

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 383**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07848472 .2**
96 Fecha de presentación: **11.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2102235**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **Tratamiento de caquexia**

30 Prioridad:
11.12.2006 GB 0624687

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2012

73 Titular/es:
**ASTON UNIVERSITY
ASTON TRIANGLE WARWICKSHIRE
BIRMINGHAM B4 7ET, GB**

72 Inventor/es:
**TISDALE, Michael John;
TODOROV, Penio y
WYKE, Stacey Marie**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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).

ES 2 381 383 T3

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de caquexia.

[0001] La presente invención se refiere al tratamiento de caquexia.

[0002] Muchos pacientes (aproximadamente un 50 %) de cáncer padecen un grave agotamiento de su masa corporal magra así como tejido adiposo, que se ha ligado con un tiempo de supervivencia reducido. Perder hasta un 30 % de peso corporal puede provocar la muerte y dicho agotamiento de la masa muscular puede dar cuenta de más de un 20 % de las muertes de pacientes de cáncer. Esta afección forma parte de un síndrome metabólico complejo conocido como caquexia por cáncer, en que es evidente la pérdida de proteína del músculo esquelético, pero los órganos viscerales tales como hígado y riñón están relativamente intactos, diferenciándose así esta afección de la inanición simple. Aunque se han asociado una serie de citocinas, incluyendo factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) y factor neurotrófico ciliar (CNTF), con el agotamiento de proteína en la caquexia, pocos estudios han reseñado un efecto directo sobre el proceso degradativo.

[0003] Los inventores han aislado anteriormente, tanto de tumor de murino inductor de caquexia como de orina de pacientes de cáncer con caquexia, un factor tumoral capaz de inducir la pérdida de peso en ratones normales, con agotamiento específico de la masa esquelética no grasa (Todorov, P., Cariuk, P., McDevitt, T., Coles, B., Fearon, K. y Tisdale, M. "Characterization of a cancer cachectic factor". *Nature*, 379: 739-742, 1996). Se dio cuenta de la pérdida de proteína corporal por un aumento de la degradación proteica y una reducción de la síntesis de proteína en músculo esquelético. Este material, que han llamado factor inductor de la proteólisis (PIF), es también capaz de inducir la degradación proteica en músculo gastrocnemio aislado. El efecto del PIF sobre los pesos de órganos en ratones normales era similar al observado en caquexia, con una reducción del peso de los músculos sóleo y gastrocnemio, ningún cambio en el peso de corazón o riñón y un aumento en el peso del hígado.

[0004] El PIF es una glucoproteína sulfatada de Mr 24.000 que contiene cadenas oligosacáridas ligadas tanto por N como por O, que han mostrado ser esenciales para la actividad biológica (Todorov, P.T., Deacon, M. y Tisdale, M.J. "Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation". *J. Biol. Chem.*, 272: 12279-12288, 1997). Tanto el PIF de ratón como de humano parecen contener componentes carbohidratos idénticos, como se define por su reactividad con un anticuerpo monoclonal de murino dirigido hacia los residuos oligosacáridos. Además, el análisis de secuencia aminoacídica de los residuos N-terminales mostró homología entre las dos especies (Cariuk, P., Lorite, M.J., Todorov, P.T., Field, W.N., Wigmore, S.J. y Tisdale, M.J. "Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients". *Br. J. Cancer*, 76: 606-613, 1997), sugiriendo que la degradación proteica en caquexia por cáncer puede ser idéntica en ratón y ser humano.

[0005] Para que el PIF ejerza un efecto catabólico sobre el músculo esquelético, los inventores creen que debe haber receptores de superficie celular específicos capaces de transmitir una respuesta biológica a la maquinaria de degradación proteica intracelular.

[0006]

[0007] Es un objetivo de la presente invención proporcionar un receptor de alta afinidad por PIF, proporcionar agentes que sean eficaces para modular la caquexia mediante interacción con dichos receptores y proporcionar también un cribado para identificar dichos agentes.

[0008] Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un receptor aislado para el factor inductor de la proteólisis (PIF) caracterizado porque el extremo N del receptor nativo maduro tiene la secuencia aminoacídica:

n-DINGGGATLPQPLYQTA AVL TAGFA. (SEQ ID No.1)

o:

n - DINGGGATLPQKLYLIPNL. (SEQ ID No.13)

y derivados funcionales de los mismos.

[0009] La presente invención está basada en la investigación realizada por los inventores que investigaron la actividad de unión de PIF. Estos experimentos se describen con más detalle en los ejemplos adjuntos. Brevemente, los inventores han aislado el receptor a partir de membranas solubilizadas (con 1 % de Triton) de miotúbulos de murino mediante incubación con PIF radiomarcado. Se purificó el complejo PIF-receptor en una columna de 5 aglutinina de germen de trigo-agarosa, que podía unirse a PIF, y se eluyó el receptor libre con *N*-acetilglucosamina 0,1 M. Se encontró que el receptor era una única proteína de Mr aproximadamente 40.000 usando PAGE-SDS al 15 % y cromatografía de exclusión con Sephadex G-50.

[0010] Los inventores efectuaron una digestión trípica seguida de un análisis de secuencia (Edman) del receptor de PIF y establecieron que el extremo N del receptor maduro empezaba con la secuencia aminoacídica de SEQ ID No. 1. Esta secuencia tiene homología con un fragmento peptídico de la proteína de fluido sinovial p205, con actividad estimulante de linfocitos T (*J. Immunol.*; (1996) 157; 1773-80). Se obtuvo una secuencia N-terminal adicional que se cree que puede ser una forma polimórfica (SEQ ID No. 13). Esta secuencia difiere en 5 aminoácidos de la SEQ ID No. 1 y es más básica que la SEQ ID No. 1. Aun sin desear ligarse a mecanismo alguno, 15 puesto que el PIF es ácido, se cree que un receptor que comprenda la SEQ ID No. 13 puede interaccionar más fuertemente con él.

[0011] Los análisis adicionales del receptor que comprende la SEQ ID No. 1 identificaron fragmentos peptídicos internos con las siguientes secuencias aminoacídicas:

TAINDTFLNADSNLSIGK	(SEQ ID No.2)
XATVAGVSPAPANVSAAGA	(SEQ ID No.3)
...IIPATTAGE...	(SEQ ID No.4)
...TYMSPDYAAATLAG...	(SEQ ID No.5)
FVPLPT	(SEQ ID No.6)
TELSNYVTAXGTxxG	(SEQ ID No.7)
VTTAGSDS	(SEQ ID No.8)
DVNGG	(SEQ ID No.9)
LTTWDLIADSGR	(SEQ ID No.10)

[0012] Los inventores no pudieron localizar ninguna homología de secuencia de estos péptidos internos con otras proteínas en bases de datos públicas. Por consiguiente, el receptor de PIF según la presente invención 25 representa una proteína novedosa.

[0013] Se prefiere que el receptor de PIF según el primer aspecto de la invención comprenda adicionalmente al menos una secuencia peptídica interna de SEQ ID No. 2-10. Más preferiblemente, el receptor comprende adicionalmente al menos dos de dichos péptidos internos y lo más preferiblemente el receptor comprende cada uno 30 de los péptidos internos.

[0014] Los derivados funcionales preferidos del receptor de PIF incluyen proteínas que pueden comprender mutaciones (respecto al tipo silvestre) que no obstante no alteran la actividad del receptor. Según la presente invención, los cambios adicionales preferidos en el receptor son conocidos comúnmente como sustituciones 35 "conservativas" o "seguras". Las sustituciones aminoacídicas conservativas son aquellas por aminoácidos que tengan propiedades químicas suficientemente similares, para conservar la estructura y función biológica del receptor. Es evidente que pueden realizarse también inserciones y deleciones de aminoácidos en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, particularmente si las inserciones o deleciones implican solo unos pocos aminoácidos, por ejemplo, menos de 10 y preferiblemente menos de 5, y no eliminan ni desplazan 40 aminoácidos que sean críticos para la conformación funcional del receptor. La bibliografía proporciona muchos modelos en los que puede efectuarse la selección de sustituciones aminoacídicas conservativas basándose en los estudios estadísticos y fisicoquímicos sobre la secuencia y/o estructura de una proteína natural.

[0015] Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica el receptor según el primer aspecto de la invención. 45

[0016] El ácido nucleico puede ser una molécula de ADN o una molécula de ARN (por ejemplo ARNm).

Preferiblemente, el ácido nucleico tiene una secuencia nucleotídica sustancialmente como se indica en la SEQ ID No. 11 (secuencia predicha para el fragmento N-terminal humano de SEQ ID No. 1 basándose en el uso de codón más común) o un derivado o variante funcional del mismo.

D	I	N	G	G	G	A	T	L	P	(SEQ ID NO. 1)
GAC	ATC	AAC	GGC	GGC	GGC	GCC	ACC	CTG	CCC	(SEQ ID NO. 11)
Q	P	L	Y	Q	T	A	A	V	L	
CAG	CCC	CTG	TAC	CAG	ACC	GCC	GCC	GTG	CTG	
T	A	G	F	A						
ACC	GCC	GGC	TTC	GCC						

5

[0017] Como alternativa, el ácido nucleico tiene una secuencia nucleotídica sustancialmente como se indica en la SEQ ID No. 14 (secuencia predicha para el fragmento N-terminal humano de SEQ ID No. 13 basándose en el uso de codón más común) o un derivado o variante funcional del mismo.

10

D	I	N	G	G	G	A	T	L	P	(SEQ ID NO. 13)
GAC	ATC	AAC	GGC	GGC	GGC	GCC	ACC	CTG	CCC	(SEQ ID NO. 14)
Q	K	L	Y	L	I	P	N	V	L	
CAG	AAG	CTG	TAC	CTG	ATC	CCC	AAC	GTG	CTG	

[0018] El ácido nucleico puede estar contenido en un vector adecuado para formar un vector recombinante. Por tanto, según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico según el segundo aspecto. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, cósmido o fago. Dichos vectores recombinantes son altamente útiles para transformar células con la molécula de ADN, para producir el receptor según el primer aspecto de la invención.

15

[0019] Los vectores recombinantes pueden incluir también otros elementos funcionales. Por ejemplo, los vectores recombinantes pueden diseñarse de tal modo que el vector se replique autónomamente en la célula. En este caso, pueden requerirse elementos que induzcan la replicación de ADN en el vector recombinante. Como alternativa, el vector recombinante puede diseñarse de tal modo que el vector y la molécula de ácido nucleico se integren en el genoma de una célula. En este caso, son deseables secuencias de ADN que favorezcan la integración orientada (por ejemplo, mediante recombinación homóloga). Los vectores recombinantes pueden tener también ADN que codifica genes que pueden usarse como marcadores seleccionables en el proceso de clonación. El vector recombinante puede comprender también adicionalmente un promotor o regulador para controlar la expresión del ácido nucleico según se requiera.

25

[0020] Se apreciará por el especialista en la materia que los derivados funcionales de las secuencias aminoacídicas y de ácidos nucleicos dadas a conocer en la presente memoria pueden tener una secuencia que tiene al menos un 30 %, preferiblemente un 40 %, más preferiblemente un 50 % y aún más preferiblemente un 60 % de identidad de secuencia con las secuencias aminoacídicas/polipeptídicas/de ácidos nucleicos de cualquiera de las secuencias designadas en la presente memoria. Se prevé también una secuencia aminoacídica/polipeptídica/de ácido nucleico con una identidad mayor de preferiblemente un 65 %, más preferiblemente un 75 %, aún más preferiblemente un 85 % y aún más preferiblemente un 90 % con cualquiera de las secuencias designadas. Preferiblemente, la secuencia aminoacídica/polipeptídica/de ácido nucleico tiene un 92 % de identidad, aún más preferiblemente un 95 % de identidad, aún más preferiblemente un 97 % de identidad, aún más preferiblemente un 98 % de identidad y, lo más preferiblemente, un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias designadas.

35

[0021] El cálculo de las identidades porcentuales entre dos secuencias aminoacídicas/polipeptídicas/de ácidos nucleicos diferentes puede llevarse a cabo como sigue. Se genera en primer lugar un alineamiento múltiple por el programa ClustalX (parámetros de apareamiento: abertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,1, matriz de proteínas Gonnet 250, matriz de ADN IUB; parámetros múltiples: abertura de hueco 10,0, extensión de hueco 0,2, retardo de las secuencias divergentes 30 %, valor de transición de ADN 0,5, matriz negativa desactivada, matriz de proteínas de la serie Gonnet, valor de ADN IUB; parámetros de hueco de proteína, penalizaciones específicas de

40

45

residuo activadas, penalizaciones hidrófilas activadas, residuos hidrófilos GPSNDQERK, distancia de separación de hueco 4, separación por hueco final desactivada). Se calcula entonces la identidad porcentual a partir del alineamiento múltiple como $(N/T) \times 100$, en que N es el número de posiciones en que las dos secuencias comparten un residuo idéntico y T es el número total de posiciones comparadas. Como alternativa, la identidad porcentual puede calcularse como $(N/S) \times 100$, en que S es la longitud de la secuencia más corta que se está comparando. Las secuencias aminoácidas/polipeptídicas/de ácidos nucleicos pueden sintetizarse *de novo* o pueden ser secuencias aminoácidas/polipeptídicas/de ácidos nucleicos nativas o un derivado de las mismas.

[0022] Como alternativa, se codificará una secuencia nucleotídica sustancialmente similar por una secuencia que hibride con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos designadas en la presente memoria o sus complementos en condiciones rigurosas. Se entiende por condiciones rigurosas que el nucleótido hibride con ADN o ARN unido a filtro en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) aproximadamente a 45 °C, seguido de al menos un lavado con 0,2 x SSC/0,1 % de SDS aproximadamente a 5-65 °C. Como alternativa, un polipéptido sustancialmente similar puede diferir en al menos 1, pero menos de 5, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos, de las secuencias peptídicas según la presente invención.

[0023] Debido a la degeneración del código genético, es evidente que podría variarse o cambiarse cualquier secuencia de ácido nucleico sin afectar sustancialmente a la secuencia de la proteína receptora codificada por la misma, proporcionando una variante funcional de la misma. Las variantes nucleotídicas adecuadas son aquellas que tienen una secuencia alterada por la sustitución de diferentes codones que codifican el mismo aminoácido en la secuencia, produciendo así un cambio silencioso. Son otras variantes adecuadas aquellas que tienen secuencias nucleotídicas homólogas pero que comprenden toda, o porciones de, la secuencia que están alteradas por la sustitución de diferentes codones que codifican un aminoácido con una cadena lateral de propiedades biofísicas similares al aminoácido que sustituyen, produciendo un cambio conservativo. Por ejemplo, los aminoácidos hidrófobos no polares pequeños incluyen glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina y metionina. Los aminoácidos hidrófobos no polares grandes incluyen fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos neutros polares incluyen serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen lisina, arginina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

[0024] El alineamiento exacto de las secuencias de proteína o ADN es un proceso complejo que se ha investigado con detalle por una serie de investigadores. Es de particular importancia la compensación entre una coincidencia óptima de secuencias y la introducción de huecos para obtener dicha coincidencia. En el caso de proteínas, los medios mediante los que se puntúan las coincidencias son también significativos. La familia de las matrices PAM (por ejemplo, Dayhoff, M. y col., 1978, "Atlas of protein sequence and structure", Natl. Biomed. Res. Found.) y las matrices BLOSUM cuantifican la naturaleza y probabilidad de las sustituciones conservativas y se usan en algoritmos de alineamiento múltiple, aunque serán conocidas otras matrices igualmente aplicables por los especialistas en la materia. El popular programa de alineamiento múltiple ClustalW y su versión para Windows ClustalX (Thompson y col., 1994, Nucleic Acids Research, 22, 4673-4680; Thompson y col., 1997, Nucleic Acids Research, 24, 4876-4882) son modos eficaces de generar alineamientos múltiples de proteína y ADN.

[0025] Los alineamientos generados automáticamente requieren frecuentemente un alineamiento manual que explote el conocimiento del usuario entrenado sobre la familia de proteínas estudiada, por ejemplo, el conocimiento biológico de los sitios conservados clave. Es uno de dichos programas editores de alineamiento Align (<http://www.gwdg.de/~dhepper/download/>; Hepperle, D., 2001: Multicolor Sequence Alignment Editor. Institute of Freshwater Ecology and Inland Fisheries, 16775 Stechlin, Alemania), entre otros tales como JalView o Cinema que son también adecuados.

[0026] El cálculo de las identidades porcentuales entre proteínas ocurre durante la generación de alineamientos múltiples por Clustal. Sin embargo, estos valores tienen que recalcularse si el alineamiento se ha mejorado manualmente o para la comparación deliberada de dos secuencias. Los programas que calculan este valor para pares de secuencias proteicas en un alineamiento incluyen PROTDIST en el paquete de filogenia PHYLIP (Felsenstein; <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>) que usa la opción de "Tabla de similitudes" como modelo para la sustitución aminoácida (P). Para ADN/ARN, existe una opción idéntica en el programa DNADIST de PHYLIP.

[0027] Se prevén también otras modificaciones en las secuencias proteicas y dentro del alcance de la invención reivindicada, concretamente, aquellas que ocurren durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante acetilación, amidación, carboxilación, fosforilación, escisión proteolítica o ligamiento con un ligando.

- [0028]** Se apreciará que el conocimiento del receptor según el primer aspecto de la invención permitió a los inventores desarrollar agentes que modulan la actividad del receptor y gestionar clínicamente así la caquexia. La presente invención proporciona también un uso médico para dichos agentes. Por tanto, según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un agente que reduce la actividad biológica del receptor de PIR según el primer aspecto de la invención para uso como medicamento.
- [0029]** Según un quinto aspecto de la invención, se proporciona el uso de un agente que reduce la actividad biológica del receptor de PIF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de caquexia.
- 10 **[0030]** Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para el tratamiento de caquexia que comprende administrar a un sujeto necesitado de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que reduce la actividad biológica del receptor de PIF.
- [0031]** Los agentes capaces de reducir la actividad biológica del PIF pueden conseguir su efecto mediante
15 una serie de medios. Por ejemplo, dichos agentes pueden:
- (a) reducir la expresión del receptor de PIF;
 - (b) aumentar la desensibilización del receptor o la degradación del receptor;
 - (c) reducir la interacción entre el PIF y su receptor endógeno;
 - 20 (d) reducir la señalización intracelular mediada por el receptor de PIF;
 - (e) competir con los receptores de PIF endógenos por la unión de PIF;
 - (f) unirse al receptor de PIF para bloquear la unión de PIF; o
 - (g) unirse al PIF evitando la interacción con el receptor.
- 25 **[0032]** Se prefiere que el agente interaccione directamente con el receptor de PIF (concretamente, (e) y (f) anteriores) o que actúe inhibiendo la transcripción o traducción del receptor de PIF (a) anterior. Se apreciará que dichos agentes pueden diseñarse solo a la vista del conocimiento de la secuencia del receptor de PIF según el primer aspecto de la invención.
- 30 **[0033]** Es un agente preferido para uso según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la presente invención un anticuerpo neutralizante creado contra el receptor de PIF. Dichos anticuerpos representan un rasgo importante de la invención. Por tanto, según un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo, o un derivado funcional del mismo, contra el receptor de PIF según el primer aspecto de la invención.
- 35 **[0034]** El anticuerpo bloquea preferiblemente la señalización intracelular mediada por el receptor de PIF. Esto puede ser bloqueando el sitio de unión a ligando en el receptor o puede disociar el receptor de su ruta de transducción de señal por algún medio alostérico.
- [0035]** Los anticuerpos según la invención pueden producirse como sueros policlonales inyectando antígeno a
40 animales. Los anticuerpos policlonales preferidos pueden crearse inoculando un animal (por ejemplo un conejo) con antígeno, usando técnicas conocidas en la materia. El antígeno puede ser todo el receptor de PIF (en forma glucosilada o no glucosilada) o un fragmento del mismo. Los fragmentos preferidos para generar anticuerpos son los péptidos de SEQ ID No. 1-10 o 13. Se crea un anticuerpo policlonal preferido contra el péptido de SEQ ID No.1 como se describe en los ejemplos. Se crea otro anticuerpo policlonal preferido contra el péptido de SEQ ID No. 13.
- 45 **[0036]** Como alternativa, el anticuerpo puede ser monoclonal y crearse en ratones. Pueden usarse técnicas de hibridoma convencionales para crear los anticuerpos. El antígeno usado para generar anticuerpos monoclonales según la presente invención puede ser todo el receptor de PIF (en forma glucosilada o no glucosilada) o un fragmento del mismo.
- 50 **[0037]** Los fragmentos preferidos para generar anticuerpos son los péptidos de SEQ ID No. 1-10 o 13.
- [0038]** Se prefiere que el anticuerpo sea una γ -inmunoglobulina (IgG).
- 55 **[0039]** Se apreciará que la región variable de un anticuerpo define la especificidad del anticuerpo y, como tal, esta región debería estar conservada en los derivados funcionales del anticuerpo según la invención. Las regiones más allá de los dominios variables (dominios C) son de secuencia relativamente constante. Se apreciará que el rasgo característico de los anticuerpos según la invención son los dominios V_H y V_L . Se apreciará adicionalmente que la naturaleza precisa de los dominios C_H y C_L no es crítica para la invención en conjunto. De hecho, los

anticuerpos preferidos según la invención pueden tener diferentes dominios C_H y C_L . Además, como se discute más detalladamente a continuación, los derivados funcionales de anticuerpo preferidos pueden comprender los dominios variables sin un dominio C (por ejemplo, anticuerpos scFV).

5 **[0040]** Los inventores han encontrado que los anticuerpos, o derivados funcionales de los mismos, según el séptimo aspecto de la invención tienen una eficacia sorprendente para prevenir el desarrollo de caquexia en pacientes de cáncer.

[0041] Un derivado de anticuerpo puede tener un 75 % de identidad de secuencia, más preferiblemente un 90
10 % de identidad de secuencia y lo más preferiblemente tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con un anticuerpo monoclonal o anticuerpo específico en una mezcla policlonal. Se apreciará que la mayoría de variaciones de secuencia ocurrirán en las regiones variables (FR), mientras que la secuencia de las CDR de los anticuerpos, y derivados funcionales de los mismos, es la más conservada.

15 **[0042]** Una serie de realizaciones preferidas del séptimo aspecto de la invención se refieren a moléculas con dominios tanto variables como constantes. Sin embargo, se apreciará que están también comprendidos fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos scFV) por la invención, que comprenden esencialmente la región variable de un anticuerpo sin ninguna región constante.

20 **[0043]** Es conocido que los anticuerpos generados en una especie tienen varios graves inconvenientes cuando se usan para tratar una especie diferente. Por ejemplo, cuando se usan anticuerpos de murino en seres humanos, tienden a tener una semivida en circulación sérica corta y se reconocen como proteínas extrañas por el paciente que se está tratando. Esto conduce al desarrollo de una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (o rata) indeseada. Esto es particularmente problemático cuando se requieren administraciones frecuentes del anticuerpo,
25 ya que puede potenciar el aclaramiento del mismo, bloquear su efecto terapéutico e inducir reacciones de hipersensibilidad. Por consiguiente, los anticuerpos preferidos (si son de fuente no humana) para uso en terapia humana están humanizados.

[0044] Los anticuerpos monoclonales se generan mediante la técnica de hibridoma, que implica habitualmente
30 la generación de mAb no humanos. La técnica permite producir anticuerpos monoclonales de roedor con casi cualquier especificidad. Por consiguiente, las realizaciones preferidas de la invención pueden usar dicha técnica para desarrollar anticuerpos monoclonales contra el receptor de PIF. Aunque dichos anticuerpos son terapéuticamente útiles, se apreciará que dichos anticuerpos no son agentes terapéuticos ideales en seres humanos (como se sugiere anteriormente). Idealmente, los anticuerpos monoclonales humanos serían la elección preferida
35 para aplicaciones terapéuticas, sin embargo, la generación de mAb humanos usando técnicas de fusión celular convencionales no ha sido muy exitosa hasta la fecha. El problema de la humanización puede resolverse al menos parcialmente genomaniplando anticuerpos que usan secuencias de la región V de mAb no humanos (por ejemplo de roedor) y secuencias de la región C (e idealmente FR de la región V) de anticuerpos humanos. Los mAb "genomaniplados" resultantes son menos inmunogénicos en seres humanos que los mAb de roedores de los que
40 derivan y son así mejor adecuados para uso clínico.

[0045] Los anticuerpos humanizados pueden ser anticuerpos monoclonales quiméricos en que, usando la tecnología de ADN recombinante, se reemplazan regiones constantes de inmunoglobulina de roedor por regiones
45 constantes de anticuerpos humanos. Los genes de la cadena H y cadena L quiméricos pueden clonarse entonces en vectores de expresión que contienen elementos reguladores adecuados e introducirse en células de mamífero para producir anticuerpos totalmente glucosilados. Al elegir un gen de la región C de cadena H humano apropiado para este proceso, la actividad biológica del anticuerpo puede estar predeterminada. Dichos anticuerpos quiméricos son superiores a los anticuerpos monoclonales no humanos en que su capacidad de activar las funciones efectoras puede ajustarse para una aplicación terapéutica específica, y la respuesta antiglobulina que inducen es reducida.

50 **[0046]** Dichas moléculas quiméricas son agentes preferidos para tratar caquexia según la presente invención. Puede usarse PCR-TI para aislar los genes de V_N y V_L de mAb preferidos, clonarlos y usarlos para construir una versión quimérica del mAb que poseen dominios humanos.

55 **[0047]** Una humanización adicional de los anticuerpos puede implicar el injerto de CDR o la reconformación de los anticuerpos. Dichos anticuerpos se producen transplantando las CDR de cadena pesada y ligera de un mAb de roedor (que conforman el sitio de unión a antígeno del anticuerpo) a las correspondientes regiones variables de un anticuerpo humano.

[0048] Un agente preferido adicional para uso según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la presente invención es un receptor de PIF soluble o un derivado funcional o fragmento del mismo según el primer aspecto de la invención. El receptor de PIF es una proteína integral de la membrana plasmática. Los inventores han encontrado que pueden introducirse receptores solubles según el primer aspecto de la invención en un tejido diana y que 5 competirán por el PIF endógeno. La unión de PIF al receptor soluble no ejercerá un efecto fisiológico porque el receptor soluble no está ligado a una ruta de señalización intracelular. Por consiguiente, dichos agentes son eficaces para reducir la caquexia mediada por el receptor de PIF. Pueden usarse también fragmentos peptídicos del receptor de PIF como agentes según la invención. Los inventores creen que el sitio de unión a PIF en el receptor puede estar en la porción terminal. Por lo tanto, se prefiere que el agente sea un fragmento N-terminal del receptor de PIF. Por 10 ejemplo, el agente puede ser el péptido de SEQ ID NO. 1 (véase el ejemplo 3) o de SEQ ID NO. 13.

[0049] Los derivados de agentes peptídicos usados según la invención incluyen derivados que aumentan la semivida del agente *in vivo*. Los ejemplos de derivados capaces de aumentar la semivida de polipéptidos según la invención incluyen derivados peptoides, derivados de D-aminoácidos e híbridos péptido-peptoides.

15 **[0050]** Las proteínas y agentes peptídicos según la presente invención pueden someterse a degradación por una serie de medios (tales como actividad proteasa en un sitio diana). Dicha degradación puede limitar su biodisponibilidad y por tanto su utilidad terapéutica. Existe una serie de técnicas bien establecidas mediante las que pueden diseñarse y producirse derivados peptídicos que tienen una estabilidad potenciada en contextos biológicos. 20 Dichos derivados peptídicos pueden tener una biodisponibilidad mejorada como resultado de una resistencia aumentada a la degradación mediada por proteasa. Preferiblemente, un derivado adecuado para uso según la invención es más resistente a proteasa que la proteína o péptido del que deriva. La resistencia a proteasa de un derivado peptídico y de la proteína o péptido de que deriva puede evaluarse mediante ensayos de degradación de proteína bien conocidos. Pueden entonces compararse los valores relativos de resistencia a proteasa del derivado 25 peptídico y del péptido.

[0051] Los derivados peptoides de las proteínas y péptidos según la invención pueden diseñarse fácilmente a partir del conocimiento de la estructura del receptor según el primer aspecto de la invención o de un agente según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención. Puede usarse un software comercialmente disponible para 30 desarrollar derivados peptoides según protocolos bien establecidos.

[0052] Los retropeptoides (en que todos los aminoácidos están reemplazados por residuos peptoides en orden inverso) son también capaces de imitar proteínas o péptidos según la invención. Se espera que un retropeptido se una en la dirección contraria en el surco de unión a ligando, en comparación con un péptido o 35 híbrido peptido-péptido que contiene un residuo peptido. Como resultado, las cadenas laterales de los residuos peptoides pueden apuntar en la misma dirección que las cadenas laterales del péptido original.

[0053] Una realización adicional de una forma modificada de péptidos o proteínas según la invención comprende formas de D-aminoácidos. En este caso, se invierte el orden de los residuos aminoácidos. La 40 preparación de péptidos usando D-aminoácidos en lugar de L-aminoácidos reduce en gran medida cualquier degradación indeseada de dicho derivado por procesos metabólicos normales, reduciendo las cantidades de derivado que tienen que administrarse junto con su frecuencia de administración.

[0054] Un agente preferido adicional según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención es una molécula 45 de ADN o ARN anticodificante que se unirá a transcritos de receptor de PIF endógeno. Dichas moléculas anticodificantes reducen la expresión del receptor de PIF y reducen así la actividad mediada por PIF. Las moléculas anticodificantes preferidas representan la forma anticodificante de los ácidos nucleicos según el segundo aspecto de la invención. A modo de ejemplo, la secuencia de una molécula anticodificante del receptor sería:

5' GGCGAAGCCGGCGGT CAGCACGGCGGCGGTCTGGTACAGGGGCTGGGGCAGGGTGGCGCCGCCGCC
50 GTTGTATGTC...3' (SEQ ID NO. 12)

[0055] La molécula complemento inverso de SEQ ID NO. 12 actúa como la forma anticodificante de los 25 aminoácidos N-terminales de SEQ ID NO. 1.

5' CAGCACGTTGGGGATCAGGTACAGCTTCTGGGGCAGGGTGGCGCCGCCGCCGTTGTATGTC...3' (SEQ ID
55 NO. 15)

[0056] La molécula complemento inverso de SEQ ID NO. 15 actúa como la forma anticodificante de los 20 aminoácidos N-terminales de SEQ ID NO. 13.

[0057] Puede usarse también ARNip como agente según la invención. El ARNip forma parte de un mecanismo de silenciamiento génico conocido como interferencia de ARN (iARN), que da como resultado la destrucción específica de secuencia de ARNm y permite una eliminación orientada de la expresión génica. El ARNip usado en el silenciamiento génico puede comprender ARN bicatenario de 21 nucleótidos de longitud, típicamente con un saliente de 2 nucleótidos en cada extremo 3'. Como alternativa, pueden usarse ARN de horquilla cortos (ARNhc) que usan secuencias codificantes y anticodificantes conectadas por un bucle de horquilla. Tanto los ARNip como los ARNhc pueden sintetizarse químicamente e introducirse en células para iARN transitoria o expresarse endógenamente por un promotor para la inhibición de largo plazo de la expresión génica. Las moléculas de ARNip para uso como agente según la invención pueden comprender ARN bicatenario de 10-50 nucleótidos. Preferiblemente, los ARNip para uso como agente según la invención comprenden 18-30 nucleótidos. Más preferiblemente, los ARNip para uso como agente según la invención comprenden 21-25 nucleótidos. Y lo más preferiblemente, los ARNip para uso como agente según la invención comprenden 21 nucleótidos. Se apreciará que los ARNip tendrán que estar basados en las secuencias según el segundo aspecto de la invención. Las moléculas de ARNip bicatenarias preferidas comprenden una hebra codificante de 21-25 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO. 11 unida con la hebra anticodificante complementaria (por ejemplo, como se define en la SEQ. ID NO. 12). Como alternativa, pueden usarse ARNhc que usan secuencias codificantes y anticodificantes como agente según la invención. Preferiblemente, los ARNhc que usan secuencias codificantes y anticodificantes que pueden emplearse como agente según la invención comprenden 20-100 nucleótidos. Más preferiblemente, los ARNhc que usan secuencias codificantes y anticodificantes que pueden emplearse como agente según la invención comprenden 42 nucleótidos y pueden comprender 21 nucleótidos de SEQ ID NO. 11 ligados con los 21 nucleótidos complementarios de SEQ ID NO. 12 (o SEQ ID NO. 14 ligada con 15). Como para los ARNip, se apreciará que los ARNhc tendrán que estar basados en las secuencias según el segundo aspecto de la invención.

[0058] Los inventores han descubierto que el PIF se une a su receptor mediante cadenas oligosacáridas. Por consiguiente, otros agentes preferidos tienen una configuración similar de oligosacáridos a la encontrada en PIF y/o su receptor (por ejemplo, sulfato de condroitina u otros oligosacáridos sulfoides). Dichos agentes compiten con el PIF por la unión al receptor y son por lo tanto útiles para reducir la caquexia.

[0059] Los agentes según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención pueden tomar una serie de formas diferentes dependiendo, en particular, de la manera en que se vaya a usar la composición. Por tanto, por ejemplo, una composición que comprende el agente puede estar en forma de polvo, comprimido, cápsula, líquido, ungüento, crema, gel, hidrogel, aerosol, pulverizador, micela, parche transdérmico, liposoma o cualquier otra forma adecuada que pueda administrarse a una persona o animal. Se apreciará que el vehículo de la composición de la invención debería ser uno bien tolerado por el sujeto al que se administra y que permita el suministro de la composición al cerebro.

[0060] La composición de la invención puede usarse en una serie de modos. Por ejemplo, puede requerirse administración sistémica, en cuyo caso el agente puede estar contenido en una composición que puede, por ejemplo, ingerirse por vía oral en forma de un comprimido, cápsula o líquido. Como alternativa, la composición puede administrarse mediante inyección en la corriente sanguínea. Las inyecciones pueden ser intravenosas (en bolo o infusión) o subcutáneas (en bolo o infusión) o intramusculares. Los agentes pueden administrarse por inhalación (por ejemplo, por vía intranasal). Los agentes pueden administrarse también por vía central mediante suministro intracerebral, intracerebroventricular o intratecal.

[0061] Los agentes pueden incorporarse también a un dispositivo de liberación lenta o retardada. Dichos dispositivos pueden insertarse, por ejemplo, en o bajo la piel, y el agente puede liberarse durante semanas o incluso meses. Dicho dispositivo puede ser particularmente útil para pacientes enfermos crónicos. Los dispositivos pueden ser particularmente ventajosos cuando se usa un agente que requeriría normalmente una administración frecuente (por ejemplo, al menos una ingestión diaria de un comprimido o inyección diaria).

[0062] Se apreciará que la cantidad de agente necesaria se determina mediante la actividad biológica y la biodisponibilidad, que a su vez dependen del modo de administración, de las propiedades fisicoquímicas del agente empleado y de si se está usando como monoterapia o en una terapia combinada. La frecuencia de administración se influirá también por los factores anteriormente mencionados, y particularmente la semivida del agente en el sujeto que se está tratando.

[0063] Las dosificaciones óptimas para administrar pueden determinarse por los especialistas en la materia, y variarán con el agente particular usado, la concentración de la preparación, el modo de administración y el avance de la afección patológica (por ejemplo, la gravedad de la caquexia o eventualmente la etapa de desarrollo del cáncer). Los factores adicionales dependientes del sujeto particular que se esté tratando que darán como resultado la necesidad de ajustar dosificaciones incluyen la edad, peso, género y dieta del sujeto y el momento de administración.

[0064] Pueden usarse procedimientos conocidos, tales como los empleados convencionalmente por la industria farmacéutica (por ejemplo, experimentación *in vivo*, ensayos clínicos, etc.), para establecer las formulaciones específicas de las composiciones y los regímenes terapéuticos precisos (tales como las dosis diarias de los compuestos y la frecuencia de administración).

[0065] Generalmente, puede usarse una dosis diaria de entre 0,01 µg/kg de peso corporal y 1,0 g/kg de peso corporal de un agente (por ejemplo, un receptor soluble basado en la SEQ ID NO. 1) para el tratamiento de caquexia. La cantidad usada dependerá de qué agente específico se use. Más preferiblemente, la dosis diaria está entre 0,01 mg/kg de peso corporal y 100 mg/kg de peso corporal.

[0066] Las dosis diarias pueden administrarse como una administración única (por ejemplo, un comprimido diario para consumo oral o como una inyección diaria única). Como alternativa, el agente usado puede requerir la administración dos o más veces durante el día. Como ejemplo, puede administrarse un agente en forma de dos (o más, dependiendo de la gravedad de la caquexia) dosis diarias de entre 25 mg y 5000 mg en forma de comprimido. Un paciente que recibe tratamiento puede tomar una primera dosis tras levantarse y entonces una segunda dosis por la tarde (si es un régimen de dos dosis) o a intervalos de 3 o 4 horas después de ello. Como alternativa, puede usarse un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas a un paciente sin necesidad de administrar dosis repetidas.

[0067] El uso de un anticuerpo creado contra el receptor de PIF como agente según la invención puede implicar la administración del mismo en forma de una dosis por semana, dos dosis por semana o tres dosis por semana (o más, dependiendo de la gravedad de la caquexia) de entre 25 mg y 5000 mg en forma inyectable. Como alternativa, puede usarse un dispositivo de liberación lenta para proporcionar dosis óptimas a un paciente sin necesidad de administrar dosis repetidas.

[0068] Esta invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la cantidad del agente (por ejemplo, un receptor soluble) es una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 800 mg. En otra realización, la cantidad es de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg.

[0069] En una realización adicional, el vehículo es un líquido y la composición es una disolución. En otra realización, el vehículo es un sólido y la composición es un comprimido. En una realización adicional, el vehículo es un gel y la composición es un supositorio.

[0070] Los agentes se combinan preferiblemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de la administración.

[0071] En la invención en cuestión, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es cualquier cantidad de un agente que, cuando se administra a un sujeto que padece una enfermedad para la que es eficaz el agente, causa la reducción, remisión o regresión de la caquexia mediante la conservación de la masa corporal magra. Un "sujeto" es un vertebrado, mamífero, animal doméstico o, preferiblemente, un ser humano.

[0072] En la práctica de esta invención, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" es cualquier vehículo fisiológico conocido por los especialistas en la materia útil en la formulación de composiciones farmacéuticas.

[0073] En una realización, el vehículo farmacéutico puede ser un líquido y la composición farmacéutica estará en forma de disolución. En otra realización, el vehículo farmacéuticamente aceptable es un sólido y la composición está en forma de un polvo o comprimido. En una realización adicional, el vehículo farmacéutico es un gel y la composición está en forma de un supositorio o crema. En una realización adicional, el agente o composición puede formularse como parte de un parche transdérmico farmacéuticamente aceptable.

- [0074]** Un vehículo sólido puede incluir una o más sustancias que pueden actuar también como agentes aromatizantes, lubricantes, solubilizantes, agentes de suspensión, cargas, deslizantes, auxiliares de compresión, aglutinantes o agentes disgregantes de comprimido; también puede ser un material encapsulante. En polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está mezclado con el ingrediente activo finamente dividido. En comprimidos, el ingrediente activo está mezclado con un vehículo que tiene las propiedades de compresión necesarias en proporciones adecuadas y compactado a la forma y tamaño deseados. Los polvos y comprimidos contienen preferiblemente hasta un 99 % de ingrediente activo. Los vehículos sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares, lactosa, dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico.
- [0075]** Se usan vehículos líquidos en la preparación de disoluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes, elixires y composiciones a presión. El ingrediente activo puede estar disuelto o suspendido en un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable tal como agua, un disolvente orgánico, una mezcla de ambos o aceites o grasas farmacéuticamente aceptables. El vehículo líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados tales como solubilizantes, emulsionantes, tampones, conservantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes u osmorreguladores. Los ejemplos adecuados de vehículos líquidos para administración oral y parenteral incluyen agua (que contiene parcialmente aditivos como anteriormente, por ejemplo, derivados de celulosa, preferiblemente disolución de carboximetilcelulosa), alcoholes (incluyendo alcoholes monohidroxílicos y alcoholes polihidroxílicos, por ejemplo glicoles) y sus derivados y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de cacahuete). Para administración parenteral, el vehículo puede ser también un éster de aceite tal como oleato de etilo y miristato de isopropilo. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones en forma líquida estériles para administración parenteral. El vehículo líquido para composiciones a presión puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propelente farmacéuticamente aceptable.
- [0076]** Las composiciones farmacéuticas líquidas que son disoluciones o suspensiones estériles pueden utilizarse, por ejemplo, para inyección intramuscular, intratecal, epidural, intraperitoneal o subcutánea.
- [0077]** Las disoluciones estériles pueden administrarse también por vía intravenosa. Los agentes pueden prepararse en forma de una composición sólida estéril que puede disolverse o suspenderse en el momento de administración usando agua estéril, disolución salina u otro medio inyectable estéril apropiado. Se pretende que los vehículos incluyan los aglutinantes, agentes de suspensión, lubricantes, aromatizantes, edulcorantes, conservantes, tintes y recubrimientos inertes necesarios.
- [0078]** Los agentes pueden administrarse por vía oral en forma de una disolución o suspensión estéril que contiene otros solutos o agentes de suspensión (por ejemplo, suficiente disolución salina o glucosa para hacer isotónica la disolución), sales biliares, goma arábiga, gelatina, monooleato de sorbitán, polisorbato 80 (ésteres de oleato de sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con óxido de etileno) y similares.
- [0079]** También puede administrarse un agente por vía oral en forma de composición líquida o sólida. Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen formas sólidas, tales como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos y polvos, y formas líquidas tales como disoluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Las formas útiles para administración parenteral incluyen disoluciones, emulsiones y suspensiones estériles.
- [0080]** Los agentes pueden combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable y otro agente terapéuticamente activo antes de la administración. El otro agente terapéuticamente activo puede ser para el tratamiento de cáncer o caquexia.
- [0081]** El conocimiento del receptor de PIF ha permitido a los inventores desarrollar un cribado para identificar si los compuestos de ensayo son o no presuntos agentes para uso según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención. Por tanto, según un octavo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de cribado de un compuesto para ensayar si el compuesto tiene o no eficacia para tratar la caquexia, que comprende
- (i) exponer células o membranas que comprenden receptores de PIF según el primer aspecto de la invención a un compuesto de ensayo durante un periodo predeterminado de tiempo;
 - (ii) detectar la actividad o expresión del receptor de PIF; y
 - (iii) comparar la actividad o expresión de los receptores de PIF en las células o membranas tratadas con el

compuesto respecto a la actividad o expresión encontrada en células o membranas de control que no se trataron con el compuesto,

en el que los compuestos con eficacia para tratar caquexia reducen la actividad o reducen la expresión del receptor de PIF respecto a los controles.

[0082] Se apreciará que el procedimiento según el octavo aspecto de la invención puede adaptarse de tal modo que se use para ensayar si un compuesto causa o no caquexia. Por lo tanto, según un noveno aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento de cribado de un compuesto para ensayar si el compuesto causa o no caquexia que comprende:

(i) exponer células o membranas que comprenden receptores de PIF según el primer aspecto de la invención a un compuesto de ensayo durante un periodo predeterminado de tiempo;

(ii) detectar la actividad o expresión del receptor de PIF; y

(iii) comparar la actividad o expresión de los receptores de PIF en las células o membranas tratadas con el compuesto respecto a la actividad o expresión encontrada en las células o membranas de control que no se trataron con el compuesto,

en el que los compuestos que causan caquexia aumentan la actividad o expresión del receptor de PIF respecto a los controles.

[0083] Con referencia a “detectar la actividad o expresión del receptor de PIF” según el octavo y noveno aspectos de la presente invención, se entiende por “actividad” del receptor de PIF la detección de la unión ligando-receptor; la detección de la transducción de señal intracelular mediada por receptor o la determinación de un efecto fisiológico como criterio de valoración. Se entiende por “expresión” la detección de la proteína receptora en la membrana celular, el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi o la detección del ARNm que codifica la proteína receptora.

[0084] Los procedimientos de cribado de la invención están basados en la comprensión por los inventores de que la extensión de la expresión y/o actividad del receptor de PIF puede estar estrechamente relacionada con el desarrollo de caquexia.

[0085] Las células usadas según el octavo o noveno aspectos de la invención pueden estar contenidas en un animal experimental (por ejemplo, un ratón o rata) cuando el procedimiento es un ensayo *in vivo*. Como alternativa, las células pueden estar en una muestra de tejido (para los ensayos *ex vivo*) o las células pueden cultivarse en cultivo. Se apreciará que dichas células deberían expresar, o pueden inducirse a expresar, el receptor de PIF funcional.

[0086] También es posible usar células que no estén naturalmente predispuestas a expresar receptor de PIF a condición de que dichas células se transformen con un vector de expresión según el tercer aspecto de la invención. Dichas células representan células de ensayo preferidas para uso según la invención. Esto es debido a que las células animales, o incluso células procarióticas, pueden transformarse para expresar receptor de PIF humano y por lo tanto representan un buen modelo celular para ensayar la eficacia de los fármacos candidatos para uso en terapia humana.

[0087] Los procedimientos según el octavo y noveno aspectos de la invención pueden estar basados también en el uso de membranas celulares que comprenden el receptor de PIF o el receptor de PIF soluble aislado. Dichas membranas derivan preferiblemente de las células descritas anteriormente. Dichas membranas pueden no comprender receptores de PIF funcionales, pero pueden prepararse de modo que las membranas puedan usarse en procedimientos basados en la unión de receptor.

[0088] La actividad o expresión de receptores de PIF puede medirse usando una serie de técnicas convencionales.

[0089] El ensayo puede ser un ensayo basado en inmunoensayo. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos marcados (preferiblemente un anticuerpo marcado según el séptimo aspecto de la invención) en un inmunoensayo para evaluar los niveles de receptor en las células o membranas celulares. Dichos ensayos son particularmente

útiles cuando se evalúa si un agente modula o no la expresión, degradación o desensibilización del receptor de PIF (concretamente, el reciclaje de receptor). Los anticuerpos creados contra el sitio de unión a ligando pueden usarse también para evaluar si el compuesto de ensayo es o no un agonista o antagonista del receptor de PIF.

- 5 **[0090]** Como alternativa, pueden emplearse ensayos de unión a receptor convencionales (por ejemplo, que usan ligando PIF radiomarcado y/o compuestos de ensayo radiomarcados). Dicho ensayo puede implicar exponer membranas que comprenden el receptor de PIF a diversas concentraciones de [³⁵S]-PIF en ausencia o presencia de un compuesto de ensayo competitivo. Puede contarse la radioactividad unida y libre mediante la separación de las membranas del tampón mediante centrifugación o la recogida de membranas en filtros. Se describe en los ejemplos
- 10 un ensayo basado en la unión a receptor preferido.

[0091] Como alternativa, puede emplearse una actividad funcional que mide la actividad de PIF. Por ejemplo, el desarrollo de caquexia puede controlarse en un animal de ensayo.

- 15 **[0092]** Además, pueden usarse técnicas de biología molecular para detectar el receptor de PIF. Por ejemplo, puede generarse ADNc a partir de ARNm extraído de células o sujetos ensayados y diseñarse cebadores para amplificar las secuencias de ensayo usadas en una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para amplificar a partir de ADNc.

- 20 **[0093]** Cuando se usa un sujeto (por ejemplo, un modelo animal o incluso un modelo animal genomanipulado para expresar receptor de PIF humano), el compuesto de ensayo debería administrarse al sujeto durante un periodo predeterminado de tiempo y tomarse entonces una muestra del sujeto para ensayo de la actividad o expresión del receptor de PIF. La muestra puede ser, por ejemplo, de sangre o tejido de biopsia. Sin embargo, el ensayo puede ser funcional, en cuyo caso el criterio de valoración puede ser el control de la caquexia en el sujeto de ensayo.

- 25 **[0094]** La invención se ilustrará adicionalmente con los ejemplos y con referencia a los siguientes dibujos, en que:

- La Figura 1 muestra la unión de [³H]-péptido PIF a membranas C₂C₁₂ sin tratamiento (●) o después de incubación
- 30 con PNGasa F (■) u O-glucosidasa (▲) durante 24 h.

- La Figura 2A muestra los resultados de la electroforesis de membranas C₂C₁₂ que se solubilizaron en Triton al 1 %, y se cargaron 50 µg de proteína en cada pocillo de un gel de poliacrilamida-SDS al 15 %. Se sometieron a electroforesis las muestras y se transfirieron electroforéticamente a un filtro de nitrocelulosa que se había
- 35 prebloqueado durante una noche con tampón de bloqueo (Marvel al 5 % en PBS que contenía 0,1 % de Tween-20). Se transfirieron a los filtros concentraciones crecientes de [³⁵S]-PIF en tampón de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente. Las concentraciones de [³⁵S]-PIF fueron: hilera 1, 5 nM; hilera 2, 10 nM; hilera 3, 15 nM; hilera 4, 30 nM; hilera 5, 60 nM; hilera 6, 80 nM y hilera 7, 100 nM. Se lavó el filtro tres veces con PBS que contenía 0,1 % de Tween-20, se secó al aire y se procesó para autorradiografía. Se extrajeron las bandas de 40 kDa de cada hilera y
- 40 se contó directamente la radiactividad (19); B muestra un registro de un filtro de nitrocelulosa sobre el que se transfirieron electroforéticamente proteínas de membranas y se transfirió [³⁵S]-PIF (30 nM) solo, hilera 1; o junto con PIF no marcado 10 nM, hilera 2; 20 nM, hilera 3; 40 nM, hilera 4; 80 nM, hilera 5; 160 nM, hilera 6 y 320 nM, hilera 7, en tampón de bloqueo durante 2 h a temperatura ambiente y se procesó para autorradiografía.

- 45 La Figura 3 muestra fracciones radiactivas aisladas de membrana C₂C₁₂ que se sometieron a electroforesis en PAGE-SDS al 15 %, en que el receptor aparecía como una única proteína de una Mr aparente de 40 kDa (1-marcadores de peso molecular, 2,3,4 – fracciones de la columna).

- La Figura 4 muestra una representación gráfica de la degradación proteica de miotubos de C₂C₁₂ en respuesta a PIF
- 50 en ausencia (■) y presencia (●) del fragmento N-terminal del receptor de PIF (10 µM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como a, p < 0,05; b, p < 0,01 y c, p < 0,001. Las diferencias entre el grupo de péptido @ y el grupo de control se indican como d, p < 0,05; e, p < 0,01 y f, p < 0,001.

- 55 La Figura 5 muestra una representación gráfica de la actividad de enzima similar a quimotripsina en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF en ausencia (□) y presencia (■) del fragmento N-terminal del receptor de PIF (10 µM). Análisis estadístico: Se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como a, p < 0,05 y la diferencia entre el grupo de péptido @ y el control se indica como d, p < 0,05.

La Figura 6A muestra una representación gráfica de la expresión de subunidades α de proteosoma de 20S en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y al péptido receptor de PIF (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 ® de control, 7 ® y PIF 2,1 nM, 8 ® y PIF 4,2 nM, 9 ® y PIF 10,5 nM, 10 ® y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como a, $p < 0,05$. Las diferencias entre el grupo de péptido ® el grupo de control se indican como d, $p < 0,05$ y e, $p < 0,01$.

La Figura 6B muestra una representación gráfica de la expresión de MSS1 en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y al péptido receptor de PIF (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 ® de control, 7 ® y PIF 2,1 nM, 8 ® y PIF 4,2 nM, 9 ® y PIF 10,5 nM, 10 ® y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como b, $p < 0,05$. Las diferencias entre el grupo de péptido ® y el grupo de control se indican como e, $p < 0,01$ y f, $p < 0,001$.

La Figura 6C muestra una representación gráfica de la expresión de p42 en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y al péptido receptor de PIF (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 ® de control, 7 ® y PIF 2,1 nM, 8 ® y PIF 4,2 nM, 9 ® y PIF 10,5 nM, 10 ® y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como a, $p < 0,05$. Las diferencias entre el grupo de péptido ® y el grupo de control se indican como d, $p < 0,05$ y e, $p < 0,01$.

La Figura 6D muestra una representación gráfica de la expresión de E2_{14K} en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y al péptido receptor de PIF (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 ® de control, 7 ® y PIF 2,1 nM, 8 ® y PIF 4,2 nM, 9 ® y PIF 10,5 nM, 10 ® y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como b, $p < 0,01$. Las diferencias entre el grupo de péptido ® y el grupo de control se indican como e, $p < 0,01$.

La Figura 6E muestra una representación gráfica de la expresión de miosina en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y al péptido receptor de PIF (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 ® de control, 7 ® y PIF 2,1 nM, 8 ® y PIF 4,2 nM, 9 ® y PIF 10,5 nM, 10 ® y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como a, $p < 0,05$. Las diferencias entre el grupo de péptido ® y el grupo de control se indican como d, $p < 0,05$ y e, $p < 0,01$.

La Figura 7 muestra una fotografía de una transferencia Western usando antisueros antireceptor efectuada después de la purificación del anticuerpo añadiendo sulfato de amonio saturado al 50 % seguido de cromatografía en columna de proteína A:

1	5 µg de proteína receptora purificada
2	10 µg de proteína receptora purificada
3	20 µg de proteína receptora purificada
4	20 µg de proteína de fracción de membrana bruta
5	30 µg de proteína de fracción de membrana bruta
6	40 µg de proteína de fracción de membrana bruta.

La Figura 8 muestra una representación gráfica del efecto del anticuerpo del receptor de PIF a concentraciones entre 5 y 15 µg/ml sobre la degradación de proteína *in vitro* inducida por PIF. Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como b, $p < 0,01$, las diferencias entre el control y el antireceptor se indican como d, $p < 0,05$ y e, $p < 0,01$.

La Figura 9 muestra una representación gráfica del efecto del anticuerpo del receptor de PIF sobre el aumento de actividad de enzima similar a quimotripsina inducido por PIF. Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como c, $p < 0,001$, las diferencias entre el control y el antireceptor se indican como d, $p < 0,05$ y e, $p < 0,01$.

La Figura 10A muestra una representación gráfica de la expresión de subunidades α del proteosoma de 20S en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y anticuerpo antireceptor (10 µg/ml) (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF

2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 Ab α PIF de control, 7 Ab α PIF y PIF 2,1 nM, 8 Ab α PIF y PIF 4,2 nM, 9 Ab α PIF y PIF 10,5 nM, 10 Ab α PIF $\otimes$ y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como c, $p < 0,001$, las diferencias entre el antireceptor 10 mg/ml y PIF se indican como f, $p < 0,001$.

5

La Figura 10B muestra una representación gráfica de la expresión de MSS1 en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y anticuerpo antireceptor (10 μ g/ml) (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 Ab α PIF de control, 7 Ab α PIF y PIF 2,1 nM, 8 Ab α PIF y PIF 4,2 nM, 9 Ab α PIF y PIF 10,5 nM, 10 Ab α PIF $\otimes$ y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como b, $p < 0,01$; c, $p < 0,001$, las diferencias entre el antireceptor 10 μ g/ml y PIF se indican como d, $p < 0,05$; e, $p < 0,01$ y f, $p < 0,001$.

10

La Figura 10C muestra una representación gráfica de la expresión de p42 en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y anticuerpo antireceptor (10 μ g/ml) (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 Ab α PIF de control, 7 Ab α PIF y PIF 2,1 nM, 8 Ab α PIF y PIF 4,2 nM, 9 Ab α PIF y PIF 10,5 nM, 10 Ab α PIF $\otimes$ y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como c, $p < 0,001$, las diferencias entre el antireceptor 10 mg/ml y PIF se indican como f, $p < 0,001$.

15

La Figura 10D muestra una representación gráfica de la expresión de E2_{14k} en miotubos C₂C₁₂ en respuesta a PIF y anticuerpo antireceptor (10 μ g/ml) (leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 Ab α PIF de control, 7 Ab α PIF y PIF 2,1 nM, 8 Ab α PIF y PIF 4,2 nM, 9 Ab α PIF y PIF 10,5 nM, 10 Ab α PIF $\otimes$ y PIF 16,8 nM). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. La diferencia del control se indica como a, $p < 0,05$; b, $p < 0,01$, las diferencias entre el antireceptor 10 μ g/ml y PIF se indican como d, $p < 0,05$ y e, $p < 0,01$.

20

La Figura 10E representa una transferencia de actina como control de carga para mostrar que se han cargado cantidades iguales de proteína (PIF y anticuerpo antireceptor, 10 μ g/ml) en las Fig. A a D. (Leyenda de hilera: 1 PBS de control, 2 PIF 2,1 nM, 3 PIF 4,2 nM, 4 PIF 10,5 nM, 5 PIF 16,8 nM, 6 Ab α PIF de control, 7 Ab α PIF y PIF 2,1 nM, 8 Ab α PIF y PIF 4,2 nM, 9 Ab α PIF y PIF 10,5 nM, 10 Ab α PIF $\otimes$ y PIF 16,8 nM).

30

Figura 11A. Cambio de peso de ratones portadores del tumor MAC16 tratados diariamente por vía i.p. con y sin IgG anti-PIF. Estadísticamente significativo: c, $p < 0,001$ del control mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey posterior; B, volumen tumoral en ratones portadores del tumor MAC16 con y sin IgG anti-PIF.

35

Figura 12A. Síntesis de proteína en el músculo sóleo de ratones portadores del tumor MAC16 tratados con y sin IgG anti-PIF. Estadísticamente significativo: a, $p < 0,05$ del control mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey posterior.

40

La Figura 12B muestra el peso de músculo sóleo en proporción al peso corporal en comparación con controles tratados con disolvente. Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del disolvente se indican como b, $p < 0,01$.

45

La Figura 12C es una representación gráfica de los resultados del ensayo de liberación de tirosina para anticuerpo del receptor de PIF (3,47 mg/kg) *in vivo*. Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del disolvente se indican como c, $p < 0,001$.

50

La Figura 12D muestra el efecto del anticuerpo antireceptor (3,47 μ g/kg) sobre la actividad de enzima similar a quimotripsina en músculo gastrocnemio. Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del disolvente se indican como a, $p < 0,05$ y b, $p < 0,01$.

55

La Figura 13A muestra la representación gráfica de la expresión de subunidades α del proteosoma de 20S en músculo gastrocnemio en respuesta al anticuerpo antireceptor (3,47 mg/kg). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del disolvente se indican como c, $p < 0,001$. La diferencia entre el grupo anti-receptor y MAC16 se indica como f, $p < 0,001$.

La Figura 13B muestra una representación gráfica de la expresión de MSS1 en músculo gastrocnemio en respuesta al anticuerpo antirreceptor (3,47 mg/kg). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del control se indican como b, $p < 0,01$. La diferencia entre el grupo anti-receptor y MAC16 se indica como d, $p < 0,05$.

La Figura 13C muestra una representación gráfica de la expresión de p42 en músculo gastrocnemio en respuesta al anticuerpo antirreceptor (3,47 mg/kg). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del control se indican como a, $p < 0,05$. La diferencia entre el grupo anti-receptor y MAC16 se indica como e, $p < 0,001$.

La Figura 13D muestra una representación gráfica de la expresión de E2_{14k} en respuesta al anticuerpo antirreceptor (3,47 mg/kg). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del control se indican como b, $p < 0,01$. La diferencia entre el grupo anti-receptor y MAC16 se indica como e, $p < 0,001$.

La Figura 13E muestra una representación gráfica de la expresión de miosina en músculo gastrocnemio en respuesta al anticuerpo antirreceptor (3,47 mg/kg). Análisis estadístico: se determinó la diferencia media entre grupos mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Tukey posterior. Las diferencias del control se indican como b, $p < 0,01$. La diferencia entre el grupo anti-receptor y MAC16 se indica como d, $p < 0,05$.

La Figura 13F representa una expresión de transferencia de carga de control de actina en músculo gastrocnemio en respuesta al antireceptor (3,47 mg/kg) para mostrar que se han cargado cantidades iguales de proteína en las Fig. A a E.

25 EJEMPLO 1

[0095] La invención está basada en los siguientes experimentos, que se realizaron para investigar y caracterizar los sitios de unión a PIF en diversos tejidos.

30 1.1 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

[0096] **Productos químicos:** Se adquirieron suero fetal bovino, RPMI1640 y medio Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) en GIBCO-BRL (Escocia, Reino Unido).

35 [0097] Se aisló el anticuerpo monoclonal MAC16 del medio de cultivo de una línea celular de hibridoma (Todorov, P.T., McDevitt, T.M., Cariuk, P., Coles, B., Deacon, M. y Tisdale, M.J. "Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product". *Cancer Res.*, 56: 1256-1261, 1996.) usando una columna de proteína A-Sepharose.

40 [0098] Se adquirieron L-[2,6-³H]-fenilalanina (actividad específica 54 Cimmol⁻¹) y Na₂³⁵SO₄ (actividad específica 10-100 mCimmol⁻¹) en Amersham Int. (Buckinghamshire, Reino Unido).

[0099] Se adquirieron todos los productos químicos en Sigma Chemical Co., (Dorset, Reino Unido). Se suministró el fluido de centelleo Optiphase Hisafe 3 por Fisons (Loughborough, Reino Unido).

45 [0100] **Cultivo celular y propagación tumoral:** Se cultivó la línea celular de mioblasto de ratón C₂C₁₂ en placas Petri de 60 x 15 mm en 3 ml de DMEM suplementado con 12 % de suero fetal bovino, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de penicilina-estreptomicina en atmósfera humidificada de 5 % de CO₂ en aire a 37 °C. Se efectuaron todos los experimentos con mioblastos en células en estado subconfluente. Se mantuvieron las células MAC16 en medio RPMI 1640 que contenía 5 % de suero fetal bovino a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO₂ en aire. Se obtuvieron células musculares humanas normales, Hs94MU, de la European Collection of Cell Cultures (Wiltshire, Reino Unido) y se mantuvieron en medio Eagles modificado por Dulbecco que contenía glutamina 2 mM y 10 % de suero fetal bovino en atmósfera de 5 % de CO₂ en aire. Para el marcaje biosintético, la suspensión celular contenía Na₂³⁵SO₄ (1μCiml⁻¹) durante 48 h en medio RPMI 1640 que contiene 1,5 % de suero fetal bovino dializado.

55 [0101] Se implantaron en el flanco de ratones NRMI de pura cepa, criados en las instalaciones de los inventores, fragmentos del tumor MAC16 extraídos de animales donantes con una pérdida de peso establecida. La pérdida de peso es evidente 10-12 días después del trasplante, cuando el tumor se vuelve palpable. Se implantaron fragmentos del tumor MAC13 mediante el mismo procedimiento. Este tumor no produce pérdida de peso

durante el crecimiento.

[0102] Purificación de células PIF marcadas: Se sedimentaron mediante centrifugación a baja velocidad (1500 rpm durante 5 min en una centrífuga de sobremesa). Se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM, EGTA 0,5 mM y ditiotritol 1 mM, y se disoció usando un oscilador ultrasónico. Después de centrifugar (15.000 rpm durante 20 min), se añadió lentamente sulfato de amonio sólido (al 38 % p/v) al sobrenadante con agitación y se almacenó la mezcla durante una noche a 4 °C. Se retiró la sal de la muestra mediante ultrafiltración con una celda de filtración Amicon que contenía un filtro de membrana con un corte de peso molecular de 10.000 frente al tampón de sonicación. Se cargó la muestra concentrada sobre una columna de afinidad que contenía anticuerpo monoclonal de MAC16 (Todorov, y col. *Cancer Res. supra*) acoplado con Affi-Gel Hz (Bio-Rad, Hemel Hempstead, Reino Unido) equilibrado con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Después de una circulación de una noche a un caudal de 5 mlh⁻¹, se lavó la columna con Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, y se eluyó el material retenido con glicina-HCl 100 mM, pH 2,5. Después de neutralizar con Tris-HCl 1 M, pH 8,0, se concentraron las fracciones que contenían radiactividad mediante filtración Amicon frente a agua y se purificaron adicionalmente mediante cromatografía hidrófoba usando una columna Brownlee Aquopore RP-300 C₈ y un gradiente de acetonitrilo en agua como se ha descrito (Todorov, y col. *Cancer Res. supra* y Todorov, y col. *Nature. supra*). Se concentró el material que eluía a 55 % de acetonitrilo frente a agua usando una celda de filtración Amicon que contiene un filtro de membrana con un corte de peso molecular de 10.000.

[0103] Aislamientos de membrana: Se prepararon membranas de sarcolema a partir de músculo gastrocnemio de ratones portadores del tumor MAC16 o MAC13 esencialmente como se ha descrito (Ohlndieck, K., Ervasti, J.M., Snook, J.B. y Campbell, K.P. "Dystrophin-glycoprotein complex is highly enriched in isolated skeletal muscle sarcolemma". *J. Cell Biol.*, 112: 135-148, 1991). Brevemente, se extrajo músculo gastrocnemio (5 g) y se homogeneizó en pirofosfato de sodio 20 mM, fosfato de sodio 20 mM, MgCl₂ 1 mM, sacarosa 0,303 M, EDTA 0,5 mM, pH 7,0, que contenía los inhibidores de proteasa aprotinina (76,8 nM), leupeptina (1,1 µM), pepstatina A (0,7 µM), benzamida (0,83 mM), yodoacetamida (1 mM) y PMSF (0,23 mM). Se centrifugó el homogeneizado a 30.000 x g durante 30 min. Se obtuvieron microsomas ligeros a partir del sobrenadante después de añadir KCl sólido a una concentración final 0,6 M, seguido de centrifugación a 142.000 g durante 35 min. Se suspendieron los sedimentos en sacarosa 0,303 M, Tris-maleato 20 mM, pH 7,0 (tampón B) y se trataron de nuevo con KCl, seguido de centrifugación como se ha descrito. Se resuspendieron los sedimentos finales de microsomas ligeros en tampón B (6 ml) que contenía KCl 0,6 M y se cargaron alícuotas de 1 ml en 7 ml de sacarosa 0,878 M, KCl 0,6M, Tris-maleato 20 mM, pH 7,0, en tubos de centrifuga, y se centrifugaron a 112.000 g durante 17 h. Se recogió la fracción de membrana de superficie bruta en la interfase de sacarosa de 0,303 M/0,878 M, se resuspendió en tampón B y se almacenó congelada a -80 °C. Se prepararon membranas de sarcolema de músculo porcino mediante el mismo procedimiento.

[0104] Para las membranas celulares C₂C₁₂: Se llevó a cabo la homogeneización en HEPES 20 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, PMSF 0,5 mM y DTT 1 mM a 4 °C. Se centrifugó el homogeneizado a 20.000 rpm durante 30 minutos y se lavó con el mismo tampón. Se usó el sedimento para estudios de unión. Se prepararon membranas plasmáticas de adipocito a partir de adipocitos aislados del tejido adiposo epididímico de ratones B6W machos mediante una modificación del protocolo de Belsham y col. (Belsham, G.J., Denton, R.M. y Tanner, M.J.A. "Use of a novel rapid preparation of fat-cell plasma membranes employing percoll to investigate the effects of insulin and adrenaline on membrane protein phosphorylation within intact fat cells". *Biochem. J.*, 192: 457-467, 1980). Se aislaron esencialmente membranas plasmáticas de los demás componentes de un homogeneizado celular usando un gradiente Percoll autogenerado. Se lavaron las fracciones de membrana con tampón de NaCl, diluido en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, sacarosa 250 mM, EGTA 2 mM y PMSF 4 µM, a 1-2 mg.ml⁻¹, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta el uso. Se purificaron las membranas plasmáticas hepatocíticas mediante un esquema similar al de los adipocitos (Belsham y col. *supra*), que se había modificado para hepatocitos (Nakamura, T., Tomomura, A., Noda, C., Shimoji, M. e Ichihara, A. "Acquisition of a β-adrenergic response by adult rat hepatocytes during primary culture". *J. Biol. Chem.*, 258: 9283-9289, 1983).

[0105] Estudios de unión: Se incubaron membranas (200 µg de proteína suspendidos en 200 µl de PBS) durante 24 h a 4 °C con diversas concentraciones de [³⁵S]-PIF en 50 µl de PBS como se detalla en las leyendas de la figura. Se separaron las radiactividades unida y libre mediante centrifugación durante 5 min a 13.000 g.

[0106] Determinación de la constante de afinidad (K_{af}) de PIF por anticuerpo monoclonal: La afinidad de un anticuerpo por su antígeno puede estimarse si pueden medirse antígeno unido y libre cuando se permite unir una cantidad traza fija de antígeno con diluciones en serie de anticuerpo. La concentración de anticuerpo a la unión semimáxima es una medida de la afinidad.

[0107] Se purificó anticuerpo monoclonal a partir del sobrenadante de cultivo de tejido de un hibridoma como se ha descrito (Todorov, y col. Cancer Res. supra) usando una columna de proteína A. Se realizaron diluciones en serie del anticuerpo en el diluyente Tris-HCl 0,25 M, pH 8,5 con 2 % de suero de ternero y 1 % de Tween 20 hasta un factor de dilución final de 10^4 - 10^5 . Se yodó el PIF como se ha descrito ((Todorov, y col. Nature. supra) y se diluyó en el diluyente anterior de tal modo que 50 µl contuviesen 2×10^4 cpm. Se dispensó el anticuerpo monoclonal diluido (100 µl) en tubos, seguido de ^{125}I -PIF (50 µl) y se incubaron los tubos durante 2 h a temperatura ambiente. Se añadió entonces proteína A-Sepharose (100 µl) y se agitaron los tubos durante 2 h adicionales. Se añadió diluyente (3 ml) y se centrifugaron los tubos, se decantaron y se lavaron con otros 3 ml de diluyente. Se contó la fase sólida sedimentada final con un contador gamma.

[0108] Unión competitiva de ^{35}S -PIF: Se incubaron membranas C₂C₁₂ (200 µg) en PBS (250 µl) con 1, 5, 10, 50, 100, 500 o 1000 ng de cualquiera de anticuerpo monoclonal, condroitina, dermatano o sulfato de heparano y ^{35}S -PIF 20 nM (480 ng) durante una noche a 4 °C. Se determinó la radiactividad unida a partir de la radiactividad en el sedimento obtenido mediante centrifugación a 13.000 g durante 5 min.

[0109] Se determinó la K_{af} según una modificación (Clark, B.R. y Todd, C.W. "Avidin as a precipitant for biotin-labelled antibody in a radioimmunoassay for carcinoembryonic antigen". Anal. Biochem., 121: 257-262, 1982) del procedimiento de Muller (Muller, R. "Calculation of average antibody affinity in anti-hapten sera from data obtained by competitive radioimmunoassay". J. Immunol. Methods, 34: 345-352, 1980.)

$$K_{af} = 1/(I_t - T_t)(1 - 1,56 + 0,5b^2)$$

en que I_t es la concentración de inhibidor a un 50 % de inhibición de la unión de PIF; T_t la concentración de PIF total y b la fracción de PIF unida en ausencia de inhibidor.

[0110] Medida de la degradación proteica: Se marcaron mioblastos C₂C₁₂ con L-[2,6- ^3H]-fenilalanina (0,5 µCi, actividad específica 0,72 Cimmol⁻¹) durante 24 h. Después de marcar, se lavaron las células y se incubaron en medio reciente (3 ml) en presencia de PIF y cicloheximida (1 µM) durante el tiempo necesario y se midió la cantidad de radiactividad liberada en el medio. Se determinó la radiactividad unida a proteína lavando las células tres veces con PBS (1 ml, pH 7,4) enfriado con hielo y, después de retirar cualquier PBS residual, se continuó la incubación a 4 °C durante 20 min con ácido perclórico 0,2 M (1 ml). Se retiró el ácido perclórico y se reemplazó por 1 ml de NaOH 0,3 M a 4 °C durante 30 min, seguido de una incubación adicional a 37 °C durante 20 min. Se transfirió la disolución de NaOH que contenía las proteínas celulares disueltas a tubos limpios y se usó 1 ml adicional de NaOH 0,3 M para aclarar las placas. Se calculó la tasa de proteólisis dividiendo la radiactividad liberada al medio de incubación entre la radiactividad unida a proteína.

1.2 RESULTADOS

[0111] Se han realizado estudios de unión que usan ^{35}S -PIF, obtenido mediante el marcaje biosintético de células MAC16. Se purificó el radioligando de sobrenadantes celulares usando una combinación de cromatografía de afinidad seguida de HPLC en fase inversa en columna C₈. Se efectuaron estudios de unión de ligando usando membranas aisladas de la línea celular C₂C₁₂ de mioblasto de murino (resultados no mostrados) y de la línea celular de músculo humano Hs 94 MU (resultados no mostrados). En ambas especies, el análisis de Scatchard de la reacción de unión proporcionó evidencias de dos sitios de unión con K_d ~ 10^{-10} M y 10^{-9} M (Tabla 1). Se observaron sitios de unión similares en membranas de sarcolema aisladas de cerdo (resultados no mostrados). En membranas de sarcolema aisladas del músculo gastrocnemio de ratones NMRI portadores de los tumores MAC16 (resultados no mostrados) y MAC13 (resultados no mostrados), así como membranas plasmáticas hepáticas (Tabla 1), se observaron también dos sitios de unión, reduciéndose la K_d del sitio de unión de menor afinidad de 10^{-9} a 10^{-10} M. No hubo evidencias de regulación por aumento del número de receptores en ratones portadores del tumor MAC16 con caquexia, en comparación con el encontrado en membranas de sarcolema de ratones portadores del tumor MAC13, que no induce caquexia. Las membranas plasmáticas de músculo sóleo y corazón mostraron también evidencias de dos sitios de unión para PIF (Tabla 1), mientras que no se detectó receptor en riñón ni tejido adiposo.

Tabla 1. Constantes de afinidad de PIF por membranas plasmáticas

Fuente de tejido	Kaf x 10 ⁻¹⁰ M	Kaf ₂ x 10 ⁻⁹ M
C ₂ C ₁₂	1,4	1,2
Hs94MU	1,1	1,7
Cerdo	4,7	8,2
Músculo gastrocnemio de ratón	5,2	0,1
Hígado de ratón	6,9	0,2
Músculo sóleo de ratón	0,1	0,12
Corazón de ratón	3,0	2,3
Tejido adiposo de ratón	-nd	-nd
nd: no detectable		

5 [0112] La actividad biológica del PIF se destruye cuando las cadenas oligosacáridas ligadas por N y O se retiran mediante incubación con péptido: N-glucosidasa F (PNGasa F) o endo- α -N-acetilgalactosaminidasa (O-glucosidasa). Para determinar el efecto de la desglucosilación de PIF sobre la unión al receptor, se realizaron experimentos con PIF marcado con péptido generado incubando células MAC16 con L-[2,5-³H]-histidina. Después de 24 h de incubación con PNGasa F u O-glucosidasa, se redujo sustancialmente la unión de [³H]-PIF (Fig. 1), con solo unión no específica de la cadena polipeptídica marcada a la membrana.

[0113] Se encontró que la afinidad de la unión de PIF a anticuerpo monoclonal (Kaf 10⁸ M⁻¹) era menor que la unión a sitios de alta o baja afinidad en el receptor muscular (resultados no mostrados). Sin embargo, cuando se añadía el anticuerpo monoclonal a membranas C₂C₁₂ a concentraciones entre 1 y 1000 ng/250 μ l, se inhibía eficazmente la unión al receptor (Kd 1,4 x 10⁻⁸ M). El anticuerpo monoclonal era menos eficaz al competir con receptores de membrana por PIF cuando se añadía después de PIF (Kd 5,8 x 10⁻⁷ M).

[0114] Aunque el PIF es una glucoproteína sulfatada, las cadenas oligosacáridas tienen cierta similitud con un proteoglucano, puesto que la condroitinasa ABC destruye los determinantes antigénicos y reduce la Mr, aunque no se ha obtenido material de bajo peso molecular correspondiente a oligosacáridos. Esto sugiere que la unión de PIF al receptor puede atenuarse por los proteoglucanos. Para investigar esto, se ha determinado el efecto de condroitina, dermatano y sulfato de heparano a concentraciones entre 5 y 5000 ng por ensayo en la unión de PIF a receptores en membranas C₂C₁₂. De los tres proteoglucanos, solo el sulfato de condroitina mostró inhibición competitiva de la unión (resultados no mostrados), con Kd 1,1 x 10⁻⁷ M.

[0115] La transferencia de ligando [³⁵S]-PIF a membranas solubilizadas con Triton de células C₂C₁₂ sometidas a electroforesis en PAGE-SDS al 15 % y transferidas electroforéticamente a filtros de nitrocelulosa proporcionó evidencias de una proteína de unión de Mr aparente 40.000 (Fig 2A).

[0116] Las concentraciones crecientes de PIF no marcado pudieron desplazar la radiactividad de las proteínas de unión (Fig. 2B), confirmando que la unión al receptor era específica.

[0117] Puesto que los mioblastos C₂C₁₂ poseen receptores de PIF, era importante establecer la actividad funcional en esta línea celular. Se midió el efecto del PIF sobre la degradación proteica mediante la liberación de L-[2,6-³H]-fenilalanina en presencia de cicloheximida de células premarcadas durante un periodo de 24 h. Se observó una tasa aumentada de degradación proteica al cabo de 6 h después de la adición de PIF, que era máxima a concentraciones entre 0,98 y 1,4 nM (resultados no mostrados), que es cercana a la afinidad de unión de PIF a esta línea celular. Concentraciones crecientes de PIF dieron como resultado una reducción de la liberación de fenilalanina, sugiriendo una interacción cooperativa negativa entre los dos sitios de unión. Se observaron tasas aumentadas de degradación proteica durante periodos más largos de tiempo (24 y 48 h) a concentraciones de PIF entre 0,14 y 1,4 nM.

1.3 DISCUSIÓN

[0118] Para que el PIF induzca la degradación proteica en músculo esquelético, debe haber una interacción específica con un receptor de proteína muscular capaz de traducir el mensaje a la activación del sistema degradativo de la proteína intracelular. Puesto que el PIF es una glucoproteína altamente glucosilada y sulfatada, es probable que esta esté unida a membrana. Los resultados del presente estudio proporcionan evidencias de sitios de unión específicos de alta afinidad por PIF en células musculares. La afinidad de unión era comparable con la encontrada

para la insulina y mostró 10-100 veces más afinidad que la unión a un anticuerpo monoclonal, lo que se ha utilizado en la purificación de PIF. Sin embargo, las altas concentraciones del anticuerpo podían desplazar el PIF del receptor de membrana. Esto explicaría por qué eran necesarias altas concentraciones de anticuerpo para neutralizar el efecto biológico del PIF. Como con la unión de PIF al anticuerpo, la unión al receptor está probablemente mediada por cadenas oligosacáridas sulfatadas, puesto que la unión se inhibía específicamente por sulfato de condroitina, pero no por los proteoglicanos relacionados dermatano y sulfato de heparano. Además, la desglucosilación enzimática daba como resultado la pérdida de unión específica del PIF al receptor. La alta afinidad de unión es probablemente el resultado de la interacción electrostática entre PIF y receptor.

10 **[0119]** La gráfica de Scatchard de unión de PIF a membranas de músculo de ratón, cerdo y ser humano era no lineal, indicando dos sitios discretos o interacciones cooperativas entre los sitios de unión. La transferencia de ligando [³⁵S]-PIF a membranas solubilizadas con Triton desde células C₂C₁₂ sometidas a electroforesis en PAGE-SDS al 15 % proporcionó evidencias de una proteína de unión de una Mr aparente de 40.000. Se han descrito gráficas de Scatchard curvas de unión en estado estacionario para una serie de sistemas hormonales y no
15 hormonales. Para insulina, se ha mostrado que esto representa una cooperatividad negativa en los sitios de unión. Esto proporciona un mecanismo en que la unión al receptor está favorecida a bajas concentraciones de la hormona, pero se vuelve más difícil a medida que aumenta la concentración de la hormona. Dicho efecto es evidente para la degradación proteica en células C₂C₁₂ inducida por PIF, en que se observó una curva de respuesta a la dosis en forma de campana. Estudios previos han sugerido curvas de respuesta a la dosis similares para la degradación
20 proteica en músculos sóleo y gastrocnemio aislados inducida por PIF. Además, se ha reseñado que se reduce la degradación proteica aumentada en animales portadores de tumor a medida que aumenta el tamaño tumoral. Estos resultados sugieren interacciones cooperativas negativas entre los sitios de unión a PIF.

[0120] Se ha confirmado recientemente que el PIF es responsable de la pérdida de músculo esquelético en
25 ratones portadores del tumor MAC16 con caquexia. Sin embargo, el número de sitios de unión a PIF en músculo esquelético era comparable en ratones portadores del tumor MAC16 y el tumor MAC13, que no induce caquexia, sugiriendo que la inducción de degradación de proteína muscular durante el proceso de caquexia no es debida a la regulación por aumento de los receptores. En lugar de ello, parece estar relacionada con la producción de PIF por el tumor, ya que el análisis de orina mostró que PIF estaba presente solo en pacientes de cáncer con pérdida de peso,
30 y no en aquellos que tenían peso estable o en pacientes no cancerosos. Por tanto, la producción de PIF por el tumor conduce a la activación constitutiva de la degradación de proteína muscular.

[0121] La distribución del receptor de PIF en tejidos es compatible con un papel de PIF en la mediación del metabolismo de proteínas de músculo esquelético. Se mostró que las tasas de degradación proteica en mioblastos
35 C₂C₁₂ aumentaban un 50-90 % en respuesta al PIF, con una estimulación máxima a una concentración de 0,98-1,4 nM, que es cercana a la afinidad de unión de PIF al receptor. El papel de los receptores de PIF en el hígado no es conocido, puesto que el hígado responde al PIF aumentando el peso, en lugar de experimentando proteólisis como se observa en músculo esquelético. Esto sugiere que el receptor de PIF en el hígado no está acoplado con el sistema de segundo mensajero, que da como resultado la activación de la proteólisis. El receptor puede usarse para
40 retirar el PIF de la circulación o puede dar como resultado la activación de otros sistemas, por ejemplo, la respuesta de fase aguda en hepatocitos.

[0122] Los estudios hasta la fecha han identificado PIF solo en asociación con caquexia por cáncer y no con otras afecciones de pérdida de peso. Es por tanto interesante encontrar que el músculo posee un receptor para
45 dicho factor, incluso sin exposición previa a PIF. La afinidad de unión y peso molecular del receptor parecen ser similares en ratón, cerdo y ser humano, sugiriendo una universalidad de la función entre las especies. Es desconocido el agonista natural que regula el catabolismo del músculo esquelético, por ejemplo, durante la deficiencia dietética o cambios catabólicos inducidos por TNF- α , pero puede parecerse a PIF hasta el punto de reactividad cruzada de los receptores. Se sabe poco sobre los procesos intracelulares que controlan el catabolismo
50 proteico en músculo esquelético, pero el resultado final parece ser la activación del sistema proteolítico dependiente de ATP-ubiquitina.

EJEMPLO 2

55 **[0123]** Habiendo caracterizado los sitios de unión a PIF (véase el ejemplo 1), los inventores procedieron a aislar y secuenciar el receptor de PIF según el primer aspecto de la invención.

Aislamiento del receptor de PIF a partir de miotubos C₂C₁₂

[0124] Los inventores han establecido que la aglutinina de germen de trigo (WGA) (ligada a Sephadex) se unirá a las cadenas oligosacáridas de PIF. Esto les permitió aislar eficazmente el receptor de PIF, después de incubación con PIF, seguido de cromatografía de lectina en WGA.

[0125] Se prepararon muestras de membrana C₂C₁₂ mediante sonicación en tampón receptor (HEPES 20 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM a 4 °C) y centrifugando a 20.000 rpm durante 20 min. Se lavó el sedimento y se solubilizó en Triton al 1 % durante 30 min. Se dializó entonces la muestra frente a PBS durante una noche a 4 °C. Se incubaron 200 µl de muestra dializada solubilizada con ³⁵S-PIF durante 24 h a 4 °C en presencia de inhibidores de proteasa, después de lo cual se purificó el receptor de PIF usando una columna de WGA. Se cargó la columna (1 ml de lecho, 10 mg de WGA/ml) con muestra y se lavó con 20 volúmenes de tampón de lavado (Tris 10 mM, pH 7,4 con 0,02 % de NaN₃). La elución del receptor fue con N-acetilglucosamina 0,1 M en tampón de lavado. Se recogieron 10 fracciones (1 ml) y se almacenaron a 4 °C en presencia de inhibidores de proteasa.

[0126] Se concentraron las fracciones radiactivas usando una centrifuga Microcon con una membrana para separar proteínas con una masa molecular menor de 10 kDa y se sometieron a electroforesis en PAGE-SDS al 15 % (Fig. 3). El receptor apareció como una única proteína de 40 kDa de Mr aparente. Se evidenció una masa molecular similar en la cromatografía de exclusión usando Sephadex G-50 (resultados no mostrados). El complejo PIF-receptor se procesó en una única fracción. Se obtuvo un resultado similar después de reticular PIF con el receptor usando glutaraldehído (resultados no mostrados). Las incubaciones de control en que se sometieron membranas solubilizadas aisladas de miotubos C₂C₁₂ a cromatografía de lectina en WGA sin incubación previa con PIF, mostraron que no se eluía proteína, confirmando que el material de 40 kDa no era una glucoproteína endógena.

25 Análisis de secuencia del receptor de PIF (Edman)Extremo N:

[0127]

30

DINGGGATLPQPLYQTA AVLTAGFA (SEQ ID No. 1)

[0128] Esta secuencia coincide con un fragmento peptídico de la proteína de fluido sinovial p205, con actividad estimulante de linfocitos T (J. Immunol.; (1996) 157; 1773-80).

35

[0129] Esta secuencia adicional se cree que representa un receptor variante polimórfico.

Fragmentos peptídicos internos

40

[0130]

TAINDTFLNADSNLSIGK	(SEQ ID No. 2)
XATVAGVSPAPANVSAAIGA	(SEQ ID No. 3)
...IIPATTAGE...	(SEQ ID No. 4)
...TYMSPDYAAATLAG...	(SEQ ID No. 5)
FVPLPT	(SEQ ID No. 6)
TELSNYVTAXGTxxG	(SEQ ID No. 7)
VTTAGSDS	(SEQ ID No. 8)
DVNGG	(SEQ ID No. 9)
LTTWDLIADSGR	(SEQ ID No. 10)

45 **[0131]** No hay homología de secuencia de los péptidos internos con otras proteínas en la base de datos.

EJEMPLO 3

[0132] Habiendo secuenciado el receptor de PIF, los inventores procedieron a desarrollar agentes para uso según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención.

[0133] Los inventores establecieron que el péptido de SEQ ID No.1 era capaz de bloquear la unión de PIF al receptor de PIF, y demostraron así que el péptido puede usarse como agente según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención.

3.1 PROCEDIMIENTOS

[0134] Las técnicas empleadas en la purificación de PIF y el ensayo de degradación proteica, actividad de enzima "similar a quimotripsina" y transferencia Western se describen anteriormente y están también contenidas en las siguientes publicaciones:

1. Gomes-Marcondes y col., *Br. J. Cancer* (2002) 86, 1628-1633.
2. Whitehouse y Tisdale, *Br. J. Cancer* (2003) 89, 1116-1122.
3. Smith y Tisdale, *Br. J. Cancer* (2003) 89, 1783-1788.

3.2 RESULTADOS

[0135] El PIF inducía la degradación proteica en miotubos de murino con una curva de respuesta a la dosis en forma de campana, como se reseña anteriormente (Gomes-Marcondes y col. *supra*) (Fig. 4). Este efecto se atenuaba completamente por el péptido sintético N-terminal a una concentración 10 μ M. A esta concentración, el péptido bloqueaba también el aumento de actividad enzimática similar a quimotripsina inducida por PIF (Fig. 5), la actividad proteolítica predominante del proteosoma.

[0136] La transferencia Western mostró que el péptido prevenía completamente también el aumento inducido por PIF de la expresión de subunidades α de proteosoma de 20S (Fig. 6A), de dos subunidades de ATPasa del regulador de 19S del proteosoma MSS1 (Fig. 6B), de p42 (Fig. 6C), así como de la enzima de conjugación con ubiquitina E2_{14k} (Fig. 6D). La inhibición de la inducción de la ruta proteolítica de ubiquitina de proteosoma por el péptido dio como resultado la atenuación de la reducción de la expresión de miosina de proteína miofibrilar inducida por PIF (Fig. 6E). Estos resultados sugieren que el PIF se une a la región N-terminal del péptido receptor, evitando la interacción con el receptor en los miotubos.

[0137] Estos datos muestran claramente que el péptido de SEQ ID No 1 puede usarse como agente según la presente invención.

EJEMPLO 4

[0138] Se investigó también un agente anticuerpo para uso según el cuarto, quinto o sexto aspectos de la invención.

4.1 PROCEDIMIENTOS

[0139] Se generó antisuero policlonal a partir de un nonadecámero derivado de los primeros 19 aminoácidos del fragmento peptídico N-terminal (SEQ ID No 1). Se produjo el antisuero en un conejo según los términos de un contrato confidencial con Severn Biotech Ltd., Worcs, RU.

[0140] Más detalladamente, se produjo antisuero policlonal conjugando el péptido nonadecamérico (5 mg) con 5 mg de PPD (como proteína portadora) con sulfo-SMCC mediante una cisteína C-terminal, e inmunizando posteriormente dos conejos mediante inyección subcutánea del antígeno (50-200 mg) a 0,25 ml en cada uno de los cuatro sitios en coadyuvante de Freud. Se suministró el suero a partir de una hemorragia de ensayo, hemorragia de producción y hemorragia terminal.

[0141] El antisuero detectó el receptor de PIF mediante transferencia Western (Fig. 7) después de purificación del anticuerpo añadiendo sulfato de amonio saturado al 50 % seguido de cromatografía en columna de proteína A (kit PURE1A, Sigma Aldridge, Dorset, RU). Se emplearon por lo demás los procedimientos empleados en los ejemplos 1-3.

4.2 RESULTADOS

- [0142] Se muestra en la Fig. 8 el efecto del anticuerpo del receptor de PIF a concentraciones de entre 5 y 15 µg/ml sobre la degradación proteica inducida por PIF. Se observó una atenuación parcial del efecto del PIF a una concentración de 5 µg/ml, mientras que se observó una atenuación completa a concentraciones de 10 µg/ml y superiores. Se observó un efecto similar sobre el aumento inducido por PIF de actividad de enzima similar a quimotripsina (Fig. 9).
- [0143] La transferencia Western mostró que, en miotubos C₂C₁₂, el anticuerpo antireceptor prevenía completamente también el aumento inducido por PIF de expresión de subunidades α de proteosoma de 20S (Fig. 10A), de dos subunidades de ATPasa del regulador de 19S del proteosoma MSS1 (Fig. 10B), de p42 (Fig. 10C), así como de la enzima de conjugación con ubiquitina, E2_{14k} (Fig. 10D). Estos datos muestran claramente que un anticuerpo creado contra el péptido de SEQ ID No 1 puede usarse como agente según la presente invención.
- [0144] Para evaluar la capacidad del anticuerpo antireceptor de prevenir la degradación de proteína muscular por PIF *in vivo*, se trataron diariamente ratones portadores del carcinoma de colon MAC16 inductor de caquexia, en que se ha mostrado que el PIF es responsable de la pérdida de músculo esquelético (Lorite y col., Br. J. Cancer (1998) 78, 850-856), mediante la administración i.p. de antisueros policlonales antireceptor de PIF (3,47 mg/kg). Después de 3 días de tratamiento, los ratones que recibieron el anticuerpo antireceptor tuvieron una pérdida de peso significativamente reducida en comparación con los controles de disolvente (Fig. 11A). Se muestra el efecto sobre el volumen tumoral en la Fig. 11B. Había un efecto significativo sobre la síntesis proteica (Fig. 12A) y un aumento significativo en el peso del músculo sóleo en comparación con los controles tratados con disolvente, y este no era significativamente diferente del de ratones NMRI de peso coincidente sin tumor (Fig. 12B). El tratamiento con anticuerpo antireceptor atenuaba la degradación proteica en el músculo sóleo hasta la de ratones no portadores de tumor (Fig. 12C), así como la actividad de proteosoma funcional, medida por la actividad de enzima similar a quimotripsina (Fig. 12D). Las expresiones de subunidades α de proteosoma de 20S (Fig. 13A), MSS1 (Fig. 13B), p42 (Fig. 13C) y E2_{19k} (Fig. 13D) estaban todas atenuadas hasta los niveles encontrados en ratones no portadores de tumor después del tratamiento de ratones caquéticos con el anticuerpo antireceptor. Los resultados de la Fig. 13E muestran que el anticuerpo antireceptor invierte la pérdida de miosina en músculo gastrocnemio observada en ratones portadores del tumor MAC16 hasta los niveles encontrados en ratones no portadores de tumor. Estos datos muestran claramente que puede usarse un anticuerpo creado contra el péptido de SEQ ID No 1 como agente según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un receptor nativo maduro aislado de factor inductor de la proteólisis (PIF), caracterizado porque el extremo N del receptor nativo maduro tiene la secuencia aminoacídica:

n - DINGGGATLPQPLYQTAAVLTAGFA (SEQ ID No.1)

o:

n - DINGGGATLPQKLYLIPNVL (SEQ ID No.13)

en el que dicho receptor:

(a) es obtenible mediante un proceso que comprende:

- (i) solubilizar membranas de miotúbulos de murino mediante incubación con PIF radiomarcado en Triton al 1 %;
- (ii) purificar el receptor de PIF en una columna de aglutinina de germen de trigo-agarosa capaz de unirse a PIF, y
- (iii) eluir el receptor libre con N-acetilglucosamina 0,1 M,

teniendo dicho receptor una Mr de aproximadamente 40.000, usando PAGE-SDS al 15 % y cromatografía de exclusión en Sephadex G-50, y/o

(b) comprende adicionalmente al menos una, dos o todas las secuencias aminoacídicas internas seleccionadas de la lista consistente en:

TAINDTFLNADSNLSIGK	(SEQ ID No.2)
XATVAGVSPAPANVSAAIGA	(SEQ ID No.3)
IIPATTAGE	(SEQ ID No.4)
TYMSPDYAAATLAG	(SEQ ID No.5)
FVPLPT	(SEQ ID No.6)
TELSNYVTAXGTxxG	(SEQ ID No.7)
VTTAGSDS	(SEQ ID No.8)
DVNGG	(SEQ ID No.9)
LTTWDLIADSGR	(SEQ ID No.10)

2. Un proceso para producir un receptor mutado del factor inductor de la proteólisis (PIF), siendo dicho receptor un derivado funcional de un receptor según la reivindicación 1, comprendiendo el proceso introducir mutaciones en el receptor según la reivindicación 1 que retiene su actividad de receptor de PIF.

3. Un ácido nucleico que codifica un receptor según la reivindicación 1.

4. Un ácido nucleico según la reivindicación 3 que tiene una secuencia nucleotídica como se expone en la SEQ ID No. 11:

GAC	ATC	AAC	GGC	GGC	GGC	GCC	ACC	CTG	CCC
CAG	CCC	CTG	TAC	CAG	ACC	GCC	GCC	GTG	CTG
ACC	GCC	GGC	TTC	GCC					

o que tiene una secuencia nucleotídica como se expone en la SEQ ID No. 14:

GAC	ATC	AAC	GGC	GGC	GGC	GCC	ACC	CTG	CCC
CAG	AAG	CTG	TAC	CTG	ATC	CCC	AAC	GTG	CTG

5. Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, y que
5 opcionalmente incluye uno o más de: elementos que inducen la replicación de ADN; elementos que favorecen la integración orientada en el genoma de una célula; un marcador seleccionable; un promotor.
6. Un anticuerpo capaz de unirse específicamente con un receptor según la reivindicación 1.
- 10 7. Un anticuerpo según la reivindicación 6 que (a) bloquea la señalización intracelular mediada por receptor y/o (b) se ha creado contra uno cualquiera de los péptidos de SEQ ID No. 1-10 o 13; y/o (c) es policlonal o monoclonal; y/o (d) es una γ -inmunoglobulina (IgG).
8. Un derivado funcional de un anticuerpo según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que tiene al
15 menos el dominio variable del mismo, que es opcionalmente un fragmento de anticuerpo y que es opcionalmente un anticuerpo scFV, siendo capaz dicho derivado de unirse específicamente con un receptor según la reivindicación 1.
9. Un anticuerpo según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que es un anticuerpo humanizado.
- 20 10. Un agente que reduce la actividad biológica de un receptor según la reivindicación 1 para uso como medicamento para el tratamiento de caquexia, en el que el agente reduce opcionalmente la actividad biológica del receptor:
- (a) reduciendo la expresión del receptor de PIF;
- 25 (b) aumentando la desensibilización del receptor o la degradación del receptor;
- (c) reduciendo la interacción entre el PIF y el receptor que es su receptor endógeno;
- 30 (d) reduciendo la señalización intracelular mediada por el receptor de PIF;
- (e) compete con el receptor endógeno por la unión de PIF;
- (f) uniéndose al receptor para bloquear la unión de PIF; o
- 35 (g) uniéndose al PIF para evitar la interacción con el receptor.
- en el que el agente se selecciona de la lista consistente en: (a) un anticuerpo o derivado funcional según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o (b) un receptor de la reivindicación 1 o un fragmento del mismo, o (c) un
40 fragmento N-terminal del receptor, opcionalmente seleccionado de, o que comprende, las SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 13, y que es opcionalmente un derivado peptídico que tiene una semivida *in vivo* aumentada en comparación con el fragmento de receptor del que derivaba, o (d) una molécula de ADN o ARN anticodificante que se unirá a transcritos de ARN del receptor endógeno para reducir la expresión de receptor, que es opcionalmente una molécula anticodificante seleccionada de:
- 45
- 5' GGCGAAGCCGGCGGTCAGCACGGCGGCGGTCTGGTACAGGGGCTGGGGCAGGGTGGCGCCGCCGCC
GTTGATGTC3' (SEQ ID NO. 12)**
- 5'CAGCACGTTGGGGATCAGGTACAGCTTCTGGGGCAGGGTGGCGCCGCCGCCGTTGATGTC3' (SEQ ID
NO. 15); o**
- (e) una molécula de ARNip o ARNhc que comprende una molécula de ARN anticodificante que se unirá a transcritos
50 de ARN del receptor endógeno para reducir la expresión del receptor.

11. Un procedimiento de cribado de un compuesto para ensayar si el compuesto tiene eficacia o no para tratar caquexia, que comprende:

5 (i) exponer células o membranas que comprenden un receptor según la reivindicación 1 a un compuesto de ensayo durante un periodo de tiempo predeterminado;

(ii) detectar la actividad o expresión del receptor; y

10 (iii) comparar la actividad o expresión del receptor en las células o membranas tratadas con el compuesto respecto a la actividad o expresión encontrada en células o membranas de control que no se trataron con el compuesto;

en el que los compuestos con eficacia para tratar caquexia reducen la actividad o reducen la expresión del receptor respecto a los controles.

15 12. Un procedimiento de cribado de un compuesto para ensayar si el compuesto causa o no caquexia, que comprende:

(i) exponer células o membranas que comprenden un receptor según la reivindicación 1 a un compuesto de ensayo durante un periodo de tiempo predeterminado;

20 (ii) detectar la actividad o expresión del receptor; y

(iii) comparar la actividad o expresión del receptor en las células o membranas tratadas con el compuesto respecto a la actividad o expresión encontrada en células o membranas de control que no se trataron con el compuesto;

25 en el que los compuestos que causan caquexia aumentan la actividad o aumentan la expresión del receptor respecto a los controles.

13. Un procedimiento según la reivindicación 11 o la reivindicación 12 (a) que es un procedimiento *in vivo* 30 en que las células presentes en cualquier animal experimental se exponen al compuesto de ensayo y/o (b) en que las células se transforman con un vector según la reivindicación 5 para expresar dicho receptor en dichas células; y/o (c) en el que el nivel de expresión en las células o membranas se evalúa usando un anticuerpo marcado que es un anticuerpo según la reivindicación 6, un ligando PIF radiomarcado o un compuesto de ensayo radiomarcado.

35 14. Uso de un agente que reduce la actividad biológica del receptor según la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de caquexia, en el que el agente es según la reivindicación 10.

Figura 1

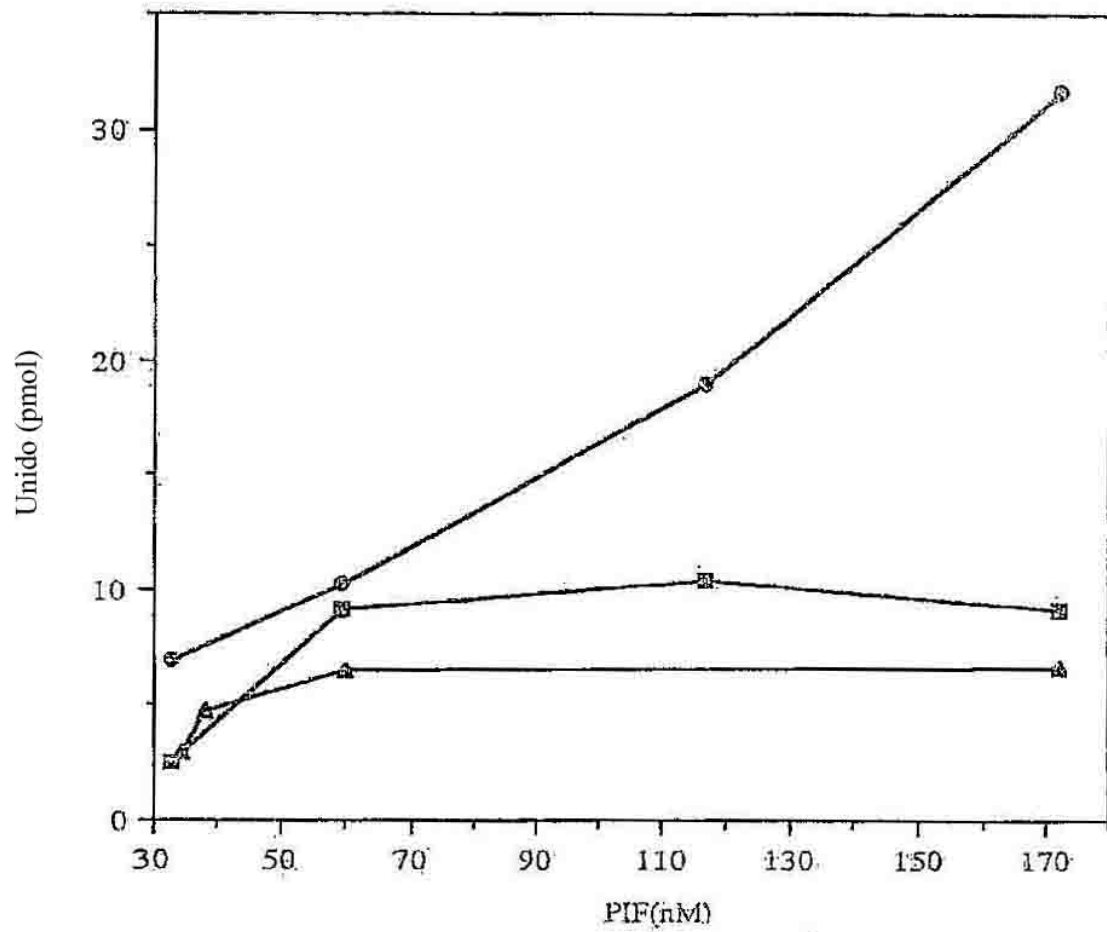


Figura 2

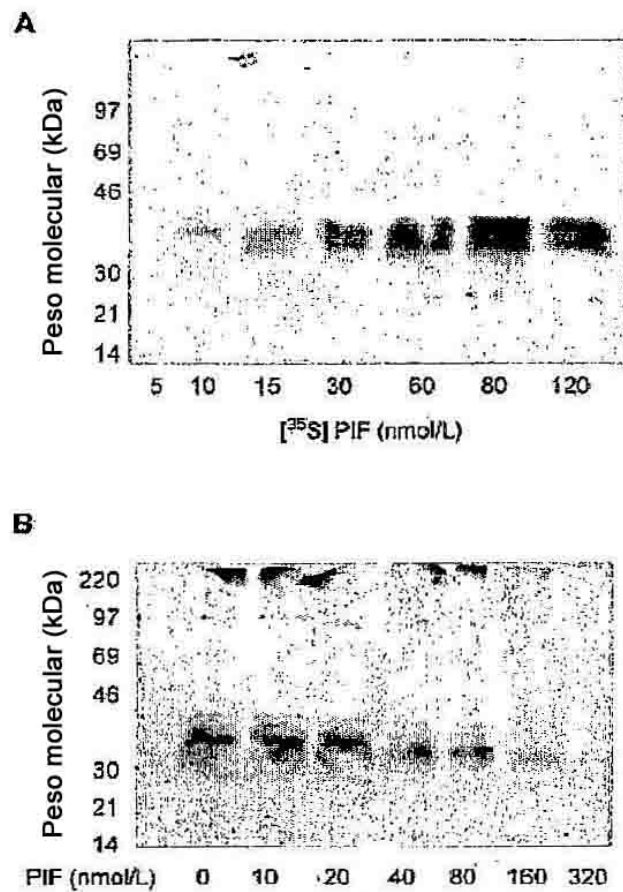


Figura 3

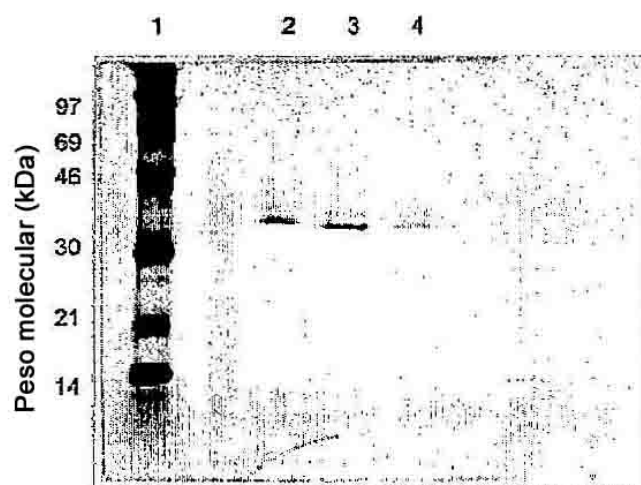


Figura 4

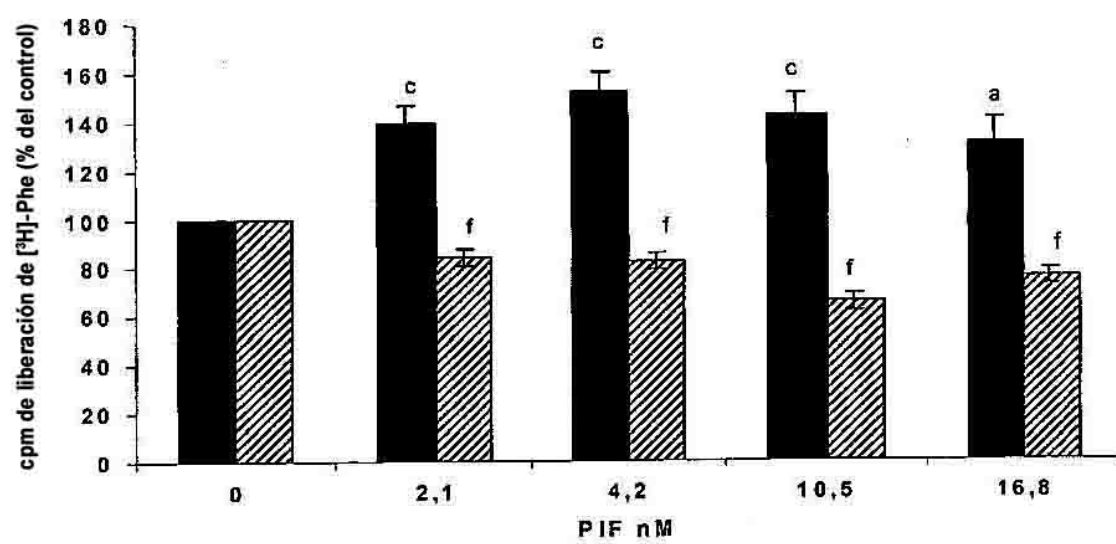


Figura 5

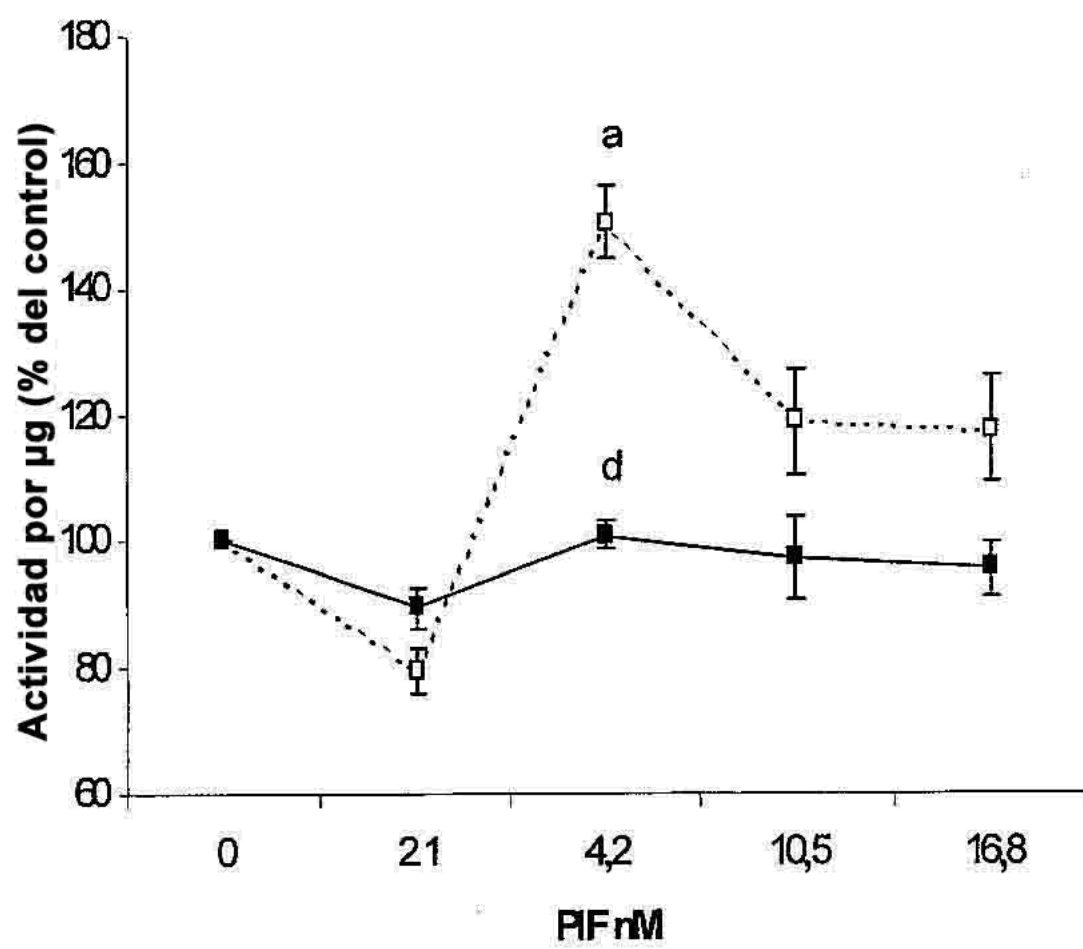


Figura 6A

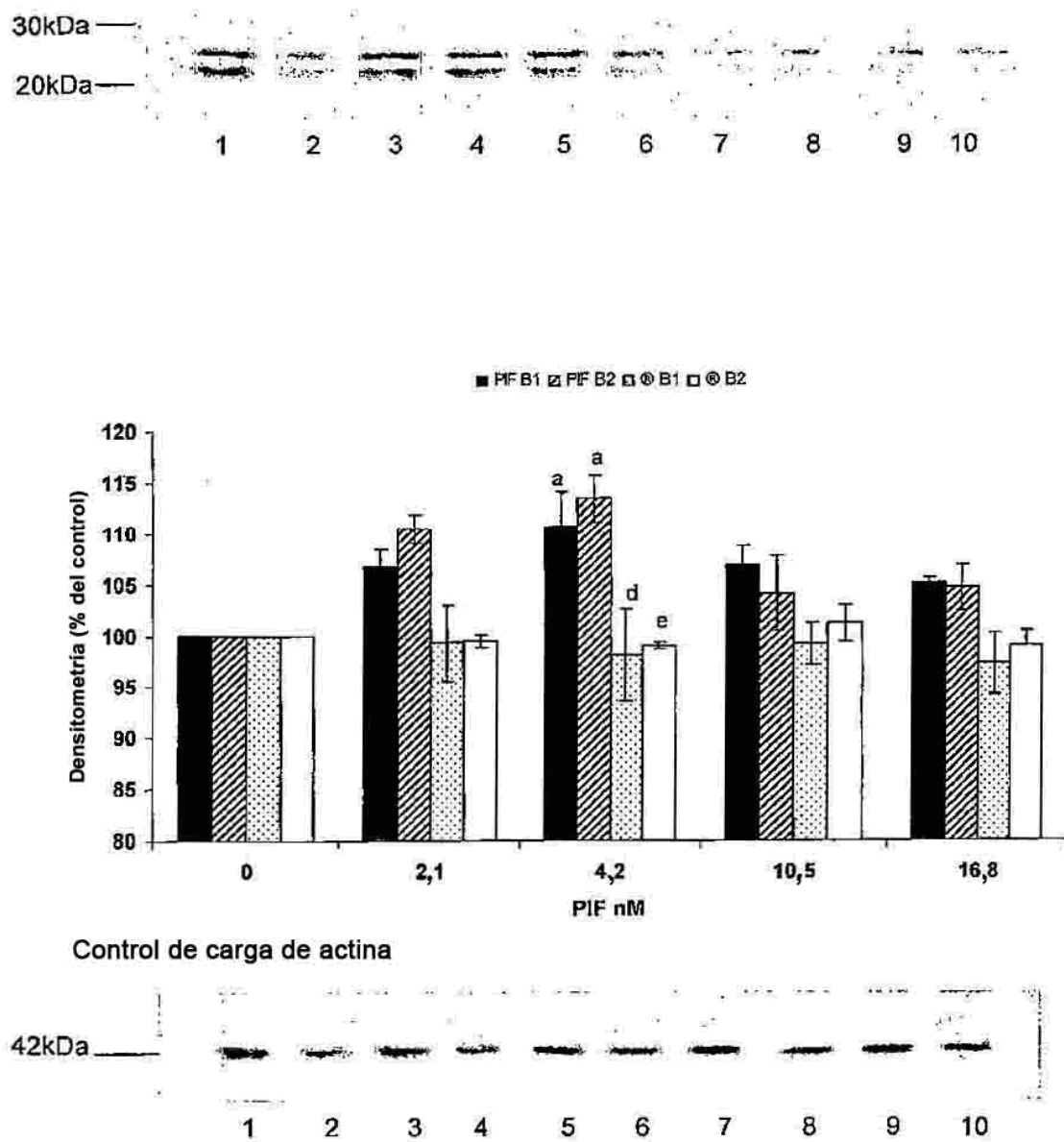
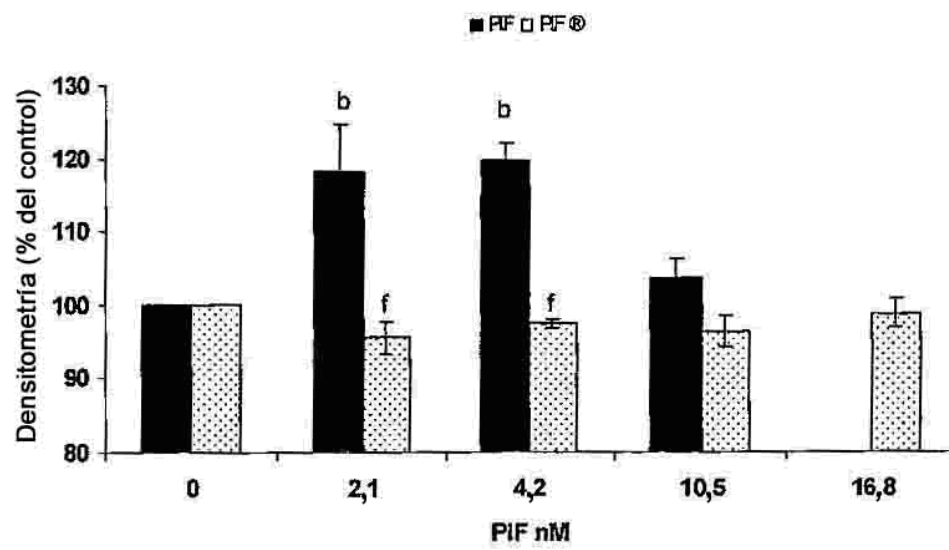


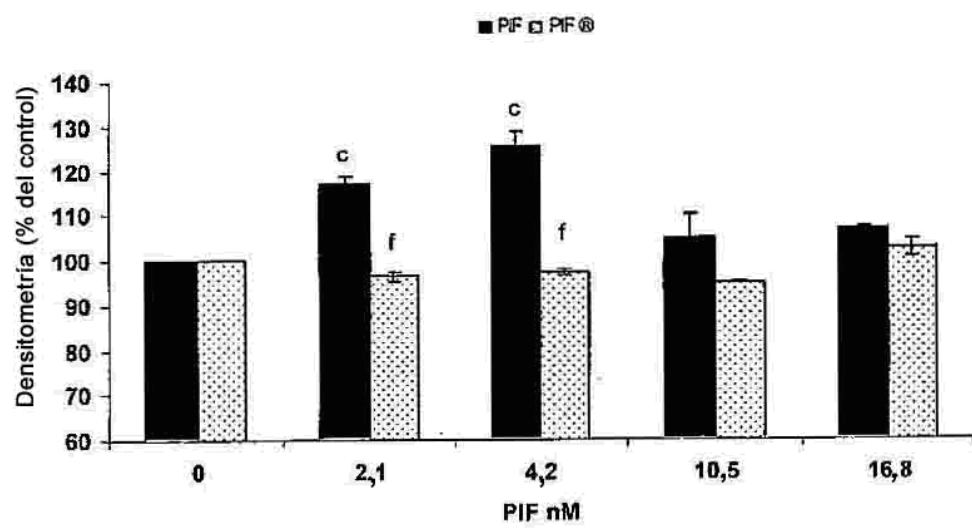
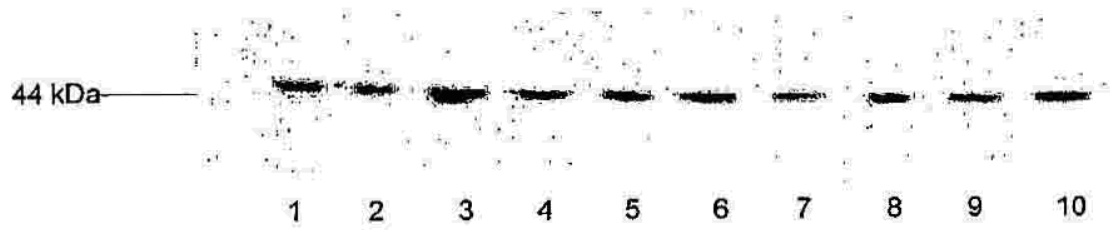
Figura 6B



Control de carga de actina



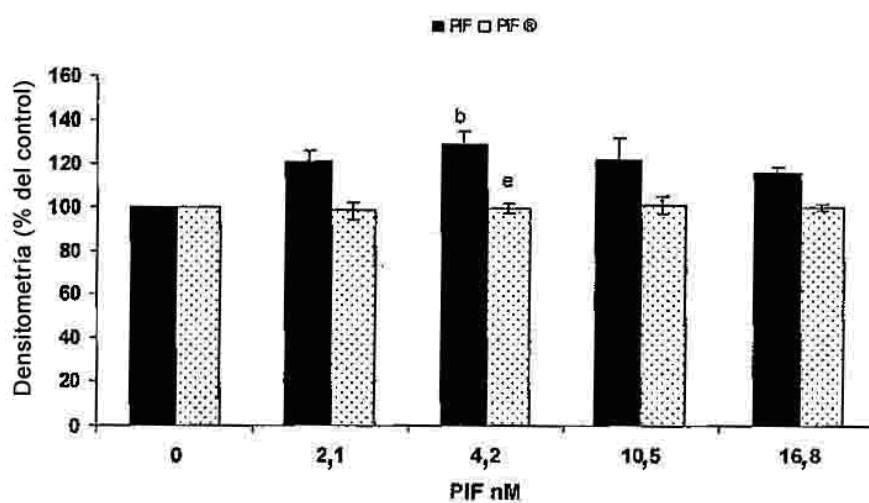
Figura 6C



Control de carga de actina



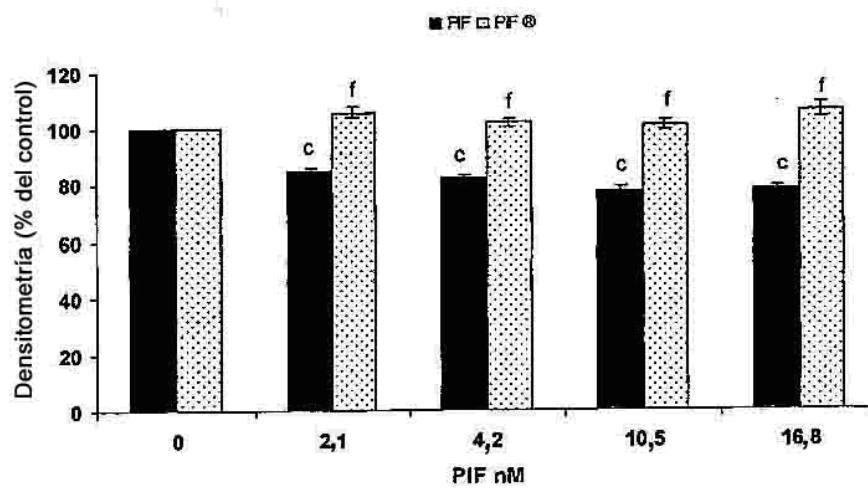
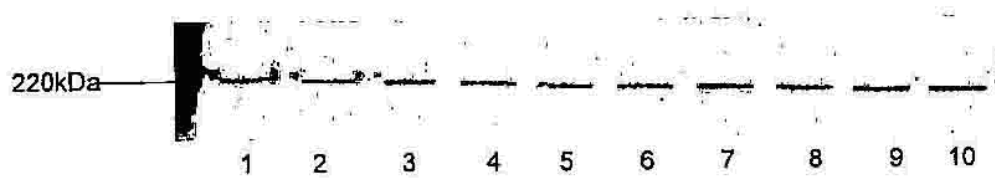
Figura 6D



Control de carga de actina



Figura 6E



Control de carga de actina



Figura 7

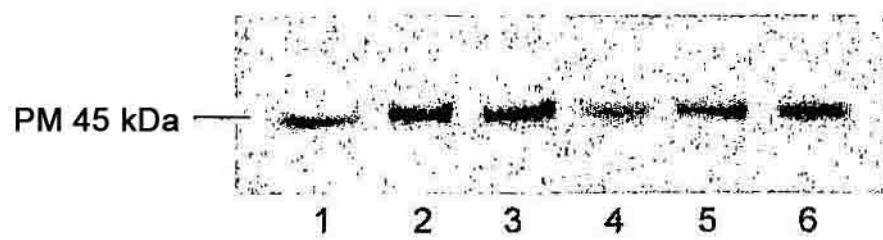


Figura 8

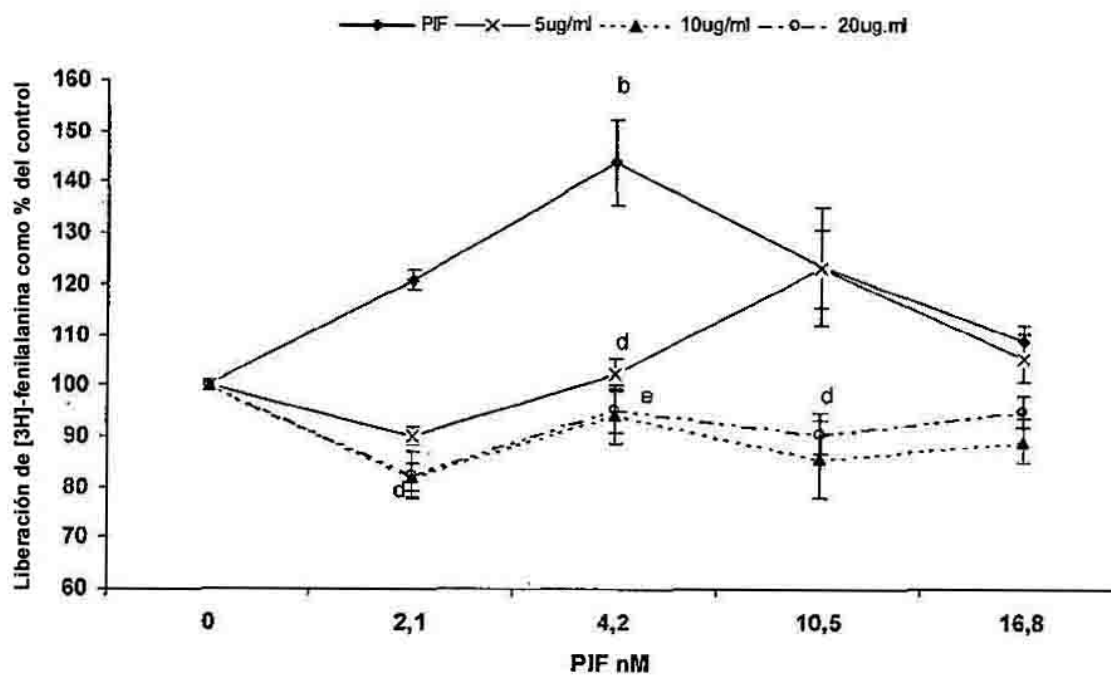


Figura 9

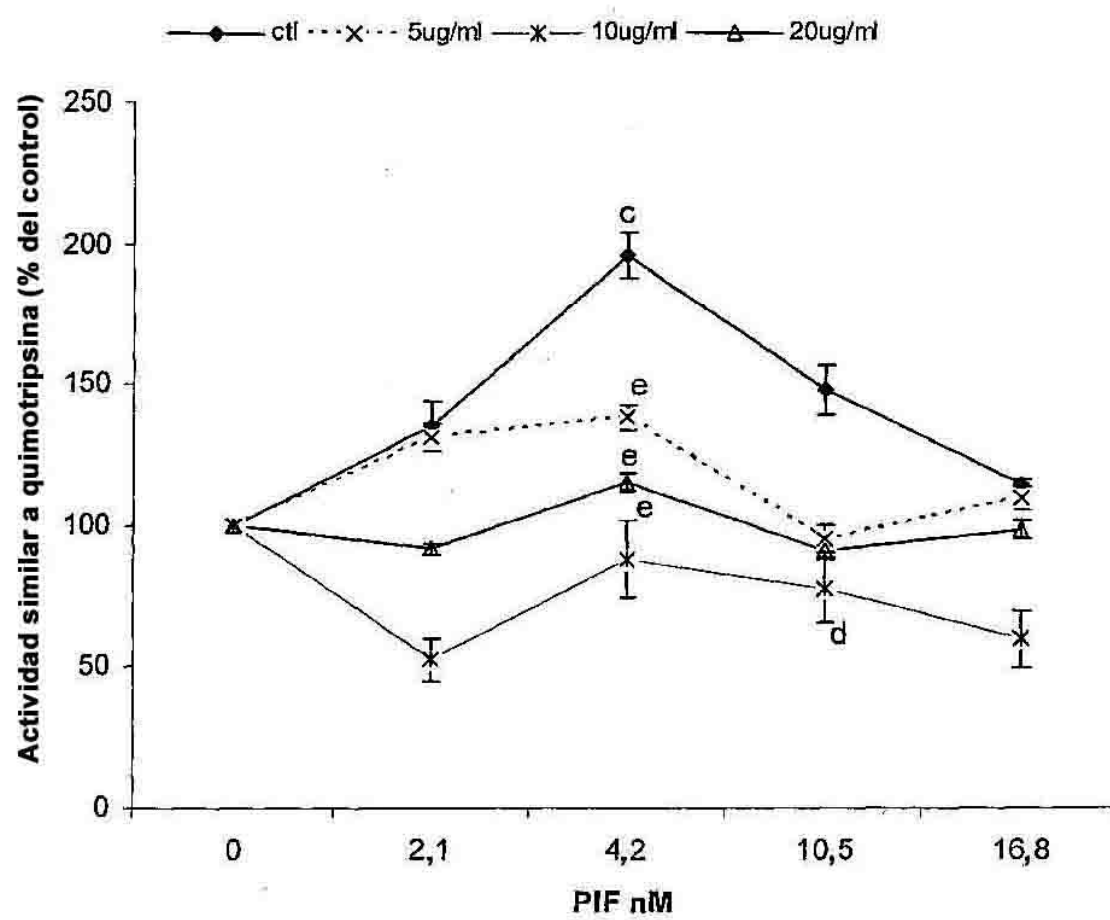


Figura 10A

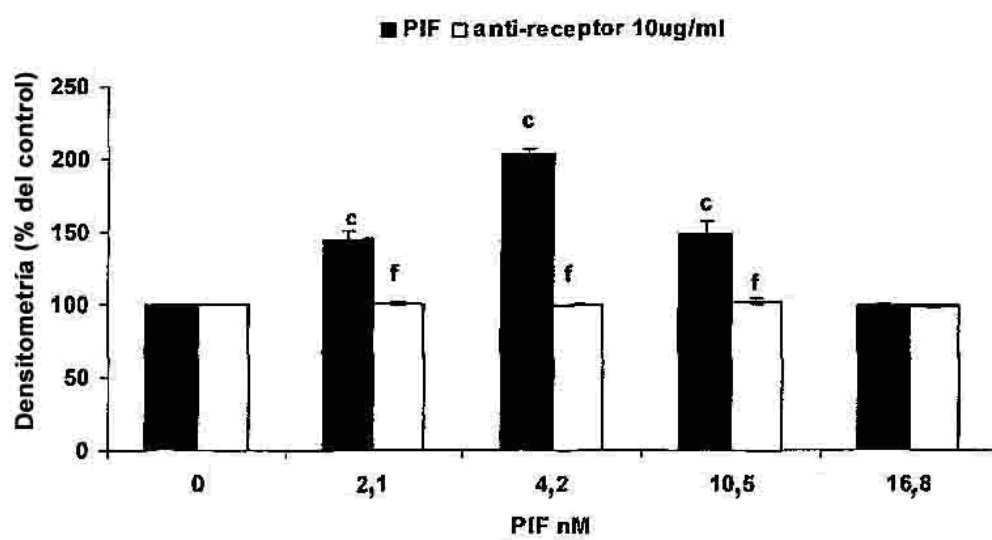
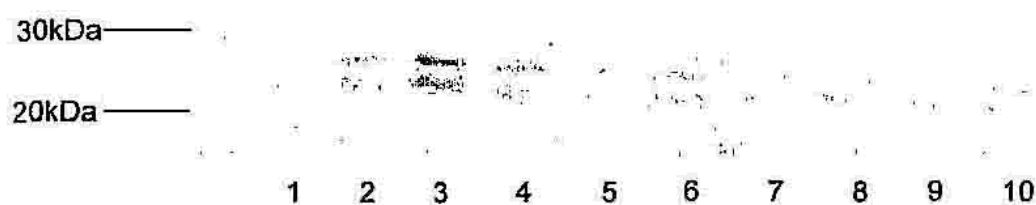


Figura 10B

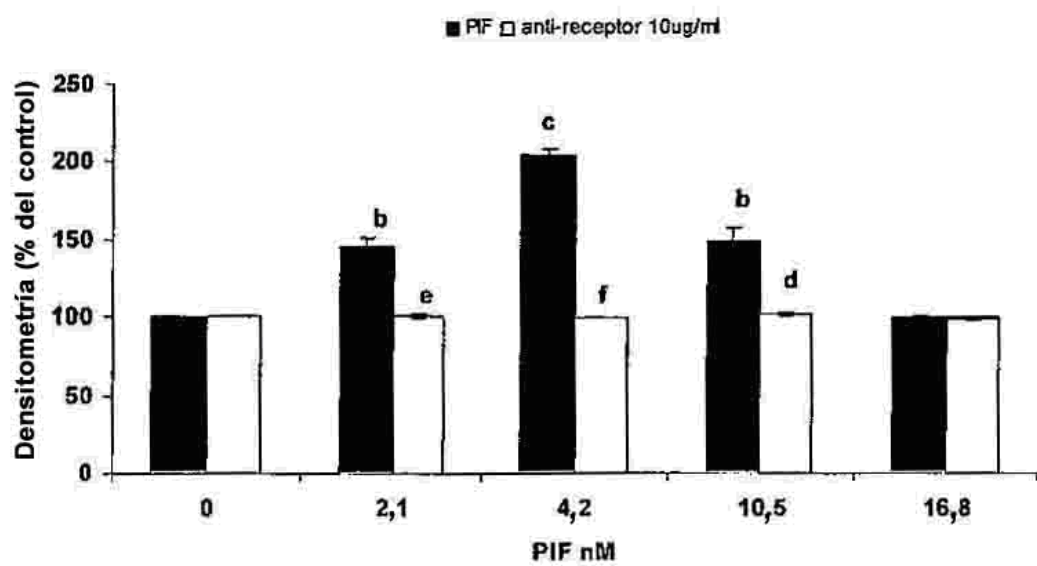


Figura 10C

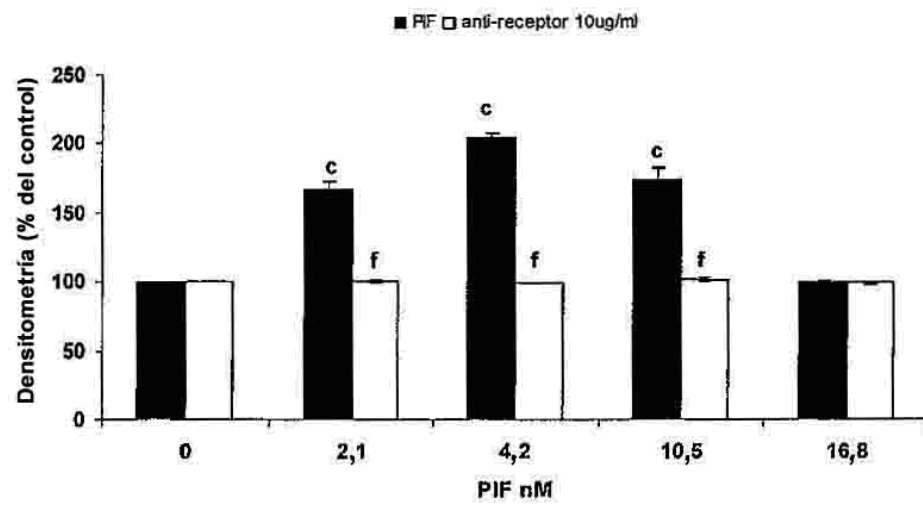
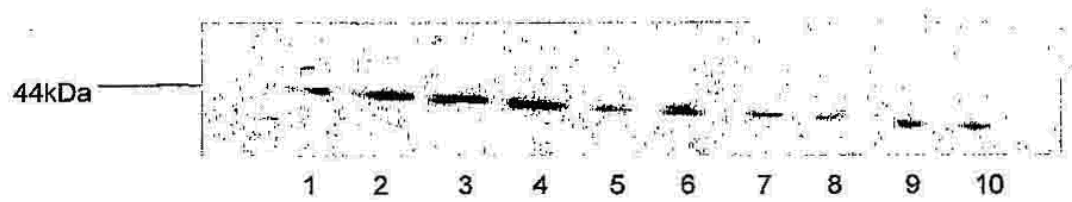


Figura 10D

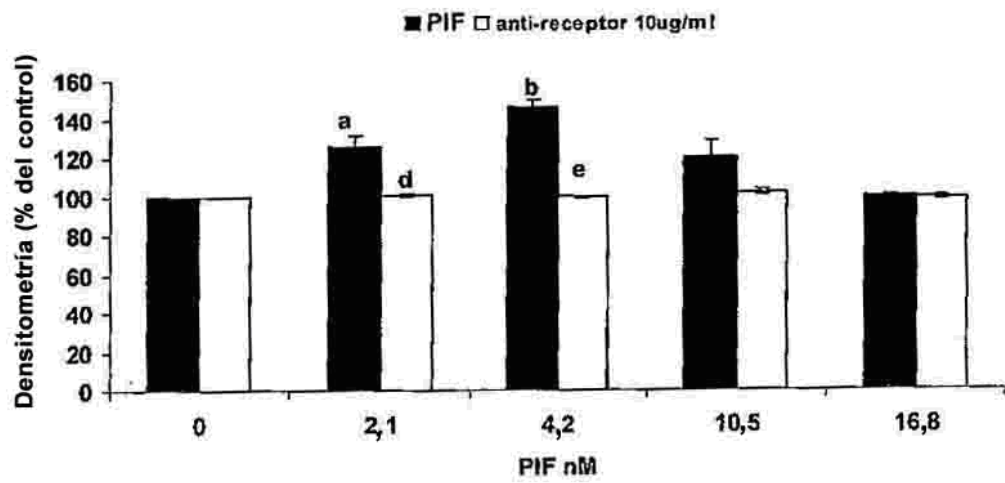
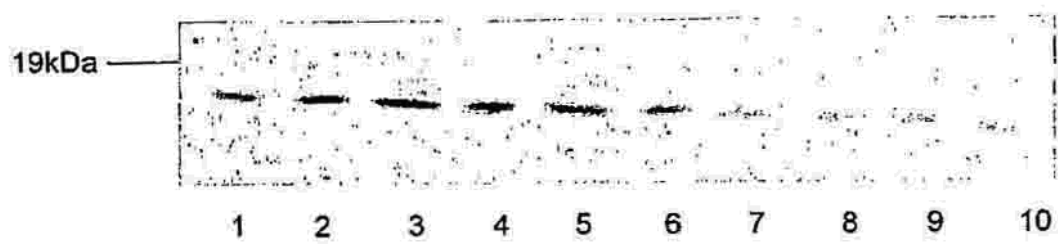


Figura 10E

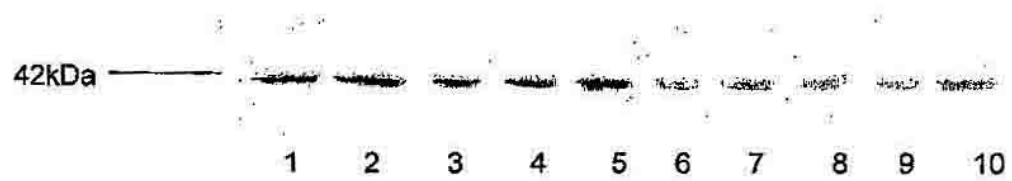


Figura 11A

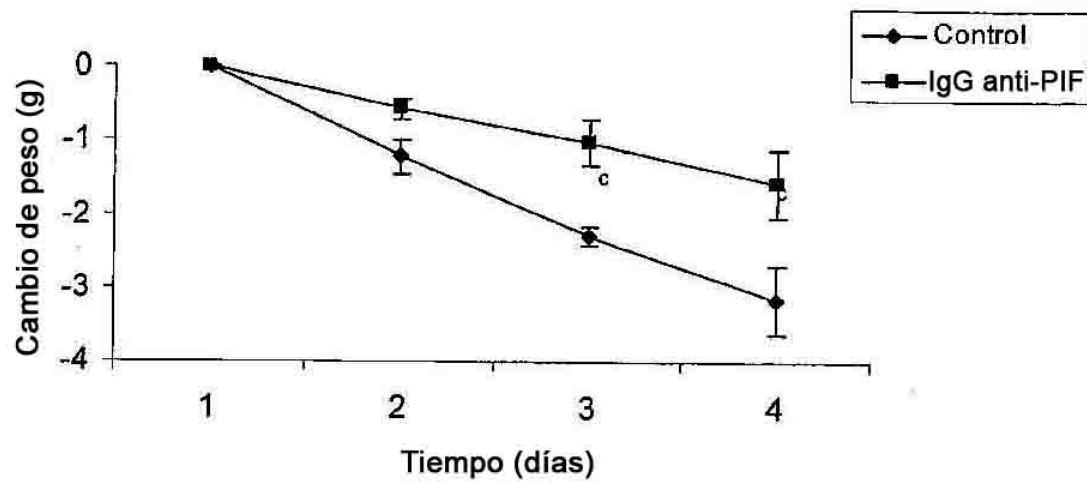


Figura 11B

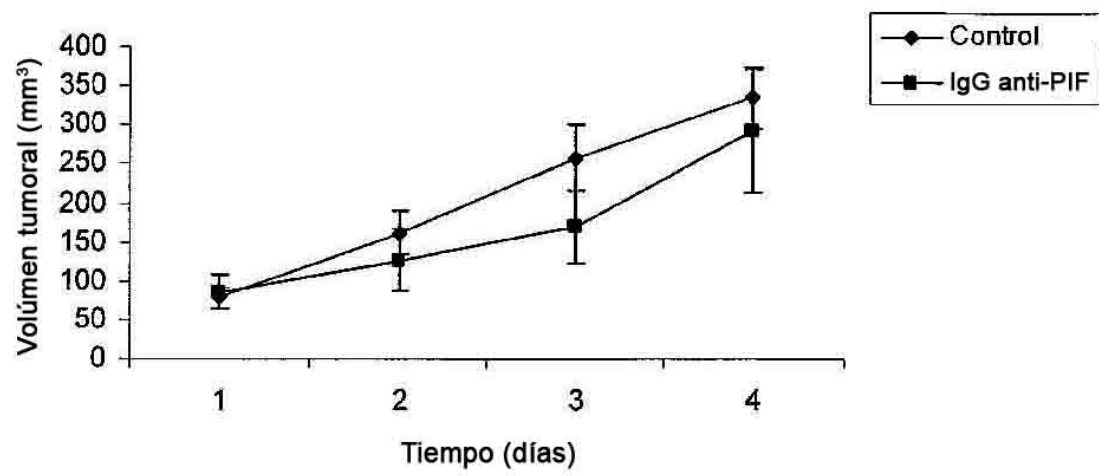


Figura 12A

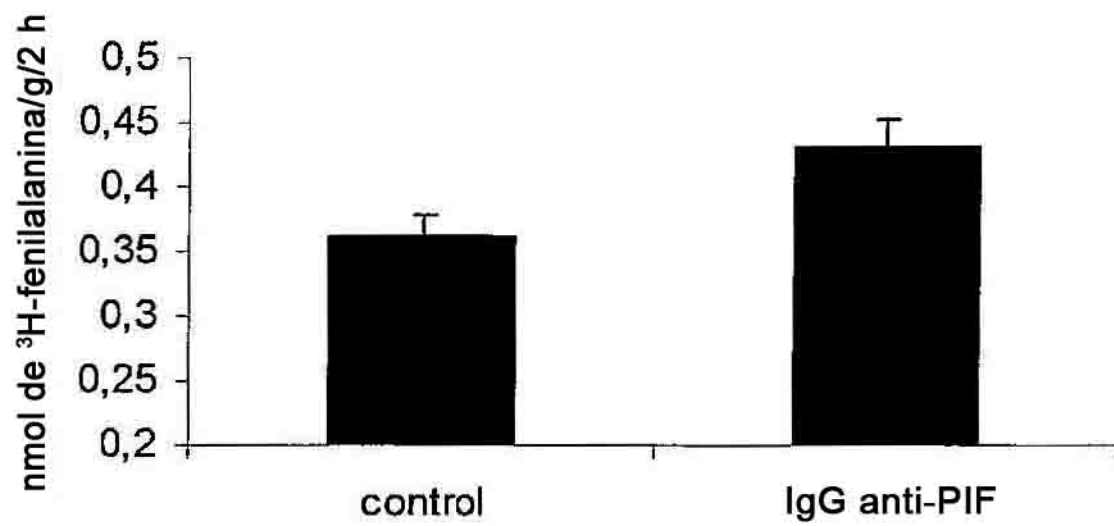


Figura 12B

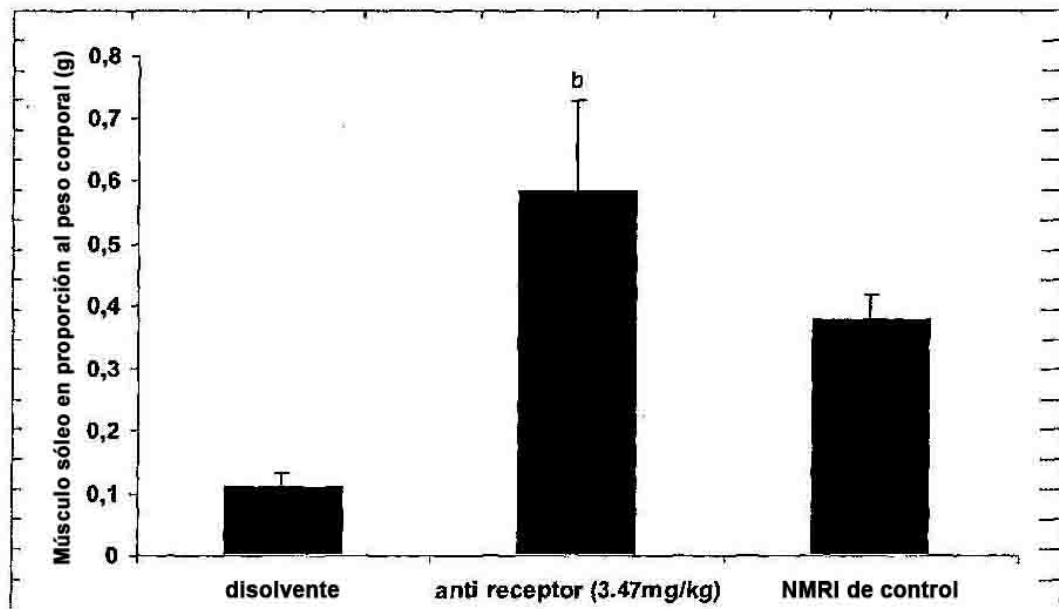


Figura 12C

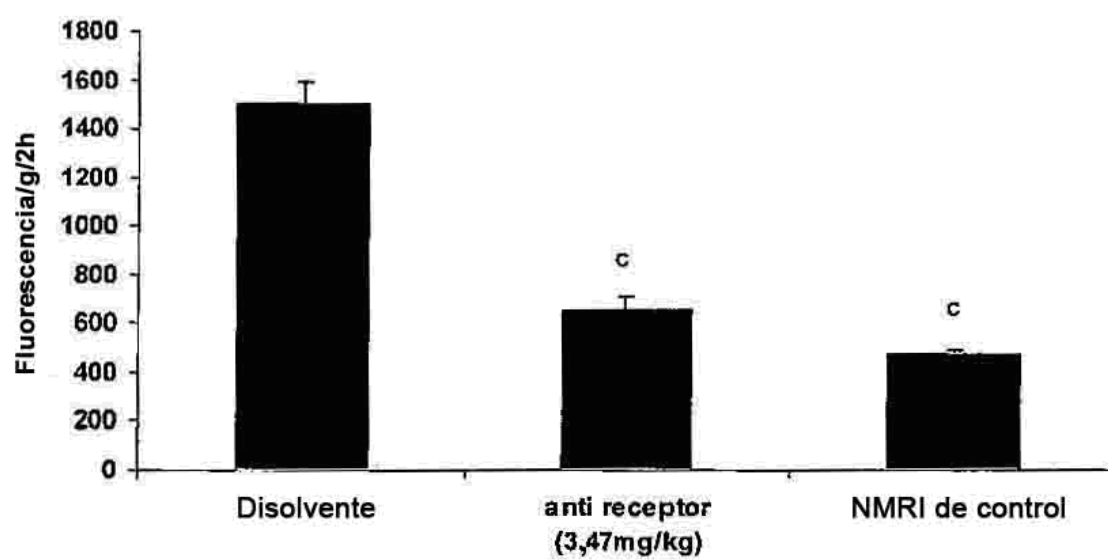


Figura 12D

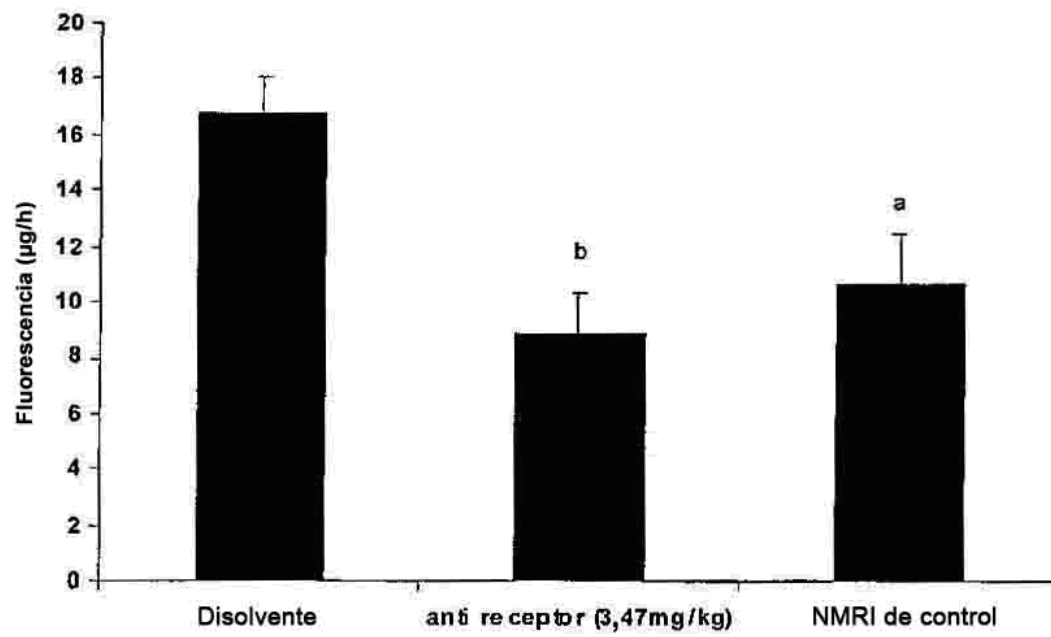


Figura 13A

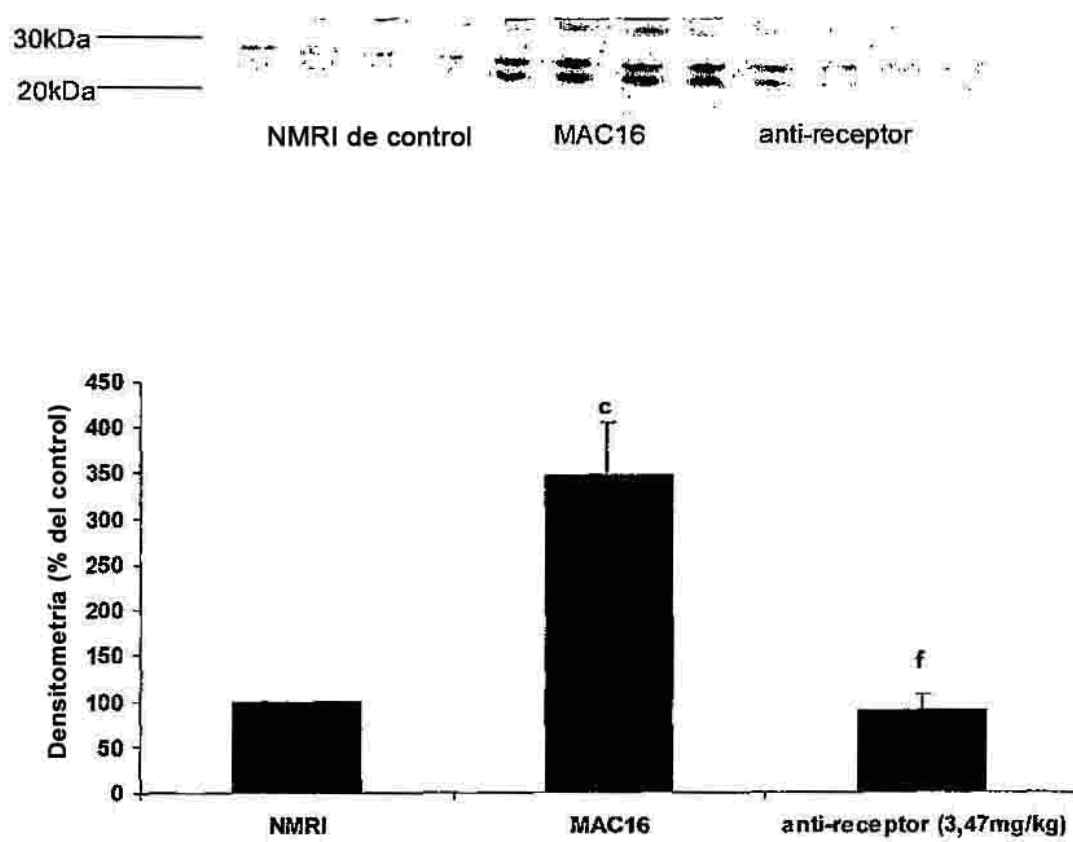


Figura 13B

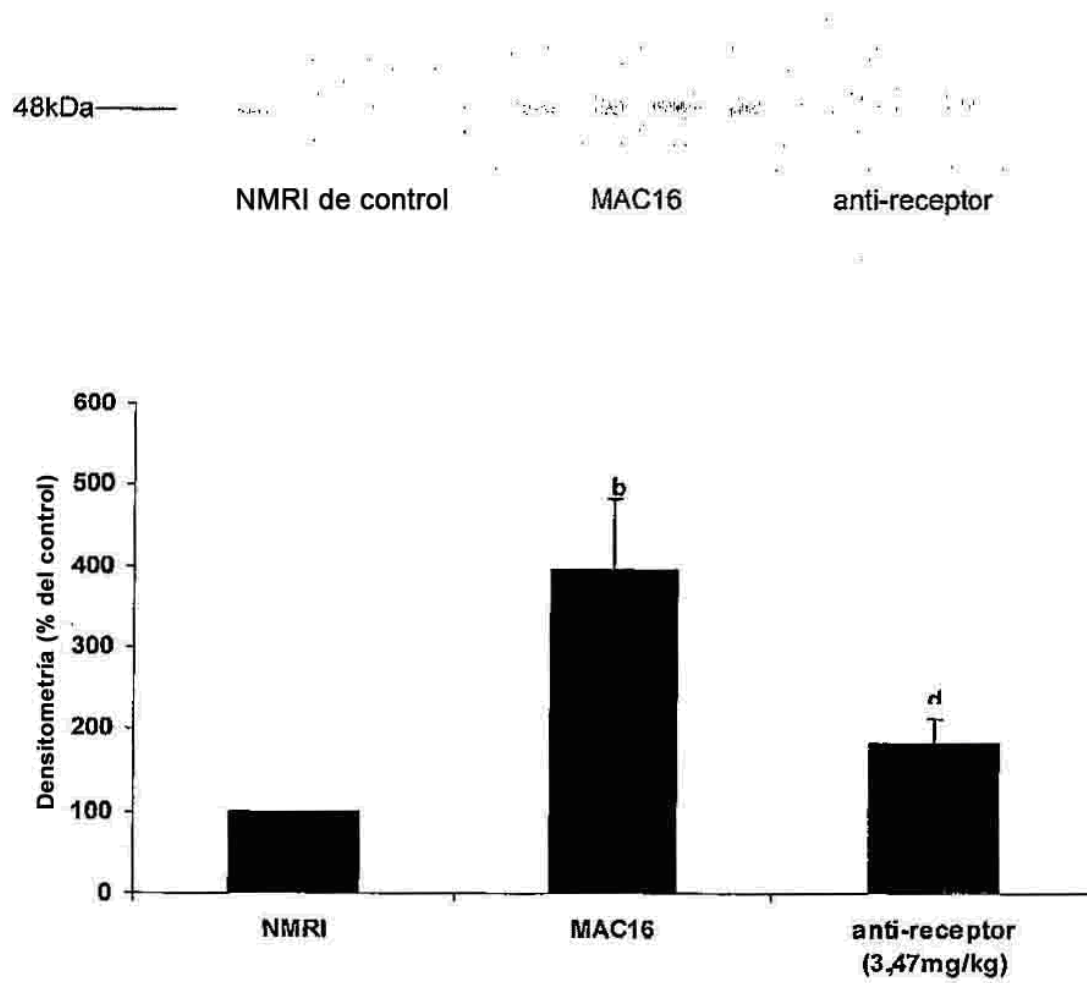


Figura 13C

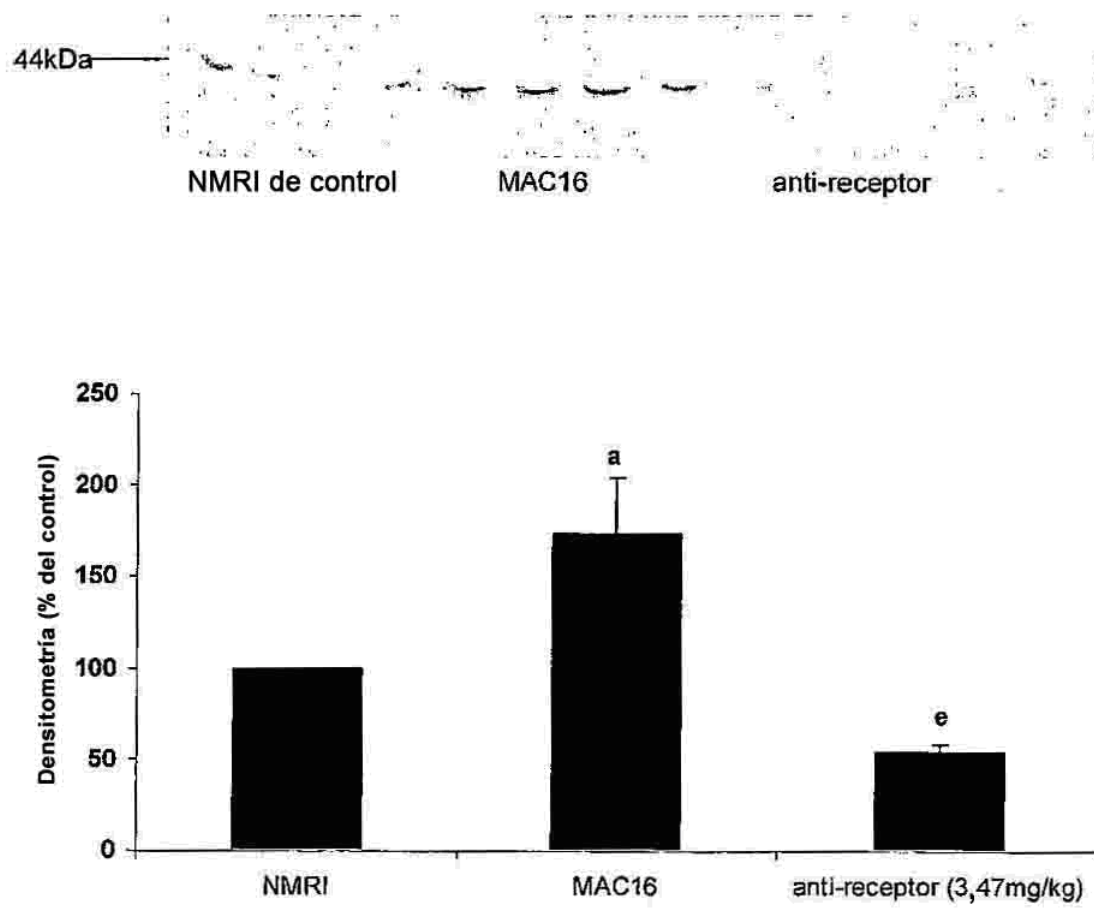


Figura 13D

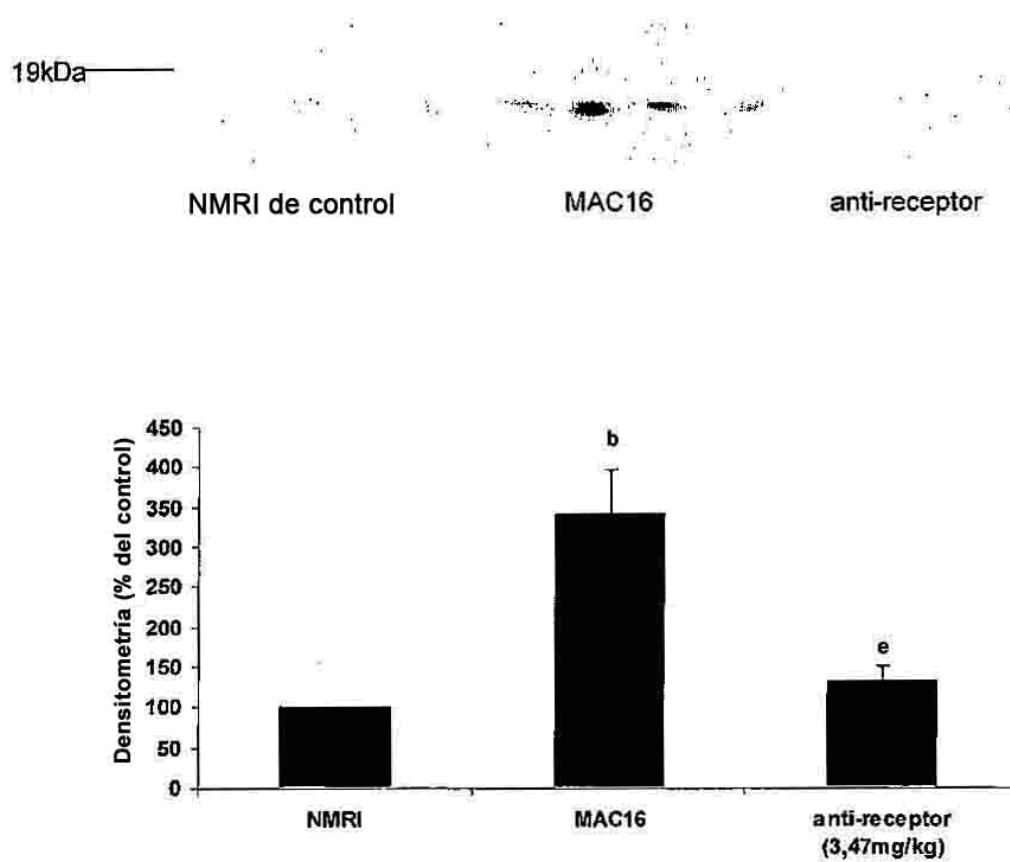


Figura 13E

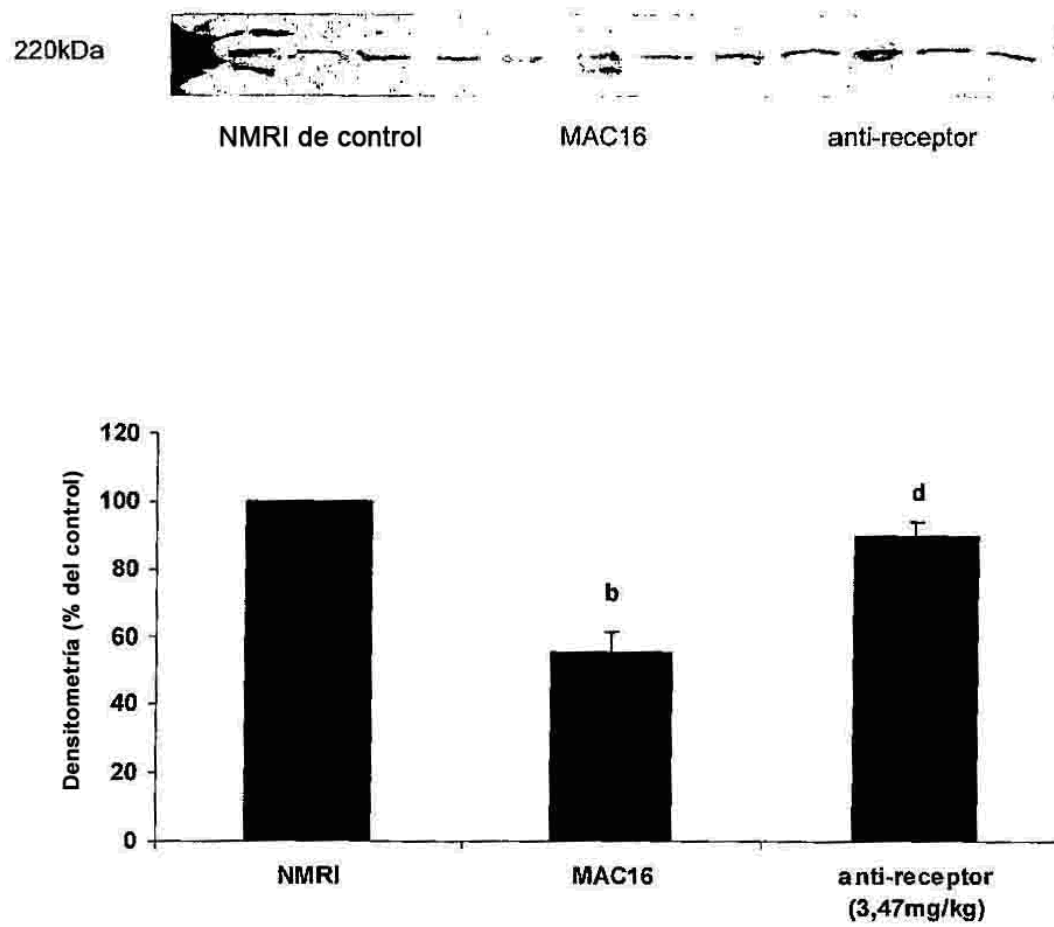


Figura 13F

