de IGF1 que comprende la proteína IGF1 humana de la SEC ID N° 1 que comprende delección de los aminoácidos 1-3 (Δ 1-3 o del GPE), delección de Arg36 (Δ 36) y delección de 3-6 aminoácidos del extremo C (Δ 68-70), (ii) un dominio Fc de una IgG y, opcionalmente, (iii) una secuencia señal.

Otra realización específica descrita en el presente documento es un polipéptido de fusión IGF2, que comprende (i) un componente variante de IGF2 que comprende la proteína IGF2 humana de la SEC ID N° 3 que comprende delección de los aminoácidos 1-6 (Δ 1-6 o de IAYRPSE), delección de Arg37 (Δ 37) y una delección de 3 aminoácidos en el extremo C (Δ 65-67), (ii) un dominio Fc de una IgG y, opcionalmente, (iii) una secuencia señal.

En otras realizaciones descritas en el presente documento, el componente de fusión (F) es un ligando dirigido, o derivado o fragmento del mismo, capaz de unirse específicamente a una proteína de superficie celular preseleccionada y, de este modo, de liberar dicho IGF1 o IGF2 en una célula diana, por ejemplo una célula muscular. En realizaciones específicas, el componente dirigido es el ligando MuSK, o un fragmento del ligando MuSK, capaz de unirse al receptor MuSK. En realizaciones específicas, el ligando específico de MuSK es agrina o un fragmento o derivado de la misma capaz de unirse a MuSK, o un anticuerpo anti-MuSK o fragmento o derivado del mismo, incluido, por ejemplo, un scFv. En otras realizaciones específicas, el ligando dirigido a músculo del polipéptido de fusión dirigida a músculo comprende tres o más dominios extracelulares de caderina muscular (M-caderina) o derivados o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente a células musculares u otras células que expresan caderinas musculares homófilas. En una realización específica, el ligando dirigido a músculo consiste esencialmente en los primeros tres (3) o cuatro (4) dominios extracelulares en N-terminal de M-cadherina.

En otras realizaciones descritas en el presente documento, el componente de fusión (F) es otro compuesto activo, que puede ser cualquier agente que es deseable liberar en un sitio preseleccionado para fines terapéuticos. En realizaciones específicas, el agente activo o terapéutico es un ligando para un segundo receptor de superficie celular y es capaz de unirse y activar un segundo receptor. En otras realizaciones, el agente activo o terapéutico es un agente capaz de bloquear la actividad de otro agente que es activo sobre la célula diana. En una realización específica, el agente activo o terapéutico se selecciona del grupo constituido por IL-15, miotrofina urocortina, urocortina II, un IGF1 o IGF2 natural o mutante, insulina, el dominio pro de miostatina, hGH, proliferina, follistatina, FSTL1 y FLRG, y fragmentos biológicamente activos de los mismos.

El polipéptido o polipéptido de fusión de la invención puede además codificar opcionalmente un componente secuencia señal (SS). Cuando una SS es parte del polipéptido, se puede usar cualquier SS conocido en la técnica, incluidas las secuencias sintéticas o naturales de cualquier fuente, por ejemplo de una proteína unida a la membrana o secretada. En general, una secuencia señal se coloca al principio del extremo amino del polipéptido de fusión de la invención.

Los componentes de los polipéptidos de fusión de la invención pueden conectarse directamente entre sí o conectarse a través de una o más secuencias espaciadoras. En una realización preferida, los componentes se fusionan directamente entre sí. En otra realización preferida, los componentes están conectados a través de un espaciador de 1-200 aminoácidos. Cualquier espaciador conocido en la técnica se puede usar para conectar los componentes polipeptídicos. Una secuencia espaciadora puede también incluir una secuencia usada para potenciar la expresión del polipéptido de fusión, proporcionar sitios de restricción, permitir dominios de componente para formar estructuras óptimas terciarias y cuaternarias y/o para potenciar la interacción de un componente con su receptor. En una realización, el polipéptido de fusión de la invención comprende una o más secuencias peptídicas entre uno o más componentes que está(n) entre 1-25 aminoácidos.

Los componentes del polipéptido de fusión de la invención se pueden disponer en diversas configuraciones y

pueden comprender más de un polipéptido variante de IGF, por ejemplo IGF-F; IGF-IGF-F; IGF-F-IGF; F-IGF; F-IGF-IGF, etc. No obstante, cuando F es un Fc, Fc debe estar en el extremo C del polipéptido de fusión. De forma similar, en las fusiones que comprenden un segundo componente activo, tal como la hormona de crecimiento humana (hGH), la configuración debe ser la hGH variante de IGF.

5 En un segundo aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de la invención.

10 En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una molécula ácido nucleico de la invención. En un cuarto y un quinto aspecto, la invención abarca vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico de la invención, incluidos vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico unidas operativamente a una secuencia de control de la expresión, y sistemas huésped-vector para la producción de un polipéptido de fusión que comprende el vector de expresión en una célula huésped adecuada; los sistemas huésped-vector en los que la célula huésped adecuada es, sin limitaciones, una célula bacteriana, de levaduras, de insectos o de mamífero. Ejemplos de células adecuadas incluyen células de *E. coli*, *B. subtilis*, BHK, COS y CHO. Además también se abarcan polipéptidos de fusión de la invención modificados mediante acetilación o regulación. Los procedimientos para acetilar o pegilar una proteína son bien conocidos en la técnica.

20 En un sexto aspecto relacionado, la invención ofrece un procedimiento de producir un polipéptido de fusión de la invención, que comprende cultivar una célula huésped transfeccionada con un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de la célula huésped y recuperar el polipéptido producido de este modo.

25 En un séptimo aspecto, la invención proporciona una proteína de fusión de la invención para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal. La invención además proporciona una proteína de fusión para usar en un procedimiento terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de atrofia muscular, enanismo, infarto de miocardio, osteoporosis, debilidad o fragilidad relacionada con la edad, sarcopenia, una enfermedad o afección que implica pérdida de masa corporal, caquexia, insuficiencia congestiva cardíaca, talasemia, diabetes, hiperglucemia y anemia, o para el tratamiento de un sujeto en riesgo para el desarrollo de dicha enfermedad o afección. La invención proporciona adicionalmente un uso de una proteína de fusión de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada de atrofia muscular, enanismo, infarto de miocardio, osteoporosis, debilidad o fragilidad relacionada con la edad, sarcopenia, una enfermedad o afección que implica pérdida de masa corporal, caquexia, insuficiencia congestiva cardíaca, talasemia, diabetes, hiperglucemia y anemia, o para el tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar dicha enfermedad o afección. En el presente documento también se describen procedimientos terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o afección, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión IGF de la invención a un sujeto que lo necesite o a un sujeto en riesgo de desarrollar dicha enfermedad o afección. Cuando la enfermedad o afección es una afección muscular, tal como atrofia, el procedimiento terapéutico descrito en el presente documento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión IGF de la invención a un sujeto que lo necesite, en el que la enfermedad o afección se mejora o inhibe. La afección o trastorno relacionado con los músculos puede proceder de una serie de fuentes, incluidas, por ejemplo: desnervación; neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria; atrofia muscular espinal infantil y juveniles; neuropatía motora autoinmunitaria; por enfermedad crónica, incluida la caquexia resultante de cáncer, SIDA, ayuno o rabdomiólisis; y por síndromes de distrofia muscular tal como el síndrome de Duchenne. Los procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento son útiles para tratar cualquier afección que sea el resultado de una deficiencia de IGF o que puede mejorarse mediante niveles elevados de IGF, incluidas enanismo y cardiopatía, por ejemplo mejora de la supervivencia del tejido cardíaco tras infarto de miocardio.

50 De acuerdo con esto, en un octavo aspecto, la invención ofrece composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden comprender las proteínas de fusión o ácidos nucleicos que las codifican, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Otros objetos y ventajas se pondrán de manifiesto a partir de una revisión de la descripción detallada siguiente.

Breve descripción de las figuras

60 La Figura 1 es un gráfico que muestra la concentración en suero de variantes de IGF1 2D-IGF1-Fc (□) o 3D-IGF1-Fc (■) en ratones CD-1 a 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas (n= 5 por grupo) (Media ± SEM).

Descripción detallada

65 Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno”, “una” y “el/la” incluyen las referencias en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, las referencias al “un procedimiento” incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo descrito en el

presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de esta divulgación, y así sucesivamente.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. Aunque en la práctica o análisis de la presente invención se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos y materiales preferidos.

10 Descripción general

La presente divulgación abarca polipéptidos de fusión y ácidos nucleicos que los codifican, que comprenden uno o más componentes variantes de IGF y un componente de fusión (F), que puede comprender un componente multimerizante, un componente dirigido y/o uno o más agente(s) activo(s) o terapéutico(s) adicional(es).

15 Definiciones

Fragmentos “biológicamente activos” o derivados de un componente de los polipéptidos de fusión de la invención abarcan cualquier molécula natural o mutante o derivado de la misma capaz de conseguir el efecto deseado en el sitio diana. Por ejemplo, en el presente documento se describen variantes de IGF1, que tienen propiedades mejoradas de actividad y estabilidad. La invención prevé el uso de un mutante o derivado de las moléculas de IGF1 descritas en el presente documento que son capaces de unirse al receptor de IGF1. Un fragmento “biológicamente activo” o derivado de cualquier componente dirigido es una porción o mutante del mismo capaz de unirse a la célula diana. Por tanto, por ejemplo, cuando el ligando dirigido es agrina, un fragmento biológicamente activo o derivado es cualquier porción o mutante de agrina capaz de unirse al receptor de MuSK.

Los términos “tratamiento”, “tratar” y similares se usan en el presente documento para querer decir, en general, obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad, afección o síntomas de los mismos y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad o afección y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad o afección. Como se usa en el presente documento, “tratamiento” cubre cualquier tratamiento de una enfermedad o afección en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) prevenir la aparición de la enfermedad o afección en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o afección pero al que todavía no se le ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener su desarrollo; o (c) aliviar la enfermedad o afección, es decir, causar la regresión de la enfermedad o afección. La población de sujetos tratados mediante el procedimiento de la enfermedad incluye sujetos que sufren una enfermedad o afección no deseada, así como sujetos en riesgo de desarrollar la enfermedad o afección.

Con la expresión “dosis terapéuticamente eficaz” se quiere decir una dosis que produce el efecto deseado para el que se administra. La dosis exacta dependerá de los objetivos del tratamiento y un experto en la técnica la podrá determinarla usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

Como se usa en el presente documento, una “enfermedad o afección” abarca, en general, una afección de un huésped mamífero, en particular un huésped humano, que no es deseada y/o perjudicial para el huésped. Por tanto, tratar una afección relacionada con los músculos con un polipéptido de fusión específicamente dirigido al músculo esquelético abarcará el tratamiento de un mamífero, en particular un ser humano, que tenga síntomas que reflejen la disminución de la activación del receptor del músculo diana o que cabe esperar que tenga dichos niveles disminuidos en respuesta a una enfermedad, afección o régimen terapéutico. Tratar una afección o enfermedad relacionada con los músculos abarca el tratamiento de un sujeto humano en el que potenciar la activación de un receptor muscular diana con el polipéptido de fusión específico del músculo de la invención tiene como resultado la mejora de un síntoma no deseable resultante de la enfermedad o afección relacionada con los músculos. Como se usa en el presente documento, una “afección relacionada con los músculos” también incluye una afección en la que es deseable alterar, bien transitoriamente o a largo plazo, la activación de un receptor muscular diana concreto.

55 Componente variante de IGF1 o IGF2

El primer componente de los polipéptidos descritos en el presente documento es una variante de IGF1 o de IGF2 (“variante de IGF”). En el caso de IGF1, dichas variantes comprenden IGF1 humano maduro (SEC ID N° 1) que tiene las modificaciones siguientes: (i) una deleción de 3-6 aminoácidos en el extremo C, por ejemplo Lys65 a Ala70; (ii) una modificación en el extremo N seleccionada del grupo constituido por la deleción de los aminoácidos 1-3 y la sustitución de Glu3 con un aminoácido diferente, tal como alanina, valina, histidina o arginina, por ejemplo Glu3Arg o Glu3Ala, y/o (iii) una modificación en Arg36 y/o Arg37 seleccionada del grupo constituido por deleción de Arg36, deleción de Arg37, sustitución de Arg36 con un aminoácido diferente, por ejemplo Arg36Ala, y sustitución de Arg37 con un aminoácido diferente, por ejemplo Arg37Ala.

En el caso de IGF2, dichas variantes comprenden la proteína IGF2 humana de la SEC ID N° 3, que comprende (i) una modificación del extremo C seleccionada del grupo constituida por delección de 3 aminoácidos, por ejemplo, 65-67(Δ 65) y sustitución del aminoácido 65 por otro aminoácido; (ii) una modificación del extremo N seleccionada del grupo constituido por la delección de los aminoácidos 1-6 (Δ 1-6) y sustitución de Glu6 por un aminoácido diferente, tal como alanina, valina, histidina o arginina, por ejemplo Glu6Arg o Glu6Ala; y/o (iii) una modificación en Arg37 y/o Arg38 seleccionada del grupo constituido por la delección de Arg37 (Δ 37), delección de Arg38 (Δ 38), sustitución de Arg37 por un aminoácido diferente, por ejemplo Arg37Ala y sustitución de Arg38 por un aminoácido diferente, por ejemplo Arg38Ala.

Dichas modificaciones previenen la escisión del componente de fusión de la variante IGF1 o IGF2, de modo que se potencia su estabilidad y semivida.

Componente ligando dirigido

En algunas realizaciones, el componente de fusión de los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento es un ligando dirigido. Un ligando dirigido es una molécula, por ejemplo una proteína o fragmento de la misma que se une específicamente con afinidad elevada a una diana sobre una célula preseleccionada, tal como una proteína de superficie, tal como un receptor, que está presente en mayor grado sobre la diana celular preseleccionada que sobre cualquier otro tejido corporal. Por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. 5.814.478 y 6.413.740, el receptor MuSK es altamente específico del músculo. De acuerdo con esto, el ligando afin agrina, así como las porciones de unión a MuSK de la misma, es un ejemplo de un ligando dirigido útil como un componente de fusión en los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento. Otro ejemplo de un ligando dirigido es un grupo de dominios de caderina de una caderina humana. De acuerdo con esto, los dominios de caderina humana de, por ejemplo, caderina de músculo humano, se pueden usar para dirigir los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento a las células musculares diana. El componente ligando dirigido del polipéptido de fusión descrito en el presente documento puede incluir un ligando natural o sometido a ingeniería, o un fragmento del mismo, capaz de unirse a la célula diana preseleccionada.

En otra realización específica descrita en el presente documento, el componente ligando dirigido de los polipéptidos de fusión dirigidos consta de al menos tres, cuatro o cinco dominios de caderina muscular (caderina M) o derivados o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente a las células diana que expresan cadherinas homófilas. (Shimoyama y col. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 (16): 10011-10018; Shibata y col. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(8):5236-5270). En realizaciones preferidas, el polipéptido de fusión descrito comprende al menos tres dominios de caderina del dominio extracelular de la caderina M humana (o fragmentos biológicamente activos o derivados de los mismos que son capaces de unirse a la cadherina-M homófila) fusionado al componente variante de IGF1.

Otros ejemplos de ligandos dirigidos también incluyen, entre otros, anticuerpos y porciones de los mismos que se unen a una proteína de superficie de células preseleccionadas con alta afinidad. Por "alta afinidad" se quiere decir una constante de disociación en equilibrio de al menos 10^{-7} molar, determinada mediante procedimientos de ensayo conocidos en la técnica, por ejemplo análisis BiaCore. En una realización, el componente ligando dirigido de los polipéptidos de fusión dirigidos descritos en el presente documento también puede comprender uno o más dominios de unión de inmunoglobulina aislados de anticuerpos generados contra una proteína seleccionada de superficie específica de tejido o un receptor específico de tejido diana. El término "inmunoglobulina o anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de mamífero, incluido un ser humano, que comprende una región armazón de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de la misma que se une específicamente y reconoce un antígeno, que, en el caso de la presente invención, es una proteína de superficie específica de tejido, un receptor específico de tejido diana o una porción de los mismos. Si el polipéptido de fusión dirigido previsto se usa como terapéutica para mamíferos, las regiones de unión de inmunoglobulina deberán derivar de las correspondientes inmunoglobulinas de mamífero.

Si el polipéptido de fusión dirigido está indicado para un uso no terapéutico, tal como para diagnóstico y ELISA, las regiones de unión de inmunoglobulina deberán derivar de mamíferos humanos o no humanos, tales como ratones. Los genes de inmunoglobulina humana o fragmentos génicos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, que, a su vez, definen las clases de inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de la clase IgG hay diferentes isotipos (p. ej., IgG₁, IgG₂, etc.). Normalmente, la región de unión a antígeno de un anticuerpo será la más crucial en la determinación de la especificidad y afinidad de la unión.

Una unidad estructura de inmunoglobulina (anticuerpo) de ejemplo de la IgG humana comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en el que cada par tiene una cadena ligera (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena pesada (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Las expresiones "cadena ligera variable" (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refiere a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos mediante digestión con varias peptidasas. Por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los puentes disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H mediante un puente disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, de modo que el dímero $F(ab)'_2$ se convierte en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra. Aunque varios fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto en la técnica apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse de novo bien químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, los términos inmunoglobulina o anticuerpo, como se usan en el presente documento, también incluyen fragmentos de anticuerpos bien producidos mediante la modificación de los anticuerpos enteros o los sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante (p. ej., Fv de cadena sencilla) (scFv) o los identificados usando bibliotecas de expresión en fase (véase, por ejemplo, McCafferty y col. (1990) Nature 348:552-554). Además, los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento incluyen las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) o ligera (V_L) de las inmunoglobulinas, así como proteína de superficie específica de tejido y porciones de unión al receptor diana de las mismas. Procedimientos para producir dichas regiones variables se describen en Reiter, y col. (1999) J. Mol. Biol. 290:685-698.

En la técnica se conocen procedimientos para preparar anticuerpos. Véase, por ejemplo, Kohler & Milstein (1975) Nature 256:495-497; Harlow & Lane (1988) Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY). Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés se pueden clonar desde una célula, por ejemplo los genes que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden clonar desde un hibridoma y usar para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Las bibliotecas génicas que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar a partir de células de hibridoma o plasmáticas. Las combinaciones aleatorias de los productos génicos de las cadenas pesadas y ligeras generan un gran conjunto de anticuerpos con diferente especificidad antigénica. Técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos recombinantes (patente de EE.UU. n° 4.946.778; patente de EE.UU. n° 4.816.567) se pueden adaptar para producir anticuerpos usados en los polipéptidos de fusión y procedimientos de la presente invención. Asimismo, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanos o humanizados. Como alternativa se puede usar tecnología de expresión en fagos para identificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, tal como dominios variables, y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados.

La detección selectiva y la selección de inmunoglobulinas preferidas (Anticuerpos) se pueden realizar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. La detección selectiva inicial de la presencia de anticuerpos monoclonales específicos de un receptor específico de tejido o diana se puede realizar mediante el uso de procedimientos basados en ELISA o expresión en fagos, por ejemplo. Preferentemente se lleva a cabo una detección selectiva secundaria para identificar y seleccionar un anticuerpo monoclonal deseado para usar en la construcción de los polipéptidos de fusión específicos de tejido de la invención.

La detección selectiva secundaria se puede llevar a cabo con cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Un procedimiento preferido, denominado "Perfil del biosensor asistido por modificación" ("BiaMAP") (publicación de patente de EE.UU. 2004/101920), permite la rápida identificación de clones de hibridoma productores de anticuerpos monoclonales con características deseadas. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales se clasifican en distintos grupos relacionados con epítomos basados en la evaluación de las interacciones anticuerpo:antígeno.

Agente activo o terapéutico

En algunas realizaciones, el componente de fusión (F) de los polipéptidos de la invención comprende un segundo agente activo o terapéutico o mutante o derivado del mismo, es decir una molécula capaz de tener un efecto deseado cuando se libera en el sitio diana preseleccionado, por ejemplo célula o tejido. Agentes activos o terapéuticos incluyen, entre otros, moléculas pequeñas, hormonas, factores de crecimiento, agentes biológicos terapéuticos, anticuerpos de activación y porciones de los mismos, y anticuerpos de bloqueo y porciones de los mismos, que son capaces de tener un efecto deseable tras la liberación a una célula o tejido diana.

En realizaciones concretas en las que el polipéptido de fusión está dirigido a células o tejido muscular, el polipéptido de fusión comprende un segundo agente activo o terapéutico que es activo sobre células musculares. Dichos agentes incluyen, entre otros, insulina IL-15, miotrofina urocortina, urocortina II, propéptido de miostatina humana, un IGF1 o IGF2 natural o mutante, hGH, proliferina, folistatina, FSTL1 y FLRG, o mutantes, derivados o fragmentos biológicamente activos de los mismos. Además, el agente activo o terapéutico puede comprender un anticuerpo de bloqueo o derivado biológicamente activo del mismo, que bloquea, por ejemplo, la miostatina, el receptor de la activina, el receptor 1 de BMP, el receptor de TNF, el receptor de IL-1, el receptor de ALK3 y el receptor de ALK4. Como alternativa, el agente activo o terapéutico puede comprender un anticuerpo de activación que activa, por ejemplo, el receptor de IGF1, el receptor B2adrenérgico o el complejo del receptor de la IL-15.

Componente multimerizante

En realizaciones específicas, el componente de fusión (F) de los polipéptidos de fusión descritos en el presente documento comprende un componente multimerizante. Un componente multimerizante incluye cualquier secuencia natural o sintética capaz de interactuar con otro componente multimerizante para formar una estructura de orden superior, por ejemplo un dímero, un trímero etc. El componente multimerizante se puede seleccionar del grupo
 5 constituido por una secuencia de aminoácidos entre 1 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, una cremallera de leucina, un motivo de bucle en hélice y un motivo hélice-hélice. Cuando el componente multimerizante comprende una secuencia de aminoácidos de entre 1 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, la secuencia puede contener uno o más residuos de cisteína capaces de formar un puente disulfuro con un correspondiente residuo de cisteína sobre otro polipéptido de fusión que comprende un componente multimerizante
 10 con uno o más residuos de cisteína. En algunas realizaciones, el componente multimerizante comprende un dominio derivado de inmunoglobulina de, por ejemplo, IgG, IgM o IgA humana, o dominios de inmunoglobulina comprables de otros animales, incluidos, entre otros, ratones. En realizaciones específicas, el dominio derivado de inmunoglobulina se puede seleccionar del grupo constituido por la región constante de la IgG, el dominio Fc de la IgM una proteína Fc y la cadena pesada de la IgG. El dominio Fc de la IgG puede seleccionarse de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo.

Componentes espaciadores

Los componentes de los polipéptidos de fusión dirigidos de la invención pueden conectarse directamente entre sí o conectarse a través de espaciadores. El término "espaciador" o "ligador" quiere decir una o más moléculas, por ejemplo ácidos nucleicos o aminoácidos o restos no peptídicos, tales como polietilenglicol, que se pueden insertar entre uno o más de los dominios del componente. Por ejemplo, las secuencias espaciadoras se pueden usar para proporcionar un sitio de restricción entre los componentes para facilitar la manipulación. También se puede proporcionar un espaciador para potenciar la expresión del polipéptido de fusión en una célula huésped, para disminuir la hidrancia estérica de modo que el componente puede asumir su estructura óptima terciaria o cuaternaria
 20 y/o interactuar adecuadamente con su molécula diana.

Una secuencia espaciadora puede incluir uno o más aminoácidos conectados de forma natural a un componente receptor o puede ser una secuencia añadida usada para potenciar la expresión de la proteína de fusión, proporcionar sitios de interés específicamente deseados, permitir dominios de componente para formar estructuras óptimas terciarias y/o para potenciar la interacción de un componente con su molécula diana. En una realización, el espaciador comprende una o más secuencias peptídicas entre uno o más componentes que tiene (tienen) entre 1-100 aminoácidos, preferentemente 1-25. En una realización específica, el espaciador es una secuencia de tres aminoácidos; más específicamente la secuencia de tres aminoácidos de Gly Pro Gly.

Construcción y expresión de ácido nucleico

Se pueden producir componentes individuales de los polipéptidos de fusión de la invención a partir de moléculas de ácidos nucleicos usando procedimientos de biología molecular conocidos en la técnica. El ácido nucleico de la SEC ID N° 2 o la SEC ID N° 4 con las deleciones o mutaciones adecuadas se puede usar para preparar las variantes de IGF1 o IGF2 descritas en el presente documento. Dichas moléculas de ácidos nucleicos se insertan en un vector que es capaz de expresar los polipéptidos de fusión cuando se introducen en una célula huésped adecuada. Entre las células huésped adecuadas se incluyen células bacterianas, de levaduras, de mamífero o de insectos. Cualquiera de los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector se puede usar para construir vectores de expresión que codifican los polipéptidos de fusión de la invención bajo el control de señales de control de la transcripción/traducción. Estos procedimientos pueden incluir técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinaciones *in vivo*. (véase Sambrook y col. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, y col., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

La expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención se puede regular mediante una segunda secuencia de ácido nucleico de modo que la molécula se expresa en un huésped transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención se puede controlar mediante cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnicas. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión de las moléculas del polipéptido de fusión incluyen, entre otros, la repetición terminal larga como se describe en Squinto y col. (1991) Cell 65: 1-20; la región del promotor temprano SV40, el promotor de CMV, la repetición terminal M-MuLV 5', el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la timidina quinasa del herpes, las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina; vectores de expresión en procariotas tales como el promotor -lactamasa o el promotor lac (véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American (1980) 242:74-94); elementos promotores de levaduras u hongos, tales como el promotor Gal 4, el promotor de ADH (alcohol deshidrogenasa), el promotor de PGK (fosfoglicerol quinasa), el promotor de fosfatasa alcalina y las regiones de control de la transcripción específicas de tejido derivadas del gen de la elastasa I, el gen de la insulina, el gen de inmunoglobulina, el gen de albúmina del virus de tumor de mama en ratones, el gen de la α -fetoproteína, el gen de la α 1-antitripsina, el gen de β -globina, el gen de la proteína básica de la mielina, el gen de la cadena ligera 2 de miosina y el gen de la hormona liberadora de gonadotropina.

Las construcciones de ácido nucleico de la invención se insertan en un vector de expresión o vector viral mediante procedimientos conocidos en la técnica, en la que la molécula de ácido nucleico está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión. También se proporciona un sistema huésped-vector para la producción de un polipéptido de fusión específico de tejido de la invención, que comprende el vector de expresión de la invención que se ha introducido en una célula huésped adecuada para la expresión del polipéptido de fusión. La célula huésped adecuada puede ser una célula bacteriana, tal como *E. coli*, una célula de levadura, tal como *Pichia pastoris*, una célula de insectos, tal como *Spodoptera frugiperda*, una célula de mamífero, tal como una célula COS, CHO, 293, BHK o NSO.

La invención además abarca procedimientos para producir los polipéptidos de fusión de la invención cultivando células transformadas con un vector de expresión en condiciones que permiten la producción de los polipéptidos de fusión específicos de tejido y la recuperación de los polipéptidos de fusión producidos de este modo. Las células pueden también transcluirse con un virus recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la invención.

Los polipéptidos de fusión se pueden purificar mediante cualquier técnica que permita la posterior formación de un polipéptido estable. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los polipéptidos de fusión se pueden recuperar de las células bien como polipéptidos solubles o como cuerpos de inclusión, de los que se pueden extraer de forma cuantitativa con clorhidrato de guanidinio 8M y diálisis. Con el fin de purificar los polipéptidos de fusión, se puede usar cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de fase inversa o filtración en gel convencionales. Los polipéptidos de fusión también se pueden recuperar de medios acondicionados tras la secreción por células eucariotas o procariotas.

Procedimientos terapéuticos

La divulgación en el presente documento proporciona además el desarrollo de polipéptidos de fusión de IGF descritos en el presente documento como terapéutico para el tratamiento de pacientes que sufren trastornos que se pueden mejorar proporcionando IGF1 o IGF2, por ejemplo, una afección producida o empeorada por una deficiencia de IGF. Por ejemplo, una disminución de la masa muscular, o atrofia, se asocia con diversos estados fisiológicos y patológicos. Por ejemplo, la atrofia muscular se puede deber a desnervación por traumatismo neural, neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria, por ejemplo síndrome de Guillain-Barre, neuropatía periférica o daño neural causado por toxinas o fármacos ambientales.

La atrofia muscular puede también ser el resultado de desnervación debido a una neuropatía motora, que incluyen, por ejemplo, enfermedad neuronal motora adulta, tal como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA o enfermedad de Lou Gehrig), atrofias musculares espinales infantiles y juveniles; y neuropatía motora autoinmunitaria con bloqueo conductor multifocal. La atrofia muscular puede también ser el resultado de enfermedad crónica resultante de, por ejemplo, parálisis por ictus o lesión de la médula espinal; inmovilización esquelética por traumatismo, tal como, por ejemplo, fractura, lesión en el ligamento o los tendones, esguince o dislocación; o prolongado reposo en cama. Estrés metabólico o insuficiencia nutricional, que puede también dar como resultado atrofia muscular incluyen la caquexia del cáncer y otras enfermedades crónicas, incluidas SIDA, ayuno o rabdomiólisis, y trastornos endocrinos tales como caquexias de la glándula tiroidea y diabetes. La atrofia muscular también puede deberse a síndromes de distrofia muscular, tales como los síndromes de Duchenne, Becker, miotónico, fascioescapulohumeral, Emery-Dreifuss, oculofaríngeo, escapulohumeral, extremidades-cadera y tipos congénitos, así como la distrofia conocida como miopatía distal hereditaria. La atrofia muscular también puede deberse a miopatía congénita, tal como hipotonía congénita benigna, enfermedad nuclear central, miopatía nemaleno y miopatía miotubular (centronuclear). La atrofia muscular también se produce durante el proceso de envejecimiento. La atrofia muscular en varios estados patológicos se asocia con proteólisis potenciada y disminución de la producción de proteínas musculares.

Los polipéptidos de fusión de IGF1 e IGF2 descritos en el presente documento también son útiles en enfermedades asociadas con una deficiencia de IGF, tal como enanismo. Adicionalmente también, se ha demostrado que los IGF mejoran la supervivencia de las células de músculo cardíaco tras un acontecimiento, tal como infarto de miocardio, por lo que los polipéptidos de fusión de la invención son útiles en un sujeto que haya experimentado dicho acontecimiento.

La capacidad de los polipéptidos de fusión de IGF de la invención para evadir el gran número de proteínas de unión a IGF presentes en un mamífero los convierte en terapéuticamente útiles para tratar de forma eficiente afecciones que se pueden beneficiar de un incremento de los niveles de IGF, tal como recuperación de afecciones estimulantes de atrofia, situaciones en las que la masa de músculo esquelético disminuye, o situaciones en las que se desea hipertrofia muscular, tal como durante la recuperación de inmovilización, envejecimiento, cáncer etc.

Dado que los receptores de IGF se expresan ampliamente, las moléculas de fusión de IGF en las que el componente de fusión es un componente multimerizante, tal como Fc u otro componente activo, podrían usarse además en otros escenarios distintos al músculo. Por ejemplo, se ha mostrado que IGF1 e IGF 2 son factores de crecimiento óseo y, por tanto las moléculas que no son objetivo pueden también ser útiles en contextos de emaciación de masa muscular más general. La caquexia es una afección que produce pérdida de masa corporal,

que incluye, entre otros, masa muscular. Los escenarios de caquexia incluyen caquexia inducida por cáncer, caquexia inducida por SIDA, caquexia inducida por sepsis, caquexia inducida por insuficiencia renal e insuficiencia cardíaca congestiva. Asimismo, existe un retraso de crecimiento en muchos casos, incluida la talasemia, que produce una estatura corta. En general, la estatura corta sería un escenario para una proteína de fusión de IGF1 o IGF2 que no está dirigida directamente al músculo, tal como las realizaciones con IGF1-Fc o IGF2-Fc o IGF1-GH o IGF2-GH. Un uso adicional para IGF1 o IGF2 es complementar o sustituir la insulina. En escenarios de diabetes insensible a la insulina se pueden usar proteínas de fusión de IGF1 o IGF2. Dichas variantes pueden usarse además simplemente como sustituto de la insulina en los casos de hiperglucemia. Otros usos adicionales para las proteínas de fusión de IGF1 e IGF2 descritas en el presente documento incluyen el uso en la retirada de ventiladores de los individuos y para el tratamiento de afecciones tales como anemia, en las que se desea proliferación de células sanguíneas.

Procedimientos de administración

Se pueden usar procedimientos conocidos en la técnica para la liberación terapéutica de agentes, tales como proteínas o ácidos nucleicos, para la liberación terapéutica de un polipéptido de fusión de IGF o ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de IGF de la invención, por ejemplo transfección celular, terapia génica, administración directa con un vehículo de liberación o vehículo farmacéuticamente aceptable, liberación indirecta proporcionando células recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de IGF de la invención.

Se conocen varios sistemas de liberación y se pueden usar para administrar el polipéptido de fusión de la invención, por ejemplo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor, construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector etc. Los procedimientos de introducción pueden ser enteral o parenteral e incluyen, entre otros, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica u oral. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, incluida la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo fijado a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se pueden emplear mediante, por ejemplo, el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente formador de aerosoles.

En una realización específica puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita el tratamiento; esto se puede conseguir mediante, por ejemplo y sin limitaciones, infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante, siendo dicho implante un material poroso, no poroso o gelatinosos, incluidas membranas, tales como membranas sialásticas, fibras o sustitutos comerciales de piel.

En otra realización, el agente activo se puede liberar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) Science 249:1527-1533). En otra realización más, el agente activo se puede liberar en un sistema de liberación controlada. En una realización se puede usar una bomba (véase Langer (1990) ant.). En otra realización se pueden usar materiales poliméricos (véase Howard y col. (1989) J. Neurosurg. 71 :105). En otra realización en la que el agente activo de la invención es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico se puede administrar in vivo para estimular la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrarla de modo que pase a ser intracelular, por ejemplo mediante el uso de un vector retroviral (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.980.286) o mediante inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revistiendo con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante administración en unión con un péptido similar a la homeocaja que se sabe que entra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Como alternativa, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporar dentro del ADN de la célula huésped mediante recombinación homóloga.

Transfección celular y terapia génica

La presente divulgación abarca el uso de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fusión de la invención para transfección de células *in vitro* e *in vivo*. Estos ácidos nucleicos se pueden insertar en cualquiera de una serie de vectores bien conocidos para la transfección de células y organismos diana. Los ácidos nucleicos se transfeccionan en células *ex vivo* e *in vivo*, mediante la interacción del vector y la célula diana. Las composiciones se administran (p. ej., mediante inyección en un músculo) a un sujeto en una cantidad suficiente para producir una respuesta terapéutica.

En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento de tratar un sitio diana, es decir una célula o tejido diana, en un ser humano u otro animal que comprende transfeccionar una célula con un ácido nucleico que

codifica un polipéptido de fusión específico de tejido de la invención, en el que el ácido nucleico comprende un promotor inducible unido operablemente al ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión dirigido.

Terapia de combinación

En numerosas realizaciones, los polipéptidos de fusión de la presente invención se pueden administrar en combinación con uno o más compuestos o terapias adicionales. Por ejemplo, múltiples polipéptidos de fusión se pueden coadministrar junto con uno o más compuestos terapéuticos. La terapia de combinación puede abarcar la administración simultánea o alterna. Además, la combinación puede abarcar la administración aguda o crónica.

Composiciones Farmacéuticas

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la terapéutica. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como supositorio, con aglutinantes tradicionales y vehículos, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describe en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by EW.Martin.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Cuando es necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lidocaína, para aliviar el dolor en el punto de la inyección. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con un bote de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de modo que los ingredientes se pueden mezclar antes de la administración.

Los agentes activos de la invención se pueden formular como formas salinas o neutras. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con los grupos amino libres, tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico etc., y las formadas con los grupos carboxilo libres, tales como los que derivan de sodio, potasio, amoniaco, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína etc.

La cantidad del polipéptido de fusión de la invención que será eficaz en el tratamiento de una afección o enfermedad se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar basadas en la presente descripción. Además, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la afección y se decidirá de acuerdo con el juicio del médico encargado y las circunstancias de cada sujeto. No obstante, los intervalos de dosis adecuados para administración intravenosa son, en general de aproximadamente 20-5000 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Intervalos de dosis adecuados para administración intranasal son, en general de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo con modelos animales o *in vitro*.

Kits

En el presente documento también se describe un paquete farmacéutico o kit que comprende uno o más contenedores cargados con al menos un polipéptido de fusión o ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión de la invención. Los kits se pueden usar en cualquier procedimiento aplicable, incluido, por ejemplo uno diagnóstico. Asociados opcionalmente con dicho(s) contenedor(es) puede adjuntarse una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, en la que se refleja (a) la aprobación de la agencia de la fabricación, uso o venta del producto para administración en seres humanos, (b) instrucciones de uso, o ambos.

Animales transgénicos

Adicionalmente, en el presente documento se describen animales transgénicos no humanos que expresan un polipéptido de fusión IGF de la invención. Un animal transgénico se puede producir introduciendo ácido nucleico en los pronúcleos masculinos de un oocito fertilizado, mediante, por ejemplo, microinyección, infección retroviral, y dejar que el oocito se desarrolle en un animal huésped hembra pseudopreñada. Cualquiera de las secuencias reguladoras o de otro tipo útiles en los vectores de expresión pueden formar parte de la secuencia transgénica. Una(s) secuencia(s) reguladora(s) específica de tejido puede estar unida operablemente al transgen para dirigir la expresión del transgen en células concretas. Un animal no humano transgénico que expresa un polipéptido de fusión específico de tejido es útil en diversas aplicaciones, incluidas como medio de producir dichas proteínas de fusión. Además, el transgen se puede introducir bajo el control de un promotor inducible, de modo que la expresión del polipéptido de fusión específico de tejido se puede controlar mediante, por ejemplo, administración de una molécula pequeña.

EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes se exponen para proporcionar a los expertos habituales en la técnica una divulgación y descripción completa de cómo los procedimientos y composiciones de la invención se efectúan y usan, y no se pretende que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperaturas, etc.), pero se permiten algunos errores y desviaciones del experimento. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es en peso molecular medio, la temperatura está en °C y la presión es la atmosférica o cercana a ella.

Ejemplo 1 Los polipéptidos de fusión de IGF se escinden en Lys65 o 68

Se construyó un polipéptido de fusión usando IGF1 humano que contiene IGF1 humano (Δ 1-3, delR37) fusionado con una Fc humana. El polipéptido se purificó e inyectó en ratones. Las muestras de sangre se recogieron cada 24 horas durante siete días. Se realizó análisis de tipo western usando un anticuerpo específico de la Fc humana. Tras tres días se observó una banda de migración inferior, lo que indica que IGF1-Fc estaba siendo escindida proteolíticamente en el suero. Se extrajo más suero y esta especie de migración inferior se purificó y se secuenció. Se estableció que el constructo IGF1-Fc se escindía en la lisina 68 o en la lisina 65 en la variante de IGF1. En base a este resultado, se preparan constructos en los que se eliminan de tres a seis aminoácidos terminales o la lisina en la posición 65 o 68 muta a otro aminoácido, tal como alanina o glicina. Dichas variantes se usan en la preparación de polipéptidos de fusión de la invención que comprende componentes de fusión, tales como componentes multimerizantes, ligandos dirigidos y otros compuestos activos, y se encuentra que tienen mayor estabilidad y semivida que los constructos comparables con la lisina en la posición 65 o 68 del componente variante de IGF1.

Ejemplo 2. Polipéptidos de fusión IGF1-Fc

Los constructos de polipéptidos de fusión se efectuaron usando variante de IGF-Fc o variante Fc-IGF1 usando la variantes IGF1 (Δ 1-3, delR37) y Fc derivada de IgG humana. La actividad de IGF1 se midió por su capacidad para fosforilar el receptor de IGF1 y Akt quinasa. Dicha fosforilación se determinó mediante una transferencia de tipo western usando anticuerpos fosfoespecíficos frente a las diversas moléculas o mediante inmunoprecipitación de los receptores (tales como IGFR), y transferencia de tipo western con un anticuerpo específico antifosfotirosina. Dichas transferencias indicaron fosforilación activa de Akt usando el constructo IGF1-Fc, pero poca o ninguna actividad usando el Fc-IGF1.

El IGF1 (Δ 1-3, DEL r37)-Fc se administró a ratones SCID por vía intraperitoneal o subcutánea mediante inyecciones diarias o mediante inyecciones en días alternos. Para las inyecciones se usaron 4,5 mg/kg de la proteína de fusión. Los ratones control no recibieron proteína IGF1-Fc. Un tercer grupo de ratones recibió 15 mg/kg de dexametasona por vía subcutánea al día. Esta dosis es suficiente para dar una pérdida del 15 % de masa muscular tras doce días. Un cuarto grupo de ratones recibió dexametasona y el IGF1 (Δ 1-3, DEL r37)-Fc. Los ratones de este cuarto grupo no experimentaron atrofia ni reducciones estadísticamente significativas de la atrofia (5 % de atrofia en el músculo tibial anterior (TA) para ratones que recibieron dexametasona y IGF1 (Δ 1-3, DEL r37) frente al 15 % de atrofia del TA para los ratones que sólo recibieron dexametasona).

Ejemplo 3. Polipéptidos de fusión IGF1-hGH

Los polipéptidos de fusión se construyeron usando IGF1 (Δ 1-3, del R37) con hGH como componente de fusión. Además de medir la actividad de IGF1, la actividad de la hormona de crecimiento humana (hGH) se midió por su capacidad para fosforilar Stat5. Sorprendentemente, las construcciones que tienen la configuración variante de IGF1-hGH produjeron la fosforilación de los receptores de IGF1 y de Stat5, mientras que las construcciones con la configuración variante hGH-IGF1 presentaban poca o ninguna actividad.

Los ensayos de fosforilación indicaron que las proteínas de fusión que tienen la configuración de la variante IGF1-hGH, que incluye tanto hGH como la variante hIGF1 descrita anteriormente, son capaces de activar de forma simultánea el receptor de IGF1. Dicha fosforilación se determinó mediante una transferencia de tipo western usando anticuerpos fosfoespecíficos frente a las diversas moléculas o mediante inmunoprecipitación de los receptores (tales como IGFR), y transferencia de tipo western con un anticuerpo específico antifosfotirosina. Además, todos los polipéptidos de fusión anteriores se realizaron usando mutantes de IGF1 humanas con delección de los tres primeros aminoácidos ($\Delta 1-3$) y eliminación o sustitución de las argininas en las posiciones 36 y/o 37. Dichas moléculas mutantes de IGF1 mostraron tanto resistencia a la escisión como menor unión por las proteínas de unión de IGF1 (específicamente la proteína 5 de unión a IGF1) sin que afecte a la capacidad de señalización sobre los miotubos C2C12.

Se construyen proteínas de fusión que comprenden las variantes de IGF1 descritas anteriormente así como la delección de los aminoácidos 65-70 o 68-70 o mutación de la lisina en la posición 65 y 68 y se analizan para determinar su capacidad para activar de forma simultánea el receptor de IGF1, Akt y Stat5, determinado mediante transferencia de tipo western usando anticuerpos fosfoespecíficos frente a diversas moléculas o mediante inmunoprecipitación de los receptores (tales como IGFR) y transferencia de tipo western con anticuerpo específico frente a anti-fosfotirosina. Además, los miotubos C1C12 se ponen en contacto con las proteínas de fusión y se mide la hipertrofia en comparación con la hipertrofia causada por IGF1 solo o hGH sola. En las construcciones en las que un ligando dirigido, tal como agrina, se usa como componente de fusión, la actividad se puede medir mediante fosforilación del receptor diana, tal como MuSK (Glass y col. (1996) 85:513-523; Beguinot y col. (1988) Biochemistry. 27(9):3222-8).

Ejemplo 4. Polipéptidos de fusión IGF2

Todas las construcciones anteriores se preparan usando la proteína IGF2 o ADN tal como se expone en la SEC ID N° 3-4. Se encuentra que la lisina en la posición 65 de IGF2 está implicada en la escisión de las proteínas de fusión que comprenden la variante IGF2, que soporta el uso de variantes de IGF2 con delecciones en los 3 aminoácidos terminales (65-67).

Ejemplo 5. efecto de 2D-IGF1-Fc ($\Delta 1-3$, $\Delta \text{Arg}37$) sobre la glucosa en sangre

Se usaron ratones C57/BL6 de 13 semanas de edad ($n = 3$ ratones por grupo). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante cuatro horas. Se extrajeron muestras de sangre basales y tras la inyección en la vena de la cola y la glucosa en sangre se midió mediante un glucómetro. Por vía intraperitoneal se administró insulina, IGF1 o IGF1-Fc y se midió la glucosa en sangre extraída de la vena de la cola 60 minutos después de la administración del fármaco. La insulina se administró a 2 U/kg. Se usó IGF1 a una dosis 10 veces mayor que la insulina (700 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en base a la afinidad comparativa de IGF1 por el receptor de la insulina. Se administró 2D-IGF1-Fc (hIGF $\Delta 1-3$, $\Delta \text{Arg}37$) a una dosis equimolar a la de IGF1 (3,5 mg/kg).

Resultados: La insulina produjo una disminución del 66% de la glucosa en sangre ($207 \pm 5,5$ mg/dl basal frente a $70 \pm 22,2$ mg/dl tras la inyección), el IGF-1 indujo una disminución del 45 % de la glucosa en sangre ($200 \pm 6,7$ mg/dl basal frente a $109 \pm 13,7$ mg/dl tras la inyección) y 2D-IGF1-Fc produjo una disminución del 30 % de la glucosa en sangre ($184 \pm 7,3$ mg/dl basal frente a $129 \pm 15,9$ mg/dl tras la inyección). Estos resultados muestran que IGF1-Fc es eficaz en la reducción de la glucosa en sangre en ratones C57Bl/6 en ayunas en un estudio agudo.

Ejemplo 6. Análisis farmacocinético de 2D-IGF1-Fc y 3D-IGF1-Fc.

En ratones CD-1 ($n = 5$ por grupo) se inyectó por vía subcutánea con 5 mg/kg de 2D-IGF1-Fc o 3D-IGF1-Fc derivados de IGF1 humano (hIGF $\Delta 1-3$, Arg37, $\Delta 68-70$). Las muestras de suero se obtuvieron en un periodo de 7 días y los ensayos ELISA se realizaron con un IGF1 anti-humano (USB N° de cat. 17661-05) y se detectaron los niveles del anticuerpo IgG anti-humano de cabra. FcHRP (Jackson Immuno Research n° de cat. 109-035-098). Los resultados se muestran en la Figura 1. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos

		2D-IGF1-Fc	3D-IGF1-Fc
T_{MÁX}	h	5,40 \pm 1,12	6,00 \pm 1,10
C_{MÁX}	m $\mu\text{g}/\text{ml}$	9,12 \pm 1,75	13,27 \pm 2,85
T_{1/2}	h	24,09 \pm 4,41	29,85 \pm 5,51
AUC todos	m $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$	325,42 \pm 61,55	554,55 \pm 112,23
AUCINF (obs)	m $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$	328,31 \pm 62,10	566,82 \pm 114,63
V_{Z(obs)F}	ml/kg	535,77 \pm 101,88	395,78 \pm 82,00
CL(obs)F	ml/h/ml	15,41 \pm 2,91	9,26 \pm 1,97
MRT último	h	32,69 \pm 6,00	42,80 \pm 7,87
MRTINF (obs)	h	34,19 \pm 6,27	42,46 \pm 7,80

Ejemplo 7. Moléculas de IGFI-Fc inducen hipertrofia del músculo esqueléticos *in vivo*

5 Por vía subcutánea se inyectó 2D-IGFI-Fc y 3D-IGFI-Fc en ratones SCID adultos de 8 semanas de edad diariamente a una dosis de 1,6 mg/kg o solución salina como vehículo durante 12 días (N= 5 por grupo). Al final del experimento, se extrajeron los músculos (tibialis anterior y el complejo del gastrocnemio) y se midió el peso húmedo del músculo. La inyección de 2D-IGFI-Fc produjo un incremento de 23,07 ± 2,14 % (media ± SEM) en la masa del tibialis anterior y un incremento de 17,00 ± 2,07 % de la masa del gastrocnemio en comparación con los músculos control. La inyección de 3D-IGFI-Fc produjo un incremento de 9,45 ± 3,72 % de la masa del tibialis anterior y un incremento de 9,31 ± 2,15 % de la masa del gastrocnemio en comparación con los músculos control..

Ejemplo 8. 2D-IGFI-Fc es superior a IGF-1 en la inducción de hipertrofia del músculo esquelético

15 La eficacia de of 2D-IGFI-Fc en la inducción de hipertrofia del músculo esquelético también se comparó directamente con el IGF-1 sin modificar. Por vía subcutánea se inyectaron dosis equimolares de cada uno (4,8 mg/kg de 2D-IGFI-Fc o 0,93 mg/kg de IGF-1) o solución salina como vehículo en ratones SCID adultos de 8 semanas de edad en días alternos durante 12 días (N= 5 por grupo). Al final del experimento, se extrajeron los músculos (tibialis anterior y el complejo del gastrocnemio) y se midió el peso húmedo del músculo. La inyección de 2D-IGFI-Fc produjo un incremento de 13,35 ± 2,26 % (media ± SEM) de la masa del tibialis anterior y un incremento de 9,39 ± 3,68 % de la masa del gastrocnemio en comparación con los músculos control. La inyección de IGF-1 dio un incremento de 2,24 % ± 2,27 de la masa del tibialis anterior y un incremento de 0,81 % ± 1,51 de la masa del gastrocnemio en comparación con los músculos control..

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 <120> Polipéptidos de fusión IGF-1 y usos terapéuticos de los mismos
 <130> 2060A-WO
 <140> pendiente de asignación
 <141> adjunto al presente documento

30 <160> 4
 <170> FastSEQ para la versión 4.0 de Windows

35 <210> 1
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo Sapien

40 <400> 1

```

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

45 <210> 2
 <211>210
 <212> ADN
 <213> Homo Sapien

<400> 2

```

    ggaccggaga cgctctgogg ggctgagctg gtggatgctc ttcagttcgt gtgtggagac 60
    aggggctttt atttcaacaa gcccacaggg tatggctcca gcagtcggag ggcgcctcag 120
    acaggtatcg tggatgagtg ctgcttccgg agctgtgatc taaggaggct ggagatgtat 180
    tgcgcacccc tcaagcctgc caagtcagct                                210
    
```

50

ES 2 367 039 T3

<210> 3
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5 <400> 3

```

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

10 <210> 4
 <211> 201
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

15 <400> 4

```

gcttaccgcc ccagtgagac cctgtgcggc ggggagctgg tggacaccct ccagttcgtc 60
tgtggggacc ggggcttcta cttcagcagg cccgcaagcc gtgtgagccg tcgcagccgt 120
ggcatcgttg aggagtgctg tttccgcagc tgtgacctgg ccctcctgga gacgtactgt 180
gctacccccg ccaagtccga g                                     201
    
```

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión, que comprende:
- 5 (a) al menos un componente polipeptídico variante de IGF1; y
(b) un componente de fusión que comprende el dominio Fc de la IgG humana;
- en la que el componente variante de IGF es una proteína IGF-1 humana de SEC ID N° 1 que comprende una
deleción de amino ácidos en las posiciones 1-3 y 37 (Δ 1-3, Δ 37).
- 10 2. Un dímero de la proteína de fusión de la reivindicación 1.
3. Un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 1.
- 15 4. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. Un sistema huésped-vector que comprende el vector de la reivindicación 4.
6. El sistema huésped-vector de la reivindicación 5, en el que la célula huésped se selecciona de una célula
bacteriana, de levadura, de insectos y de mamífero.
- 20 7. Un procedimiento de producir una proteína de fusión, que comprende cultivar una célula huésped transfeccionada
con el vector de la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de la célula huésped
y recuperar el polipéptido producido de este modo.
- 25 8. Una composición farmacéutica, que comprende la proteína de fusión de la reivindicación 1 y un vehículo
farmacéuticamente aceptable.
9. Una proteína de fusión de la reivindicación 1 para usar en un procedimiento terapéutico para el tratamiento de una
enfermedad o afección seleccionada de atrofia muscular, enanismo, infarto de miocardio, osteoporosis, debilidad o
30 fragilidad relacionada con la edad, sarcopenia, una enfermedad o afección que implica pérdida de masa corporal,
caquexia, insuficiencia congestiva cardíaca, talasemia, diabetes, hiperglucemia y anemia, o para el tratamiento de
un sujeto en riegos para el desarrollo de dicha enfermedad o afección.
10. La proteína de fusión de la reivindicación 9 para usar en un procedimiento terapéutico en el que dicha atrofia
35 muscular es un resultado de desnervación; neuropatía degenerativa, metabólica o inflamatoria; atrofias musculares
espinales infantiles y juveniles; neuropatía motora autoinmunitaria, SIDA, ayunas o rabdomiólisis; un síndrome de
distrofia muscular; sarcopenia; inmovilización; envejecimiento; o como resultado del tratamiento con un agente
causante de atrofia.
- 40 11. Uso de una proteína de fusión de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de
una enfermedad o afección seleccionada de atrofia muscular, enanismo, infarto de miocardio, osteoporosis,
debilidad o fragilidad relacionada con la edad, sarcopenia, una enfermedad o afección que implica pérdida de masa
corporal, caquexia, insuficiencia congestiva cardíaca, talasemia, diabetes, hiperglucemia y anemia, o para el
tratamiento de un sujeto en riesgo de desarrollar dicha enfermedad o afección.
- 45 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha atrofia muscular es como se ha definido en la
reivindicación 10.
- 50 13. Una proteína de fusión de la reivindicación 1 para usar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o
animal.

