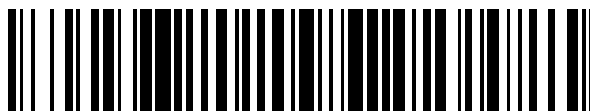


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 865**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2005 E 11183884 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2441466**

54 Título: **Agente de inhibición de MIC-1**

30 Prioridad:

**13.04.2004 AU 2004901957**

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

**05.11.2014**

73 Titular/es:

**ST VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY LIMITED  
(100.0%)**

**Centre for Immunology Victoria Street  
Sydney, NSW 2010 , AU**

72 Inventor/es:

**BRIET, SAMUEL NORBET y  
BAUSKIN, ASNE RHODA**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 518 865 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Agente de inhibición de MIC-1

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un agente de inhibición de MIC-1 que disminuye el nivel en suero de MIC-1 endógena. El agente de inhibición de MIC-1 es para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece pérdida de peso asociada con un cáncer que sobreexpresa MIC-1.

10

**Antecedentes de la invención**

El control del peso corporal es un proceso complejo que en la actualidad se entiende de manera incompleta. Es multifactorial y está influido por el apetito, la ingestión y excreción de alimentos, la utilización y el gasto de energía. Se sabe que varios mediadores solubles están implicados en la regulación de diversos aspectos de este proceso e incluyen hormonas y citocinas tales como leptina, grelina, melacortina, péptido relacionado con la proteína agouti y neuropéptido Y (NPY). Un control del peso normal es importante para la buena salud y especialmente la obesidad puede aumentar enormemente la morbimortalidad en individuos. Un peso inferior al promedio también puede ser problemático, y en sociedades desarrolladas, en las que está disponible alimento suficiente, esto se debe más frecuentemente a enfermedades incluyendo algunos trastornos inflamatorios crónicos, trastornos de la alimentación tales como anorexia nerviosa y cáncer. Especialmente en los estadios tardíos de cáncer, es común la caquexia (produciéndose en la mayoría de los pacientes con cáncer enfermos terminales), y es responsable de aproximadamente un cuarto de todas las muertes relacionadas con cáncer.

15

20

25

30

35

40

Hace algunos años, el presente solicitante clonó y caracterizó una citocina de la superfamilia de TGF- $\beta$  humano novedosa que se denominó citocina-1 inhibidora de macrófagos (MIC-1) (1-7), pero desde entonces también se ha conocido como factor derivado de la próstata (PDF), proteína morfogenética ósea placentaria (PLAB) y factor-15 de crecimiento/diferenciación (GDF-15) (7). En condiciones de reposo, la placenta es el único tejido que expresa grandes cantidades de MIC-1 (7), pero células epiteliales en una amplia variedad de otros órganos también expresan normalmente pequeñas cantidades de ARNm de MIC-1. Sin embargo, este bajo nivel de la expresión de MIC-1 normal aumenta drásticamente en neoplasia maligna, inflamación y lesión (7, 8-11), induciéndose el aumento por una amplia variedad de estreses celulares y factores de activación, y está mediado de manera intracelular particularmente por el factor de transcripción p53 y EGR-1 (12-15). En particular, el aumento de la expresión de MIC-1 se ha vinculado fuertemente a cánceres de mama, de próstata, pancreático y de colon (9-11, 17, 18), y en un estudio recientemente publicado (20) de varios cientos de pacientes con pólipos colónicos o cáncer de colon, el presente solicitante mostró que se produce una elevación de los niveles en suero de MIC-1 de una manera gradual progresiva, reflejando la patogénesis del cáncer de colon, con progresión desde normal hasta benigno y luego a pólipos colónicos displásicos y finalmente cáncer de colon. Esta observación, junto con resultados de otros estudios (15, 17, 19, 21), sugiere que MIC-1 tiene un papel importante en la progresión tumoral, induciendo efectos paracrinos significativos que modulan el entorno tumoral.

45

En el trabajo que conduce a la presente invención, se había observado que los niveles en suero de MIC-1 de pacientes en los estadios tardíos de uno de los cánceres epiteliales mencionados anteriormente (por ejemplo niveles en suero de 10 a 50 ng/ml o más) se correlacionaban con los niveles en suero en ratones que estaban sobreexpresando MIC-1 y que mostraban pérdida de peso notable. Por tanto, se propuso que la caquexia comúnmente mostrada en pacientes con cáncer asociado con un aumento de la expresión de MIC-1 se debe a la sobreexpresión de MIC-1 y que inhibiendo esa expresión (por ejemplo con anticuerpos anti-MIC-1), sería posible invertir o reducir la gravedad de la pérdida de peso.

50

El documento WO01/81928 describe métodos para diagnosticar diversas enfermedades, incluyendo cáncer, que implican determinar la presencia de, o niveles anómalos de, MIC-1 en una muestra corporal. El documento WO99/06445 da a conocer la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de MIC-1 humana (denominada GDF-15 en el mismo).

55 **Sumario de la invención**

La invención puede resumirse en los siguientes párrafos numerados:

60

1. Un agente de inhibición de MIC-1 que disminuye el nivel en suero de MIC-1 endógena, en el que dicho agente de inhibición se selecciona de un anticuerpo anti-MIC-1 o un fragmento de unión a MIC-1 del mismo para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece pérdida de peso asociada con un cáncer que sobreexpresa MIC-1.

65

2. Un agente de inhibición de MIC-1 para el uso según el párrafo 1, en el que dicho agente de inhibición de MIC-1 es un anticuerpo monoclonal anti-MIC-1.

3. Un agente de inhibición de MIC-1 para el uso según el párrafo 1 o el párrafo 2, en el que dicho agente de

inhibición de MIC-1 es un anticuerpo monoclonal anti-MIC-1 humanizado.

4. Un agente de inhibición de MIC-1 para el uso según uno cualquiera de los párrafos 1 a 3, caracterizado porque dicha pérdida de peso está asociada con cáncer avanzado.

5 En el presente documento se describe un método de modulación del apetito y/o peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de modulación de MIC-1, en el que dicho agente aumenta o disminuye la cantidad de MIC-1 presente en dicho sujeto, o inhibe o potencia la actividad biológica de MIC-1 presente en dicho sujeto.

10 En el presente documento se describe un método para aumentar el apetito y/o peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de inhibición de MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador y/o excipiente farmacológicamente aceptable.

15 En el presente documento se describe un método para disminuir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de potenciación de MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador y/o excipiente farmacológicamente aceptable.

**Breve descripción de las figuras**

20 La figura 1 proporciona un diagrama esquemático del procesamiento del precursor de MIC-1 hasta su forma madura, de 112 aminoácidos. La escisión del propéptido del dominio maduro se produce en Arg<sup>196</sup>.

25 La figura 2 muestra gráficamente la relación entre el peso de ratones desnudos y los niveles en suero de MIC-1 humana en sangre recogida cuando el más grande de los tumores de ratón ha alcanzado aproximadamente 1 cm de diámetro. Se xenoinjertaron en ratones desnudos células DU145 humanas modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar cualquiera de;

- 30 (i) MIC-1 humana de longitud completa (incluyendo el propéptido) (serie 3),
- (ii) MIC-1 humana madura (sin propéptido) (serie 1),
- (iii) MIC-1 humana incluyendo el propéptido pero con delección del sitio de proconvertasa similar a furina (FURIN DEL) (serie 2), y
- 35 (iv) sólo control negativo de vector (serie 4).

La figura 3 muestra gráficamente la relación entre la pérdida de peso en porcentaje de ratones desnudos (en comparación con el peso al comienzo del experimento) y los niveles en suero de MIC-1 humana en sangre recogida cuando el más grande de los tumores de ratón había alcanzado aproximadamente 1 cm de diámetro.

Se xenoinjertaron en ratones desnudos células DU145 humanas modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar;

- 45 (i) MIC-1 humana de longitud completa (incluyendo el propéptido) (serie 3),
- (ii) MIC-1 humana madura (sin propéptido) (serie 1),
- (iii) MIC-1 humana incluyendo el propéptido pero con delección del sitio de proconvertasa similar a furina (FURIN DEL) (serie 2), y
- 50 (iv) sólo control negativo de vector (serie 4).

55 La figura 4 proporciona resultados gráficos del efecto de anticuerpos anti-MIC-1 humana de oveja sobre el peso de ratones (g). (A) En el día 27, se les administraron a dos ratones 10 mg (por vía intraperitoneal) de IgG purificada de oveja inmunizada con MIC-1 recombinante altamente purificada para desarrollar anticuerpos de alto título frente a MIC-1 humana. (B) En el día 27, se les administraron a dos ratones 10 mg (por vía intraperitoneal) de IgG purificada control de suero de oveja normal. Los gráficos A y B muestran datos representativos de cada uno de los ratones en los dos grupos.

60 La figura 5 proporciona los resultados de una evaluación de la pérdida de peso con una línea de ratón transgénico (TG) que sobreexpresa MIC-1 min 28. El peso corporal se redujo significativamente ( $P < 0,001$ ) en ratones min 28 tanto machos como hembras en comparación con compañeros de camada de tipo natural congénicos (3 crías, de 59 a 61 días de edad).

65 La figura 6 proporciona los resultados de una evaluación de la pérdida de peso con una línea de ratón transgénico

(TG) que sobreexpresa MIC-1 min 75. El peso corporal se redujo significativamente ( $P < 0,001$ ) en ratones min 75 tanto machos como hembras en comparación con compañeros de camada de tipo natural (WT) congénicos (3 crías, de 59 a 61 días de edad).

5 La figura 7 muestra una comparación del peso corporal (g) de ratones de tipo natural (símbolos en negro, WT) y ratones compañeros de camada transgénicos heterocigotos (TG, símbolos en blanco) de siete camadas. El número indica el peso promedio de ratones heterocigotos en comparación con sus compañeros de camada de tipo natural dentro de cada camada. Los ratones WT y TG recién nacidos (menos de ratones  $< 48$  h de edad) no son significativamente diferentes en pesos corporales.

10 La figura 8 muestra que la administración de un anticuerpo monoclonal (AcM26) frente a MIC-1 humana puede revertir la pérdida de peso en ratones desnudos xenoinjertados con células DU145 humanas que se han transducido para sobreexpresar MIC-1 usando un constructo de MIC-1 humana madura (sin propéptido). Los ratones en los que se inyectaron células DU145 que sobreexpresaban MIC-1 comenzaron a perder peso rápidamente. La administración de una única inyección de AcM26, en cantidades de entre 0,1 y 1 mg, en el día 11, provocó un aumento en el peso, cuya magnitud, y cuya duración, aumentaron con cantidades crecientes de AcM26 (A-C). No hubo ningún efecto de AcM26 sobre el crecimiento tumoral (D-F). Ratones no tratados (G) y ratones tratados con tampón de PBS solo (H) perdieron peso de manera rápida y continua a lo largo del transcurso del experimento. Peso (g) sobre el eje vertical.

20 La figura 9 muestra una comparación de la ingesta de alimento, diariamente a lo largo de 3 días sucesivos, en ratones desnudos xenoinjertados con células DU145 humanas que se han transducido para sobreexpresar MIC-1 usando un constructo de MIC-1 humana madura (sin propéptido) y ratones control que recibieron células DU145 transducidas con un constructo control.

25 La figura 10 muestra una comparación de los pesos de almohadillas grasas y músculos en ratones desnudos xenoinjertados con células DU145 humanas que se han transducido para sobreexpresar MIC-1 usando un constructo de MIC-1 humana madura (sin propéptido) y ratones control que recibieron células DU145 transducidas con un constructo control. Se representan MIC-1 que llevan tumores de expresión de DU145 mediante barras sombreadas y las barras en blanco representan ratones que llevan tumores control. Se emprendió una comparación estadística usando la prueba de la  $t$  y el número de estrellas indica una significación estadística creciente desde  $p = 0,003$  hasta  $p < 0,0001$ . Hubo una disminución notable en el peso de grasa corporal en grasa inguinal, grasa epididimal y grasa retroperitoneal. No hubo ninguna diferencia significativa en el peso de músculos entre los dos grupos de ratones. NS = no significativo \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

35 La figura 11 muestra la ingesta de alimento en ratones transgénicos para MIC-1 en comparación con controles de tipo natural. Se alojaron individualmente 5 ratones de tipo natural (WT) y 6 transgénicos (TG) en jaulas, y se dejaron durante 48 horas para que se adapten al alojamiento individual. Se pesó el alimento colocado en la tolva en el punto de tiempo cero. Cada 24 horas, se estimó el alimento consumido restando el rechazo y el derrame del peso del alimento puesto en el interior de la tolva. Se midió la ingesta de alimento a lo largo de cuatro periodos separados por 24 horas. La ingesta de alimento por ratón/día fue significativamente mayor en animales WT ( $p < 0,03$ ) (A). Sin embargo, esta diferencia desapareció cuando la ingesta de alimento se corrigió para el peso corporal del ratón (B).

45 La figura 12 muestra los pesos de órganos de ratones transgénicos (TG) para MIC-1 y ratones de tipo natural (WT). Abreviaturas: m = macho, h = hembra, epid = epididimal, ut = uterino, retroperit = retroperitoneal. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

50 La figura 13 muestra los resultados de ensayos para MIC-1 que se une a fetuina. Se incubó MIC-1 recombinante purificada (en BSA al 0,1%) con perlas de agarosa recubiertas con fetuina. Entonces se lavaron las perlas y se analizó el material unido mediante SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo anti-MIC-1. Carril 1, MIC-1 recombinante purificada; carril 2, MIC-1 unida a perlas de fetuina; carril 3, sólo perlas de fetuina; carril 4, MIC-1 incubada sólo con perlas de agarosa. La flecha indica las bandas de MIC-1.

55 La figura 14 muestra secciones del cerebro de ratones adultos normales en la región del hipotálamo y el tercer ventrículo (V3) se cortó y se sometió a (A) hibridación *in situ* para MIC-1 usando una sonda de ARN marcada con  $^{35}\text{S}$  y autorradiografía y (B) inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales purificados por afinidad internos frente a MIC-1 murina recombinante. Las secciones muestran la expresión de proteínas y ARNm de MIC-1 en la región del núcleo arciforme (AN) y región paraventricular.

## 60 Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado previamente que muchos cánceres, especialmente de origen epitelial, sobreexpresan MIC-1 y que los niveles de MIC-1 en suero aumentan en pacientes con estos cánceres en proporción con el estadio y grado de la enfermedad. Especialmente en estadios tardíos de cáncer, estos niveles en suero pueden alcanzar de 10 a 50 ng/ml o más, niveles que en ratones están asociados con una pérdida de peso notable. Reduciendo los niveles de MIC-1 o la actividad de MIC-1 en pacientes con cáncer, se espera que pueda revertirse o reducirse la pérdida de peso y los

efectos de la enfermedad posteriores sobre el bienestar y la estima del paciente. A su vez, esto puede ayudar a la capacidad del paciente que va a tratarse contra el cáncer y que responda positivamente a la terapia, y de ese modo se reduzca la morbimortalidad.

- 5 En el presente documento se describe un método de modulación del apetito y/o el peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de modulación de MIC-1, en el que dicho agente aumenta o disminuye la cantidad de MIC-1 presente en dicho sujeto, o inhibe o potencia la actividad biológica de MIC-1 presente en dicho sujeto ("método 1").
- 10 Cuando se lleva a cabo el método para disminuir la cantidad de MIC-1 presente en el sujeto (particularmente, para disminuir el nivel en suero de MIC-1), o inhibir la actividad de MIC-1, el método puede aumentar el apetito y/o conducir a un aumento en el peso corporal o, al menos, una reducción en cualquier pérdida de peso corporal en el sujeto. Por otro lado, cuando se lleva a cabo el método para aumentar la cantidad de MIC-1 (particularmente, para aumentar el nivel en suero de MIC-1), o potenciar la actividad de MIC-1, el método puede disminuir el apetito y/o
- 15 conducir a una disminución en el peso corporal o, al menos, una reducción en cualquier ganancia de peso corporal en el sujeto.

En el presente documento se describe un método para aumentar el apetito y/o el peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de inhibición de MIC-1

20 opcionalmente en mezcla con un portador y/o excipiente farmacológicamente aceptable. ("Método 2").

El método 2 implica la administración de un agente de inhibición de MIC-1. Un agente de este tipo puede disminuir la cantidad de MIC-1 endógena en el sujeto (particularmente, el nivel en suero de MIC-1 endógena), y puede seleccionarse de anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de los mismos (por ejemplo fragmentos Fab o fragmentos scFv recombinantes (22)), moléculas de oligonucleótidos catalíticos e inhibidores dirigidas contra el gen *MIC-1* (por

25 ejemplo ribozimas, ADNzimas, ARN antisentido y ARN inhibidor pequeño (ARNip)) e inhibidores de la transcripción o traducción de *MIC-1*. Alternativamente, el agente de inhibición de MIC-1 puede inhibir la actividad de MIC-1 endógena en el sujeto, y puede seleccionarse de anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de los mismos (por ejemplo fragmentos Fab o fragmentos scFv recombinantes), dominios de receptores extracitoplasmáticos solubles de receptores de MIC-1, otras moléculas solubles o proteínas asociadas a la matriz que se unen a MIC-1 (por ejemplo

30 heparina, heparán sulfato y fetuina) e inhibidores peptídicos, peptidomiméticos o de molécula orgánica pequeña de, por ejemplo, la unión de MIC-1 a su receptor. Adicionalmente, los inhibidores peptídicos, peptidomiméticos o de molécula orgánica pequeña podrían inhibir la actividad de MIC-1 endógena inhibiendo la fosforilación del receptor de MIC-1 o la transmisión de información de señalización desde el receptor de MIC-1 hasta el núcleo celular, o la

35 acción del/de los factor(es) de transcripción relevante(s) sobre el genoma celular. Además, el agente de inhibición de MIC-1 puede ser un inhibidor de la enzima proconvertasa responsable de la escisión del propéptido del dominio de proteína MIC-1 madura. Tal como se muestra en el ejemplo 1 a continuación en el presente documento, MIC-1 inmadura (es decir proMIC-1) se asocia con la matriz extracelular, y por tanto mediante la inhibición de la enzima proconvertasa responsable del procesamiento de MIC-1, puede "encerrarse" MIC-1 en la matriz extracelular. La

40 enzima proconvertasa puede inhibirse mediante, por ejemplo, (a) transfección de células con una alfa-1-antitripsina mutante, alfa-1-antitripsina Portland, (b) péptidos de poliarginina; y (c) péptidos basados en la secuencia de la proteína diana para la proconvertasa, que abarcan la secuencia de propéptido y la secuencia de proconvertasa de la proteína diana.

45 El agente de inhibición de MIC-1 es un anticuerpo anti-MIC-1 o fragmento del mismo, y preferiblemente, un anticuerpo anti-MIC-1 monoclonal humanizado. Pueden producirse anticuerpos anti-MIC-1 humanizados según los métodos descritos en la patente estadounidense n.º 5.225.539.

El método 2 es útil para el tratamiento de un sujeto que padece disminución del apetito y/o pérdida de peso asociada

50 con una enfermedad inflamatoria (por ejemplo artritis reumatoide) y/o cáncer (particularmente, un cáncer epitelial tal como cáncer de mama, de próstata, de colon, de recto, de vejiga y pancreático). Sin embargo, el método también puede ser útil para el tratamiento de la disminución del apetito y/o pérdida de peso asociada con cualquier otra enfermedad, estado o tratamiento en el que se sobreexpresa MIC-1 (por ejemplo lesión, inflamación, estrés y radioterapia y quimioterapia). Los sujetos adecuados para el tratamiento con el método del segundo aspecto pueden limitarse a los que muestran sobreexpresión de MIC-1 o, al menos, un nivel en suero de MIC-1 de manera constante

55 en el extremo alto del nivel en suero normal de 200-1200 pg/ml. Pueden seleccionarse tales sujetos mediante la detección de un alto nivel de MIC-1 en suero (por ejemplo a partir de una muestra de sangre completa o suero), usando un ensayo para MIC-1 (por ejemplo un ELISA para MIC-1 (4)).

60 El método 2 se usa para el tratamiento de un sujeto que padece disminución del apetito y/o pérdida de peso asociada con cáncer avanzado, en el que una alta masa tumoral total conduce a menudo a un alto nivel en suero de MIC-1.

En el presente documento se describe un método para disminuir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de potenciación de MIC-1

65 opcionalmente en mezcla con un portador y/o excipiente farmacológicamente aceptable. ("Método 3").

El método 3 implica la administración de un agente de potenciación de MIC-1. Un agente de este tipo puede aumentar la cantidad de MIC-1 endógena en un sujeto (particularmente, el nivel en suero de MIC-1 endógena), y puede seleccionarse de MIC-1 y agentes que potencian la transcripción o traducción del gen *MIC-1* (por ejemplo el factor de transcripción p53, que se observa a menudo en niveles elevados en enfermedades asociadas con sobreexpresión de MIC-1, o agentes que potencian la expresión o actividad de p53 tal como nutlina (23)). Alternativamente, el agente de potenciación de MIC-1 puede potenciar la actividad de MIC-1 endógena en el sujeto. Tal como se usa en el presente documento, el término agente de potenciación de MIC-1 ha de considerarse que incluye agentes que imitan la actividad de MIC-1 (por ejemplo fragmentos de MIC-1 activos, miméticos peptídicos de los dominios activos de MIC-1 y moléculas orgánicas pequeñas que imitan la actividad de MIC-1).

El método 3 es útil para el tratamiento de un sujeto que padece obesidad o que de otro modo podría desear una pérdida de peso por motivos de bienestar o vanidad.

Pueden formularse agentes de modulación de MIC-1 para su uso en los métodos descritos en el presente documento para dar cualquier composición farmacéutica/veterinaria o forma farmacéutica adecuada (por ejemplo composiciones para administración oral, bucal, nasal, intramuscular e intravenosa). Normalmente, una composición de este tipo se administrará al sujeto en una cantidad que es eficaz para modular el apetito y/o peso corporal, y por tanto puede proporcionar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 µg/kg de peso corporal al día del agente de modulación de MIC-1, y proporcionando más preferiblemente desde 0,05 hasta 25 µg/kg de peso corporal al día del agente de modulación de MIC-1. Puede destinarse una composición adecuada a administración diaria única, administración diaria múltiple o liberación controlada o sostenida, según se necesite para conseguir los resultados más eficaces.

Además de los agentes de modulación de MIC-1 identificados anteriormente, otros agentes de modulación de MIC-1 pueden identificarse examinando agentes candidatos o bibliotecas de agentes para detectar un efecto sobre la cantidad de MIC-1 presente en un sujeto y/o sobre la actividad de MIC-1. De una manera similar, podrían evaluarse agentes para el tratamiento de diversas enfermedades o estados para detectar efectos secundarios no deseados sobre el apetito y/o peso corporal (por ejemplo supresión no deseada o potenciación del apetito).

En el presente documento se describe un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, comprendiendo dicho método administrar dicho agente a dicho sujeto o un modelo animal adecuado del mismo (por ejemplo un ratón), y detectar cualquier aumento o disminución en la cantidad de MIC-1 (particularmente, el nivel de MIC-1 en suero) en dicho sujeto o modelo animal ("método 4").

Puede identificarse cualquier aumento o disminución en la cantidad de MIC-1 en el sujeto o modelo animal obteniendo muestras de MIC-1 (por ejemplo muestras de sangre completa o suero) antes y después de la administración de dicho agente, y determinando la cantidad respectiva de MIC-1 en dichas muestras (por ejemplo con un ELISA para MIC-1).

En el presente documento se describe un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, comprendiendo dicho método formar una mezcla entre MIC-1 (o un fragmento funcional o mimético de la misma), una pareja de unión a MIC-1 (preferiblemente, un receptor de MIC-1 o un fragmento funcional o mimético del mismo) y dicho agente, y detectar cualquier aumento o disminución en la unión entre la MIC-1 (o fragmento funcional o mimético de la misma) y la pareja de unión a MIC-1 ("método 5").

Un aumento en la unión puede indicar que es probable que el agente disminuya el apetito y/o peso corporal de un sujeto. Por otro lado, una disminución en la unión puede indicar que es probable que el agente aumente el apetito y/o peso corporal de un sujeto.

En el presente documento se describe un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, comprendiendo dicho método exponer una célula que expresa MIC-1 a dicho agente y detectar cualquier aumento o disminución en el nivel de dicha expresión de MIC-1 ("método 6").

Un aumento en la expresión de MIC-1 puede indicar que es probable que el agente disminuya el apetito y/o peso corporal de un sujeto. Por otro lado, una disminución en la expresión de MIC-1 puede indicar que es probable que el agente aumente el apetito y/o peso corporal de un sujeto.

Preferiblemente, este método se realiza *in vitro* usando una célula o línea celular que expresa MIC-1 seleccionada de macrófagos, células epiteliales, células endoteliales y líneas celulares de los mismos.

En el presente documento se describe un método de evaluación del apetito en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar la cantidad de MIC-1 (particularmente, el nivel de MIC-1 en suero) presente en dicho sujeto ("método 7").

Un método de este tipo también puede ser predictivo de la masa corporal futura.

El hallazgo de que la sobreexpresión de MIC-1 parece disminuir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, sugiere que métodos de terapia génica para aumentar el nivel de MIC-1 en un sujeto pueden proporcionar un tratamiento eficaz de la obesidad. Por tanto, en el presente documento también se contemplan métodos de terapia génica, y agentes de terapia génica, para disminuir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, que comprenden genes *MIC-1* recombinantes para provocar una expresión de MIC-1 endógena aumentada. Los vectores adecuados para la introducción de genes *MIC-1* incluyen vectores adenovirales o asociados a adenovirus recombinantes, vectores retrovirales recombinantes, vectores de lentivirus recombinantes, liposomas que incluyen ADN lineal y células madre transducidas o transformadas.

Con el fin de que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse más claramente, se describirán ahora formas preferidas de la misma con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

#### **EJEMPLO 1 Regulación de los niveles de MIC-1 en suero**

Se sintetiza MIC-1, como otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  de proteínas, como un precursor que contiene un propéptido N-terminal y un dominio de MIC-1 madura C-terminal. El precursor experimenta dimerización por enlaces disulfuro en el retículo endoplásmico (RE) y, una vez que se dimeriza, deja el RE por el aparato de Golgi, en el que una convertasa similar a furina lo escinde en un sitio RXXR conservado (aminoácido 196) (SEQ ID n.º 1). Esta escisión separa el propéptido del dominio C-terminal maduro y por tanto se libera MIC-1 como un dímero unido por enlaces disulfuro (1) de 24,5 kD (figura 1).

Se ha encontrado previamente que se secretan normalmente cantidades sustanciales de MIC-1 en una forma no procesada. Por ejemplo, se ha encontrado que se secreta proMIC-1 no procesada endógena a partir de una variedad de células incluyendo la línea celular trofoblástica BeWo (4), las líneas celulares de cáncer de próstata LnCAP y PC3, la línea celular pancreática Panc 1 y la línea celular monocitoide U937. En la línea de adenocarcinoma de próstata, LnCAP, se ha encontrado que proMIC-1 no procesada se asocia con la matriz extracelular (MEC), mientras que MIC-1 madura se localiza en el medio acondicionado (24). Estudios preliminares con transfectantes de MDCK también han demostrado que la asociación con MEC también está mediada por una región C-terminal del propéptido en los aminoácidos 144-195. Adicionalmente, tanto propéptido recombinante purificado como proMIC-1 interactúan con heparina a través de la misma región C-terminal del propéptido.

La asociación de proMIC-1 con la MEC sugiere que la asociación con MEC puede proporcionar almacenamiento local de MIC-1 latente, en el que el procesamiento de la proMIC-1 almacenada daría como resultado la liberación rápida de MIC-1 madura (que tiene poca afinidad por la MEC) a la circulación. Para someter a prueba este concepto, se desarrolló un modelo de xenoinjerto tumoral en ratones desnudos (16).

#### **Materiales y métodos**

Usando la línea de carcinoma de próstata humana DU145 (17), que no produce MIC-1 endógena (en gran parte porque las células no producen p53 funcional) y por tanto es útil como vehículo para expresar diversos constructos de MIC-1 humana, se generaron líneas celulares DU145 transfectadas y subclonadas permanentemente que se transdujeron con vectores de expresión eucariotas (vector IRES II EGFP, Clontech) que contenían secuencias que codificaban para cualquiera de:

- (i) proMIC-1 humana de longitud completa (excepto usando un péptido líder de FSH, en vez del líder natural) (1),
- (ii) MIC-1 humana madura (sin propéptido, pero incluyendo un líder de FSH),
- (iii) proMIC-1 humana (incluyendo un líder de FSH) con una delección de la secuencia de aminoácidos RGRRRAR (SEQ ID n.º 2) que incluye el sitio de proconvertasa similar a furina (mostrado en negrita), impidiendo de ese modo el procesamiento y liberación posterior de MIC-1 madura del propéptido, y
- (iv) sólo control negativo de vector (5).

Se seleccionaron subclones de alta expresión basándose en la expresión de EGFP. Se inyectaron estas células por vía subcutánea en el costado de ratones desnudos BALB/c nu/nu inmunodeficientes. Se monitorizaron los ratones regularmente y se determinó su peso en una base de 2-3 veces al día. Se sacrificaron los ratones aproximadamente 2 meses tras la inyección o cuando el diámetro del tumor alcanzó 1,1 cm. Se obtuvo suero de estos ratones justo antes de sacrificarlos, para la estimación del nivel de MIC-1 humana mediante ELISA (4, 16, 18). Este ELISA para MIC-1 humana no reacciona de manera cruzada con MIC-1 murina, y se ha usado previamente para la medición satisfactoria y exclusiva de los niveles de MIC-1 tumoral humana en ratones (16).

#### **Resultados**

Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. Sólo los ratones con tumores que expresaban MIC-1 madura

mostraron un nivel drásticamente elevado de MIC-1 en suero. Los tumores de ratón que expresaban el mutante FURIN DEL de MIC-1, que no pudo procesarse de manera normal y por tanto contenía el propéptido, tenían niveles de MIC-1 en suero notablemente inferiores. Mediante la extrapolación de datos *in vitro*, parece que este resultado se debe a una asociación estrecha del mutante FURIN DEL con la MEC.

## 5 Discusión

Los resultados obtenidos en este ejemplo indican que el propéptido de MIC-1 es importante en la regulación de la distribución de MIC-1 entre tejidos y sangre. Como tal, se esperaría que cualquier sustancia que se una al propéptido de MIC-1 (por ejemplo heparina y heparán sulfato), o que compita de otro modo con los sitios de unión a la matriz en el propéptido (por ejemplo el propio propéptido purificado recombinante), aumente el nivel de MIC-1 en la circulación. Como consecuencia, se modularían las funciones mediadas por MIC-1 en suero, incluyendo el apetito.

### 15 EJEMPLO 2 Modulación del apetito mediante MIC-1

A lo largo del transcurso de la investigación descrita en ejemplo 1, se observó que de los ratones modelo de xenoinjerto, los que llevaban un tumor que sobreexpresaba MIC-1, o bien perdían peso, o bien no ganaban tanto peso como los ratones control. Por tanto, se realizaron estudios para determinar el grado y motivo del efecto observado sobre el peso de los ratones.

#### 20 Materiales y métodos

Se pesaron los ratones justo antes del sacrificio y se comparó el peso/% de pérdida de peso frente a los niveles de MIC-1 en suero medidos (es decir, tal como se determina mediante ELISA descrito en el ejemplo 1).

Para evaluar si los niveles de MIC-1 en suero eran responsables de la pérdida de peso observada, se realizó un segundo estudio en el que se les inyectó a ratones desnudos por vía subcutánea el clon de DU145 que sobreexpresaba MIC-1 humana madura (y que se había asociado previamente con los más altos niveles de MIC-1 en suero) y en el día 27, después de que los ratones hubiesen perdido un peso sustancial, se les inyectó por vía intraperitoneal o bien 1 mg o bien 10 mg de IgG de oveja purificada control o IgG purificada de suero de oveja que se había inmunizado con MIC-1 recombinante humana y tenía anticuerpos de alto título frente a MIC-1 humana. Esta IgG anti-MIC-1 humana de oveja reaccionaba con alta afinidad frente a MIC-1 humana y se había usado previamente en un ELISA para MIC-1.

Para demostrar adicionalmente que la pérdida de peso observada estaba mediada por MIC-1 y no por otro producto derivado de tumores, se realizó una evaluación de la pérdida de peso de dos líneas de ratones transgénicos (min 28 y min 75; creadas ambas en ratones C57B16) que sobreexpresan MIC-1 murina bajo el control del promotor c-fms específico de macrófagos.

#### 40 Resultados

En los estudios realizados con IgG anti-MIC-1 humana de oveja, se encontró que 1 mg de IgG anti-MIC-1 humana de oveja no producía ninguna diferencia en el peso del ratón (datos no mostrados), sin embargo 10 mg de IgG anti-MIC-1 (véase la figura 4A) indujo una ganancia de peso rápida en los respectivos ratones desnudos que llevaban tumores (véanse los resultados mostrados en la figura 4B con 10 mg de IgG control). Esta ganancia de peso alcanzó el máximo de 5 a 6 días tras la administración de los anticuerpos, y entonces gradualmente los ratones empezaron a perder peso a lo largo de los siguientes 7 a 10 días.

Se muestran los resultados de la evaluación de la pérdida de peso en las líneas de ratones transgénicos min 28 y min 75 en las figuras 5 a 7 e indican que estos ratones son también sustancialmente más pequeños que sus compañeros de camada congénicos de tipo natural. En estos ratones, el peso al nacer es igual y las diferencias en el peso comienzan a aparecer tras las primeras pocas semanas de vida.

#### 55 Discusión

La pérdida de peso observada fue muy drástica en algunos ratones y se encontró que estaba relacionada con el nivel en suero de MIC-1 humana derivada de tumores. Los ratones transducidos con un clon de DU145 que sobreexpresaba MIC-1 humana madura tenían de lejos los más altos niveles de MIC-1 en suero y estos ratones perdieron peso a una velocidad drástica. La observación del comportamiento de los animales indicó que un motivo principal de esto era una reducción drástica en la ingestión de alimentos por estos ratones. El hallazgo de que la pérdida de peso podría revertirse mediante la administración de IgG anti-MIC-1 de oveja (pero no IgG control) demuestra que la pérdida de peso se debía a MIC-1. Esto se corroboró mediante la evaluación de la pérdida de peso con las líneas de ratones transgénicos min 28 y min 75. En estos ratones, que tienen niveles de MIC-1 en suero notablemente elevados aún cuando la expresión de MIC-1 es específica de macrófagos, se observó un diferencial de peso significativo en comparación con ratones de tipo natural congénicos. Este efecto de pérdida de peso se produjo tras el nacimiento, ya que tanto las líneas de ratones transgénicos como sus compañeros de



camada de tipo natural congénicos tenían pesos al nacer idénticos (es decir, medidos 24 horas tras el nacimiento).

**EJEMPLO 3 La pérdida de peso asociada con tumor que secreta MIC-1 se revierte mediante la administración de un anticuerpo monoclonal anti-MIC-1**

5 Resultados y discusión

Se estableció un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos (tal como se describió anteriormente) en cuyos costados se les inyectó cualquiera de las células DU145 modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar MIC-1 madura. Los ratones a los que se les inyectó células DU145 que sobreexpresaban MIC-1 comenzaron a perder peso rápidamente. La administración de una única inyección de un anticuerpo monoclonal frente a MIC-1 (AcM26), en cantidades de entre 0,1 y 1 mg, en el día 11, provocó un aumento en el peso, cuya magnitud y cuya duración aumentaron con cantidades crecientes de AcM26 (figuras 8A-C). A la dosis más alta de aproximadamente 1 mg, el peso había aumentado hasta el nivel anterior al xenoinjerto y tardó aproximadamente 17 días en disminuir de nuevo hasta el mismo peso que cuando se administró el anticuerpo por primera vez. No hubo ningún efecto de AcM26 sobre el crecimiento tumoral (figuras 8D-F) y ratones no tratados (figura 8G) y ratones tratados con solución salina tamponada con fosfato (figura 8H) (PBS) sola, perdieron peso de manera rápida y continua a lo largo de la duración del experimento.

20 **EJEMPLO 4 Efecto sobre la ingesta de alimento en un modelo de xenoinjerto de ratón**

Materiales y métodos

Se estableció un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos (tal como se describió anteriormente) en cuyos costados se les inyectó o bien células DU145 modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar MIC-1 madura, o bien llevaban un plásmido control. En el día 8 tras la inyección de las células DU145 que sobreexpresaban MIC-1, cuando el volumen tumoral promedio era de 56 mm<sup>3</sup> y la pérdida de peso promedio del 7%, se midió la ingesta de alimento durante 3 periodos de tiempo de 24 horas consecutivos. Se dejaron los ratones en grupos de 5 por jaula. Se colocó alimento en el interior de la tolva y se pesó la camada en el punto de tiempo 0. Tras 24 horas, se estimó el alimento consumido restando el rechazo y el derrame del alimento puesto en el interior de la tolva. Se midió la ingesta de alimento para los ratones de control de la misma manera, pero en el día 21 tras la inyección tumoral cuando el volumen tumoral había alcanzado un promedio de 70 mm<sup>3</sup>.

35 Resultados

Los ratones en los que se inyectó DU145 que sobreexpresaba MIC-1 comieron significativamente menos alimento (aproximadamente el 30%) en el día 1, 2 y 3 ( $p = 0,01, 0,0001$  y  $0,02$ ) que los ratones control (figura 9). Una medición directa de la masa de grasa en estos ratones indicó que la sobreexpresión de MIC-1 estaba asociada con una reducción notable en la masa de grasa en las zonas epididimal, inguinal y retroperitoneal sin reducción en la masa en dos músculos representativos (figura 10).

**EJEMPLO 5 Medición de marcadores metabólicos en suero en un modelo de xenoinjerto de ratón**

45 Materiales y métodos

Se estableció un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos (tal como se describió anteriormente) en cuyos costados se les inyectó o bien células DU145 modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar MIC-1 o bien células DU145 control. Se sacrificaron los ratones en los días 11-16 tras la inyección de las células tumorales DU145 que sobreexpresaban MIC-1 y en los días 21-30 tras la inyección del tumor control, cuando los volúmenes tumorales habían alcanzado 100-200 mm<sup>3</sup>, y, o los ratones habían perdido aproximadamente el 18% del peso corporal. A partir de experimentos previos se sabe que los niveles en suero de MIC-1 humana derivada de tumores están entre 15 y 58 ng/ml. Se recogió suero mediante punción cardiaca y se sometió a ensayo para determinar los marcadores metabólicos usando inmunoensayos comerciales. Se emprendió una comparación estadística usando la prueba de la  $t$  de Student.

55 Resultados y discusión

La medición de una gama de marcadores metabólicos en ratones demostró una reducción estadísticamente significativa en ratones con tumores que sobreexpresaban MIC-1 de triglicéridos y ácidos grasos libres así como glucagón e IGF-1 (datos no mostrados). También hubo una reducción en los niveles de leptina que es compatible con una reducción en la masa de grasa, una indicación de que es no es muy probable que la ingesta de alimento reducida por MIC-1 esté mediada por estimulación de MIC-1 de leptina. La diferencia para la glucosa estaba justo por debajo de la significación estadística a  $p = 0,053$ . Estos hallazgos en su mayor parte están en armonía con la inanición y la pérdida de masa de grasa.

65 **EJEMPLO 6 Medición del peso de almohadillas grasas y músculos en un modelo de xenoinjerto de ratón**

Materiales y métodos

5 Se estableció un modelo de xenoinjerto en ratones desnudos machos (tal como se describió anteriormente). En los costados de 20 ratones se inyectaron células DU145 modificadas por ingeniería genética para sobreexpresar MIC-1 y en 20 ratones se inyectaron células DU145 transducidas con un plásmido control. Se sacrificaron los ratones en los días 11-16 tras la inyección de las células tumorales DU145 que sobreexpresaban MIC-1 y en los días 21-30 tras la inyección del tumor control, cuando los volúmenes tumorales habían alcanzado 100-200 mm<sup>3</sup>, y, o los ratones habían perdido aproximadamente el 18% del peso corporal. Se disecó cuidadosamente el tejido adiposo pardo  
10 interescapular, la grasa inguinal, epididimal y retroperitoneal y también los músculos tibial y gastrocnemio, se retiraron y se pesaron y se corrigió el peso para el peso corporal.

Resultados y discusión

15 No hubo reducción en la grasa parda pero hubo una disminución notable en el peso de grasa corporal en grasa inguinal, grasa epididimal y grasa retroperitoneal (figura 10). No hubo ninguna diferencia significativa en el peso de músculos entre los dos grupos de ratones (figura 10). Sin embargo, el uso de un análisis de la masa corporal magra total más sensible usando el generador de imágenes PIXImus (GE Lunar) indicó que hubo una reducción global en la masa corporal magra. También confirmó una reducción mucho mayor en la masa de grasa total y la masa de  
20 grasa abdominal.

**EJEMPLO 7 Ratones transgénicos para MIC-1**

Resultados y discusión

25 Se modificaron por ingeniería genética ratones transgénicos para que sobreexpresaran MIC-1 de células monocitoides bajo el control del promotor c-fms. Estos ratones tienen niveles de MIC-1 elevados de manera sistémica, tienen buen aspecto y se reproducen normalmente. No pueden distinguirse de los ratones de tipo natural pero muestran un retardo de crecimiento significativo que comienza a aproximadamente las 3 semanas y hasta la  
30 adultez (figuras 5-7). Se observó este efecto en dos líneas transgénicas independientes denominadas min 75 y min 28.

Como los ratones con xenoinjerto de tumores, los ratones transgénicos que sobreexpresan MIC-1 comieron significativamente menos que sus homólogos de tipo natural, pero esta diferencia desaparece si la ingesta de alimento se corrige para el peso del ratón (figura 11). Se cree que el aumento de los niveles de MIC-1 desde el nacimiento da como resultado una ingesta de alimento disminuida que da como resultado un tamaño disminuido y el alcance de un equilibrio en el que su tamaño es apropiado para su ingesta de alimento reducido. La medición de los mismos marcadores metabólicos en los animales transgénicos que en los ratones con xenoinjerto de tumores sólo  
35 mostró una diferencia significativa en los niveles de IGF-1, que se reducen en los ratones transgénicos para MIC-1.

40 La medición de la masa de grasa en las zonas inguinal, epididimal/uterina y retroperitoneal muestra una masa de grasa disminuida en los ratones transgénicos de sobreexpresión que es más relevante en ratones hembras en comparación con los machos (figura 12). Además de un bazo más pequeño y un timo más grande, las tres almohadillas grasas analizadas tenían un tamaño reducido. En términos absolutos, no hubo ninguna diferencia entre  
45 los pesos del timo de WT frente a TG.

**EJEMPLO 8 Control de los niveles de MIC-1 en suero mediante fetuina**

50 La presencia de MIC-1 en suero, a una concentración media de 450 pg/ml en todos los individuos, sugiere que como algunas otras citocinas de la superfamilia de TGF-β, MIC-1 puede unirse a uno o más moduladores circulantes. Se expresa ampliamente la glicoproteína fetuina en células y tejidos y está presente en suero sanguíneo. Se realizó la siguiente investigación para determinar si MIC-1 puede interactuar con esta glicoproteína.

Materiales y métodos

55 Se incubó MIC-1 madura, purificada recombinante (en BSA al 0,1%) con perlas de agarosa recubiertas con fetuina. Entonces se lavaron las perlas y se analizó el material unido mediante SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpo anti-MIC-1: carril 1, MIC-1 recombinante purificada; carril 2, MIC-1 unida a perlas de fetuina; carril 3, sólo perlas de fetuina; carril 4, MIC-1 incubada sólo con perlas de agarosa.  
60

Resultados

Los resultados, mostrados en la figura 13, indican claramente que MIC-1 madura interactúa con y se une a fetuina.

65 Discusión

Puesto que MIC-1 se une a fetuina, la fetuina puede ofrecer una alternativa a la administración de anticuerpos anti-MIC-1 para modular funciones mediadas por MIC-1 en suero. Por ejemplo, para modular los efectos inhibidores de MIC-1 en suero sobre el apetito, podría administrarse fetuina a un sujeto (por ejemplo un sujeto que padece cáncer avanzado) mediante una vía adecuada (por ejemplo administración intravenosa) para reducir el nivel de MIC-1 "libre".

### EJEMPLO 9 Análisis de la expresión de MIC-1 en cerebro de ratón normal

#### Resultados y discusión

La ingesta de alimento y el apetito se controlan mediante una serie compleja de mecanismos, muchos de los cuales se localizan dentro del sistema nervioso central. El área dentro del sistema nervioso que controla muchas funciones corporales basales tales como el apetito y la temperatura corporal se localiza dentro del área del hipotálamo. En el caso del apetito, se localizan muchos de los factores complejos que regulan este proceso en el núcleo arciforme del hipotálamo y se localizan muchos de los mediadores y receptores para mediadores tales como neuropéptido Y en esta área. La barrera hematoencefálica en esta área también es porosa y es una de las áreas muy limitadas del cerebro en las que existe una oportunidad de que moléculas sistémicas crucen la barrera hematoencefálica y actúen directamente en el cerebro. Se considera que MIC-1 puede ejercer un efecto directo sobre el núcleo arciforme y el hipotálamo mediante este mecanismo. Sin embargo, también se expresa MIC-1 dentro de esta región del cerebro de ratón normal (figura 14). Esto no representa difusión de MIC-1 circulante tal como se indica mediante estudios de hibridación *in situ* que demuestran una colocación de ARNm y proteína de MIC-1 en el área del núcleo arciforme, área periventricular e hipotálamo paraventricular. La localización de MIC-1 en esas áreas de un cerebro normal, asociada fuertemente con funciones tales como el control del apetito, proporciona un argumento fuerte para el papel de MIC-1, tanto a partir de la circulación periférica, como producido de manera endógena dentro del cerebro, en el control de esta importante función.

A lo largo de toda esta memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecido, o grupo de elementos, número enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, número enteros o etapas.

Cualquier discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente para el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe considerarse como una admisión de que cualquiera o todas estas materias forman parte de la base de la técnica anterior o eran de conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención tal como existía en Australia o en otra parte antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

#### Bibliografía

1. Bootcov MR, Bauskin A, Valenzuela SM, Moore AG, Bansal M, He C, Zhang HP, Donnellan M, Mahler S, Pryor K, Walsh B, Nicholson R, Fairlie DF, Por SB, Robbins JM, Breit SN. MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF- $\beta$  superfamily cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11514-11519.
2. Breit SN, Bootcov MR. "Novel TGF-beta like cytokine", solicitud de patente internacional n.º PCT/AU96/00386 (documento WO 97/00958).
3. Fairlie WD, Zhang H-P, Brown PK, Russell PK, Bauskin AR, Breit SN. Expression of a TGF- $\beta$  superfamily protein, Macrophage Inhibitory Cytokine-1, in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 2000; 254: 67-76.
4. Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier MLC, Russell PK, Salamonsen LA, Wallace EM, Breit SN. TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4781-88.
5. Fairlie WD, Russell PK, Moore AG, Zhang H-P, Brown PK, Breit SN. Epitope mapping of the Transforming Growth Factor- $\beta$  superfamily protein, MIC-1: Identification of at least five distinct epitope specificities. *Biochemistry* 2001; 40: 65-73
6. Breit SN *et al.* "Diagnostic assay and method of treatment involving macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1)", solicitud de patente internacional n.º PCT/AU01/00456 (documento WO 01/81928).
7. Fairlie WD, Moore AG, Bauskin AR, Russell PK, Zhang H-P, Breit SN. MIC-1 is a novel TGF- $\beta$  superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukocyte Biol* 1999; 65: 2-5.
8. Koniaris LG. Induction of MIC-1/growth differentiation factor-15 following bile duct injury. *J Gastrointest Surg* 2003 nov. 7 (7): 901-5.

9. Welsh JB, Hampton GM. Analysis of Gene Expression Identifies Candidate Markers and Pharmacological Targets in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 5974-5978.
- 5 10. Buckhaults P, Vogelstein B, Kinzler KW. Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 6996-7001.
11. Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Brown DA, Liu T, Bauskin AR, Ward RL, Hawkins NJ, Quinn DI, Russell PJ, Sutherland RL, Breit SN, Moskaluk CA, Frierson, HA Jr. y Hampton GM. Large-Scale Delineation of Secreted Protein Biomarkers Overexpressed in Cancer Tissue and Serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3410-3415.
- 10 12. Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Givol D. 2000 Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family. *FEBS Lett* 470: 77-82.
- 15 13. Pei-Xiang Li, *et al.* Placental Transforming Growth Factor-b Is a Downstream Mediator of the Growth Arrest and Apoptotic Response of Tumour Cells to DNA Damage and p53 Overexpression. *J Biol Chem* 2000; 275: 20127-20135.
14. Yang H, Filipovic Z, Brown D, Breit SN, Vassilev LT. Macrophage inhibitory cytokine-1: a novel biomarker for p53 pathway activation. *Mol Cancer Ther* 2003; oct. 2 (10): 1023-1029.
- 20 15. Albertoni M, Shaw PH, Nozaki M, Godard S, Tenan M, Hamou M-F, Fairlie DW, Breit SN, Paralkar VM, de Tribolet N, Van Meir EG, Hegi ME. Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene* 2002; 27: 4212-4219.
- 25 16. Brown DA, Bauskin AR, Fairlie WD, Smith MD, Liu T, Xu N y Breit SN. An antibody based approach to high volume genotyping for MIC-1 polymorphism. *Biotechniques* 2002; 33 (1): 118-20, 122, 124 *passim*.
17. Liu T, Bauskin AR, Zaunders J, Brown DA, Pankurst S, Russell PJ, Breit SN. MIC-1 reduces cell adhesion and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 5034-5040.
- 30 18. Koopmann J, Buckhaults P, Brown DA, Zahurak ML, Sato N, Sokoll L, Chan DW, Yeo CJ, Hruban RH, Breit SN, Kinzler KW, Vogelstein B, Goggins M. Serum MIC-1 as a Marker of Pancreatic and other Periampullary Cancers. *Clin Cancer Res* (en prensa).
- 35 19. Baek SJ *et al.* Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 901-908.
20. Brown DA, Ward RL, Buckhaults P, Liu T, Romans KE, Hawkins NJ, Bauskin AR, Kinzler KW, Vogelstein B, Breit SN. MIC-1 serum level and genotype: Associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2003; 9: 2642-2650.
- 40 21. Lee DH, Yang Y, Lee SJ, Kim KY, Koo TH, Shin SM, Song KS, Lee YH *et al.* Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res* 2003; ago. 1; 63 (15): 4648-4655.
- 45 22. Pluckthun A, Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Bio/Technology* 1991; 9: 545-551.
- 50 23. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; feb. 6; 303 (5659): 844-848.
24. Bauskin AR, Brown DA, Junankar S, Rasiyah KK, Eggleton S, Hunter M, Liu T, Smith D, Kuffner T, Pankhurst, GJ, Johnen, H, Russell PJ, Barret W, Stricker PD, Grygiel JJ, Kench JG, Henshall SM, Sutherland RL, Breit SN. The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome. *Cancer Res* 2005; mar. 15; 65 (6): 2330-2336.
- 55

La descripción presenta ahora párrafos numerados ("parra." para abreviar).

- 60 1. Un método de modulación del apetito y/o peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de modulación de MIC-1, en el que dicho agente aumenta o disminuye la cantidad de MIC-1 presente en dicho sujeto, o inhibe o potencia la actividad biológica de MIC-1 presente en dicha muestra.
- 65 2. Un método para aumentar el apetito y/o peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a

dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de inhibición de MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador y/o excipiente farmacológicamente aceptable.

- 5 3. Un método según el parra. 2, en el que dicho agente de inhibición de MIC-1 es un agente que disminuye la cantidad de MIC-1 endógena en dicho sujeto.
- 10 4. Un método según el parra. 3, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de los mismos, moléculas catalíticas e inhibidoras dirigidas contra el gen *MIC-1* e inhibidores de la transcripción o traducción de *MIC-1*.
- 15 5. Un método según el parra. 2, en el que dicho agente de inhibición de MIC-1 es un agente que inhibe la actividad de MIC-1 endógena en dicho sujeto.
- 20 6. Un método según el parra. 5, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de los mismos, dominios de receptores extracitoplasmáticos solubles de receptores de MIC-1, moléculas solubles o proteínas asociadas a la matriz que se unen a MIC-1 e inhibidores peptídicos, peptidomiméticos o de molécula orgánica pequeña de MIC-1 que se unen a su receptor.
- 25 7. Un método según cualquier parra. anterior, en el que dicho agente de inhibición de MIC-1 es un anticuerpo anti-MIC-1 monoclonal humanizado.
- 30 8. Un método según el parra. 2, en el que el sujeto está padeciendo disminución del apetito y/o pérdida de peso asociada con cáncer avanzado.
- 35 9. Un método para disminuir el apetito y/o peso corporal en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un agente de potenciación de MIC-1 opcionalmente en mezcla con un portador y/o excipiente farmacológicamente aceptable.
- 40 10. Un método según el parra. 9, en el que dicho agente de potenciación de MIC-1 es un agente que potencia la cantidad de MIC-1 endógena en dicho sujeto.
- 45 11. Un método según el parra. 10, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en MIC-1, agentes que potencian la transcripción o traducción del gen *MIC-1* y agentes que potencian la expresión o actividad de p53.
- 50 12. Un método según el parra. 9, en el que el sujeto está padeciendo obesidad.
- 55 13. Un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, comprendiendo dicho método administrar dicho agente a dicho sujeto o un modelo animal adecuado del mismo y detectar cualquier aumento o disminución en la cantidad de MIC-1 en dicho sujeto o modelo animal.
- 60 14. Un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, comprendiendo dicho método formar una mezcla entre MIC-1 o un fragmento funcional o mimético del mismo, una pareja de unión a MIC-1 y dicho agente, y detectar cualquier aumento o disminución en la unión entre la MIC-1 o un fragmento funcional o mimético de la misma y la pareja de unión a MIC-1.
- 65 15. Un método para evaluar el efecto de un agente sobre el apetito y/o peso corporal de un sujeto, comprendiendo dicho método exponer una célula que expresa MIC-1 a dicho agente y detectar cualquier aumento o disminución en el nivel de dicha expresión de MIC-1.
16. Un método de evaluación del apetito en un sujeto, comprendiendo dicho método determinar la cantidad de MIC-1 presente en el suero en dicho sujeto.

**Lista de secuencias**

- 55 <110> St Vincent's Hospital Sidney Limited
- <120> Método para modular el apetito
- <130> 03 1382 1643
- 60 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 65 <210> 1

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia consenso para proconvertasa

10 <220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (2)..(3)

<223> X = cualquier aminoácido

20 <400> 1

Arg Xaa Xaa Arg

1

<210> 2

25 <211> 7

<212> PRT

<213> artificial

30 <220>

<223> secuencia que incluye un sitio de proconvertasa similar a furina

35 <400> 2

Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg

1

5

**lista de secuencias**

40 <110> St Vincent's Hospital Sydney Limited

<120> Método para modular el apetito

45 <130> REP08158EP

<140> documento EP05729508.1

50 <141> 13-04-2005

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

55 <210> 1

<211> 4

<212> PRT

60 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia consenso para proconvertasa

5 <220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(3)

10

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 1

Arg Xaa Xaa Arg  
1

15

<210> 2

<211> 7

20

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> secuencia que incluye un sitio de proconvertasa similar a furina

<400> 2

30

Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg  
1 5

**REIVINDICACIONES**

1. Agente de inhibición de MIC-1 que disminuye el nivel en suero de MIC-1 endógena en el que dicho agente de inhibición se selecciona de un anticuerpo anti-MIC-1 o un fragmento de unión a MIC-1 del mismo para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que padece pérdida de peso asociada con un cáncer que sobreexpresa MIC-1.  
5
2. Agente de inhibición de MIC-1 para el uso según la reivindicación 1, en el que dicho agente de inhibición de MIC-1 es un anticuerpo monoclonal anti-MIC-1.  
10
3. Agente de inhibición de MIC-1 para el uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que dicho agente de inhibición de MIC-1 es un anticuerpo monoclonal anti-MIC-1 humanizado.
4. Agente de inhibición de MIC-1 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicha pérdida de peso ésta asociada con cáncer avanzado.  
15



FIGURA 1

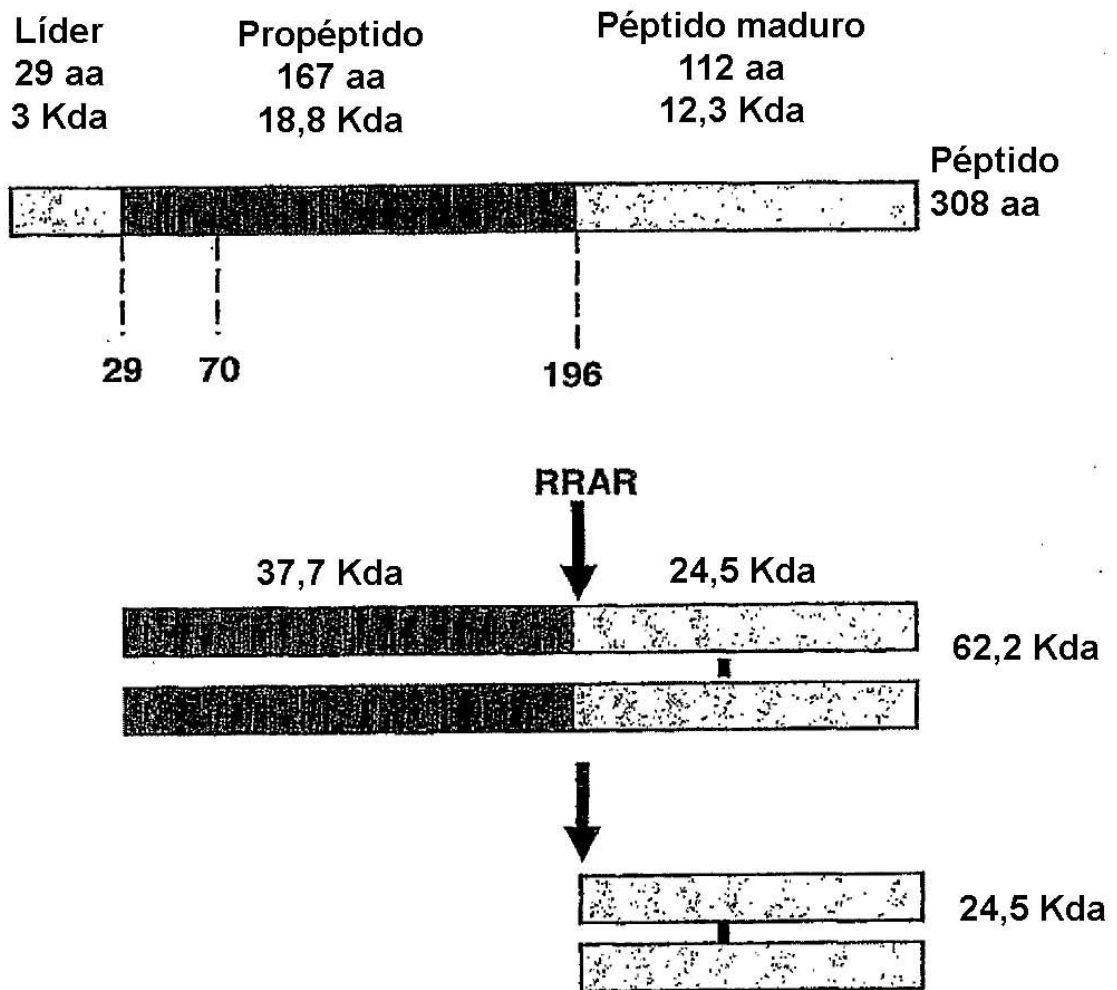


FIGURA 2

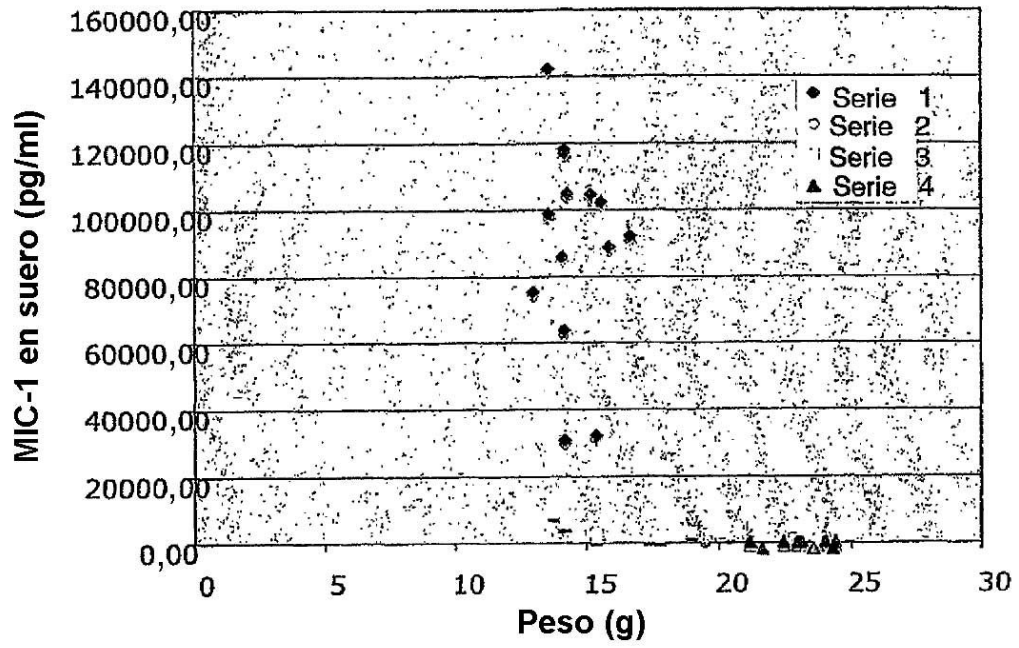


FIGURA 3

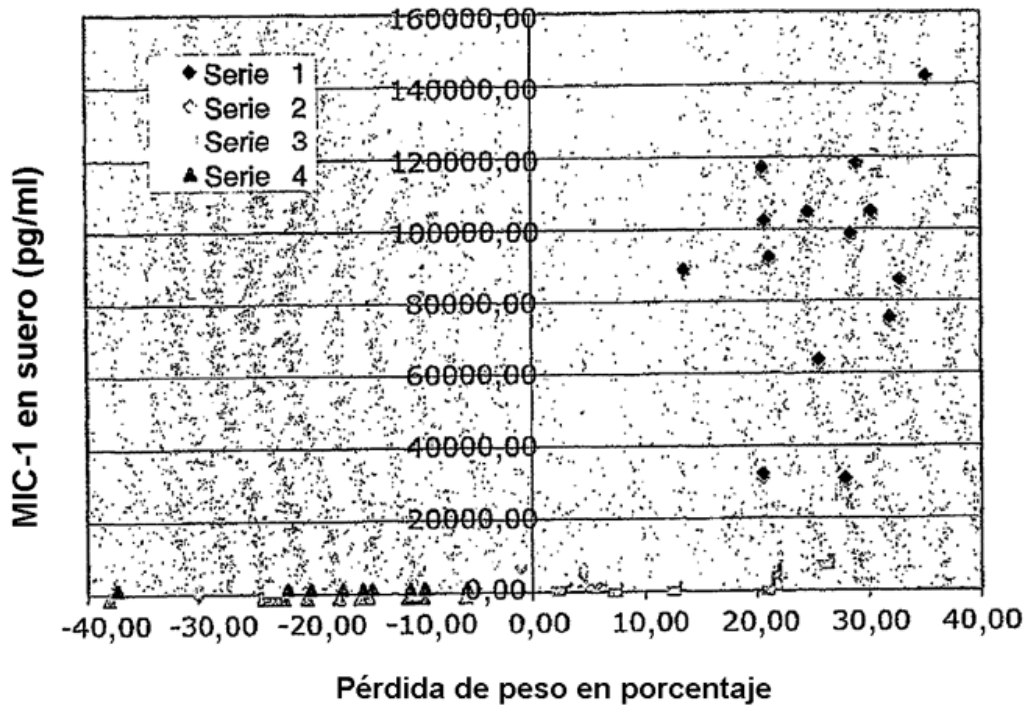


FIGURA 4A

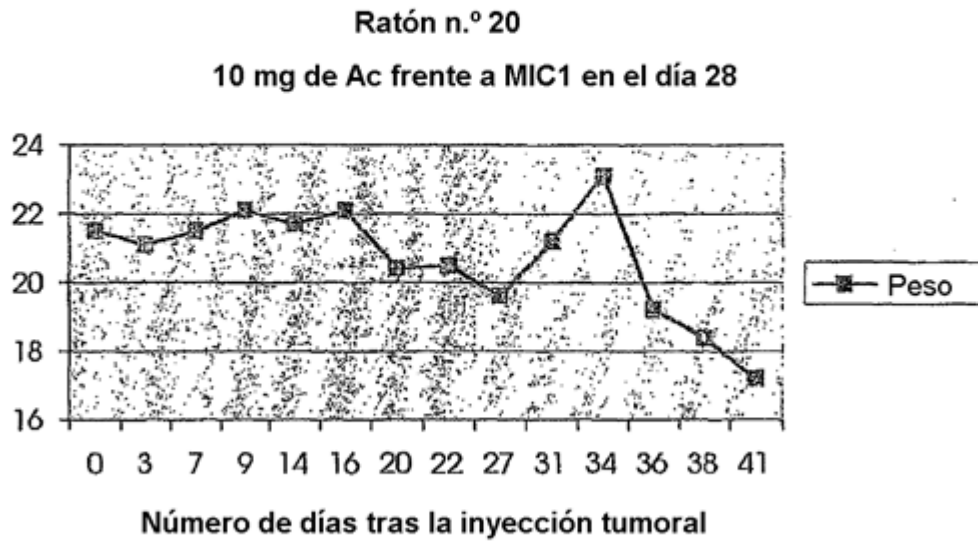


FIGURA 4B

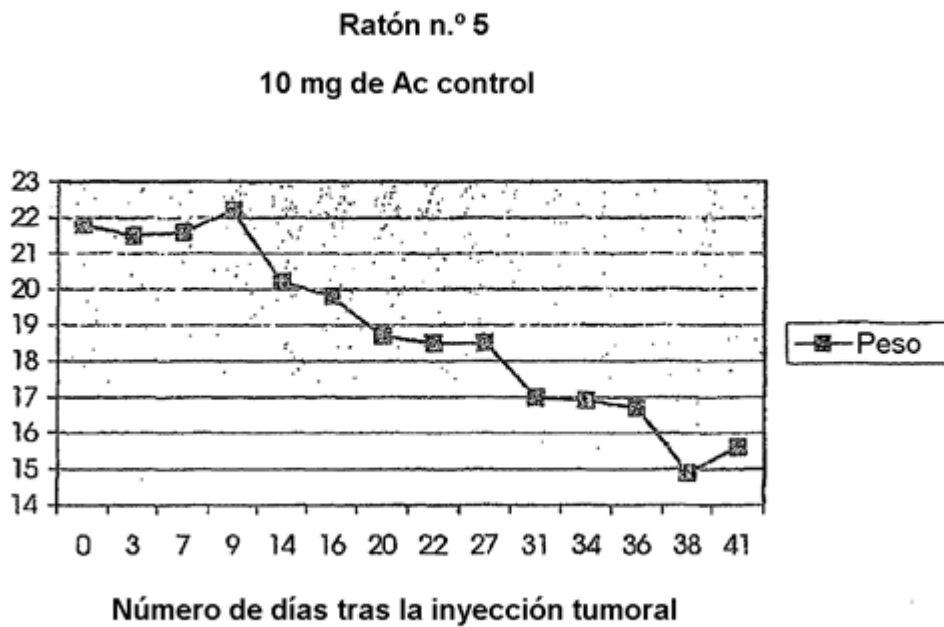


FIGURA 5

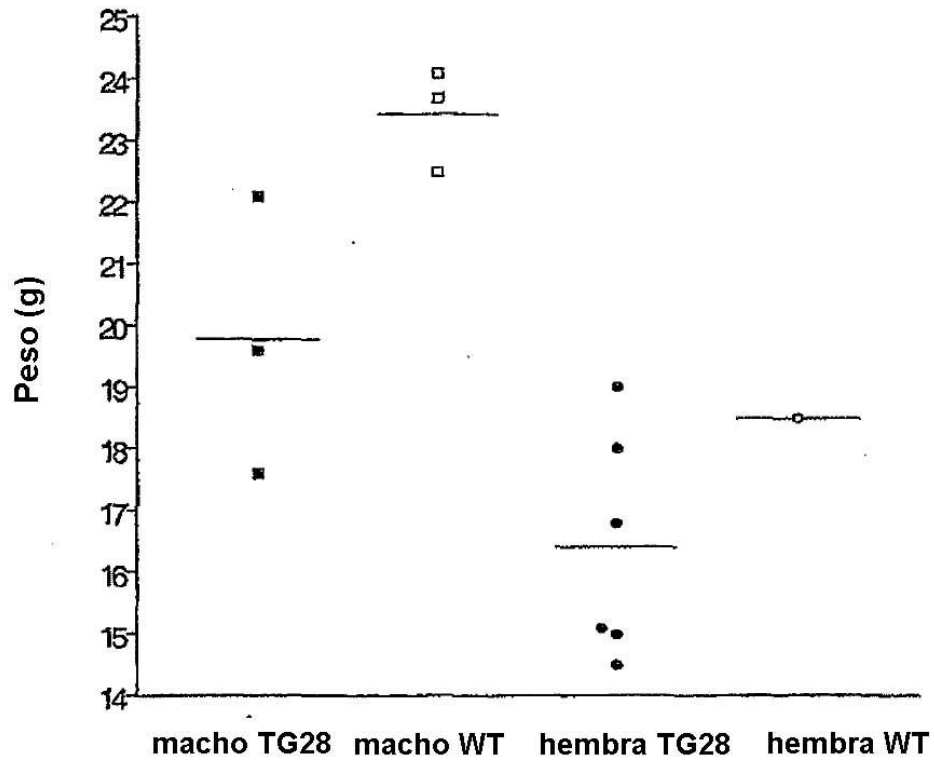


FIGURA 6

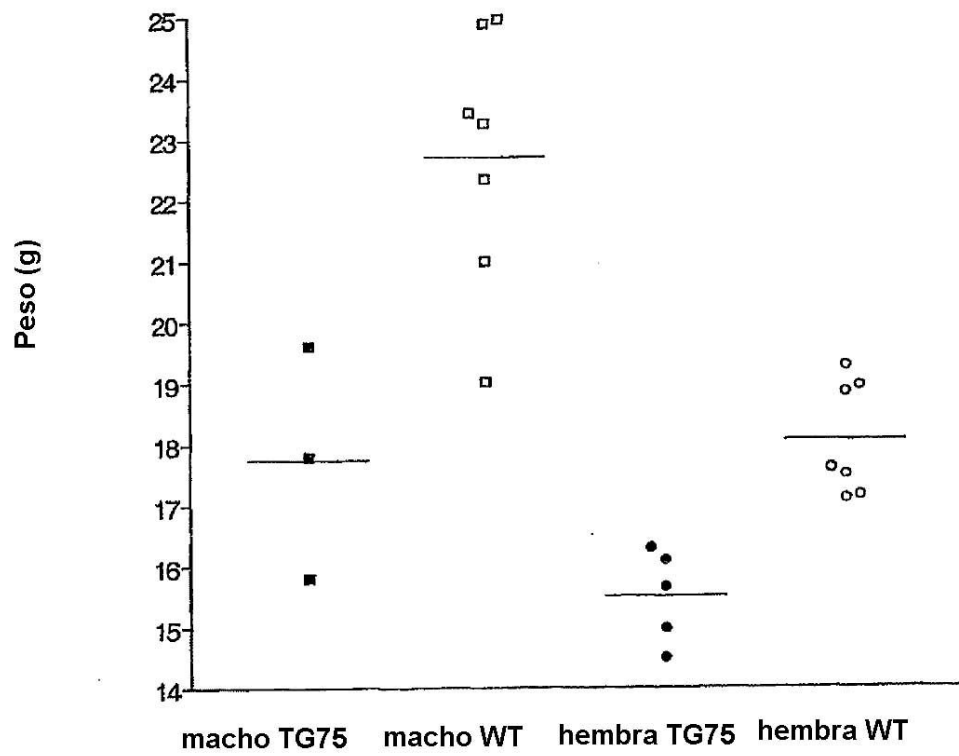


FIGURA 7

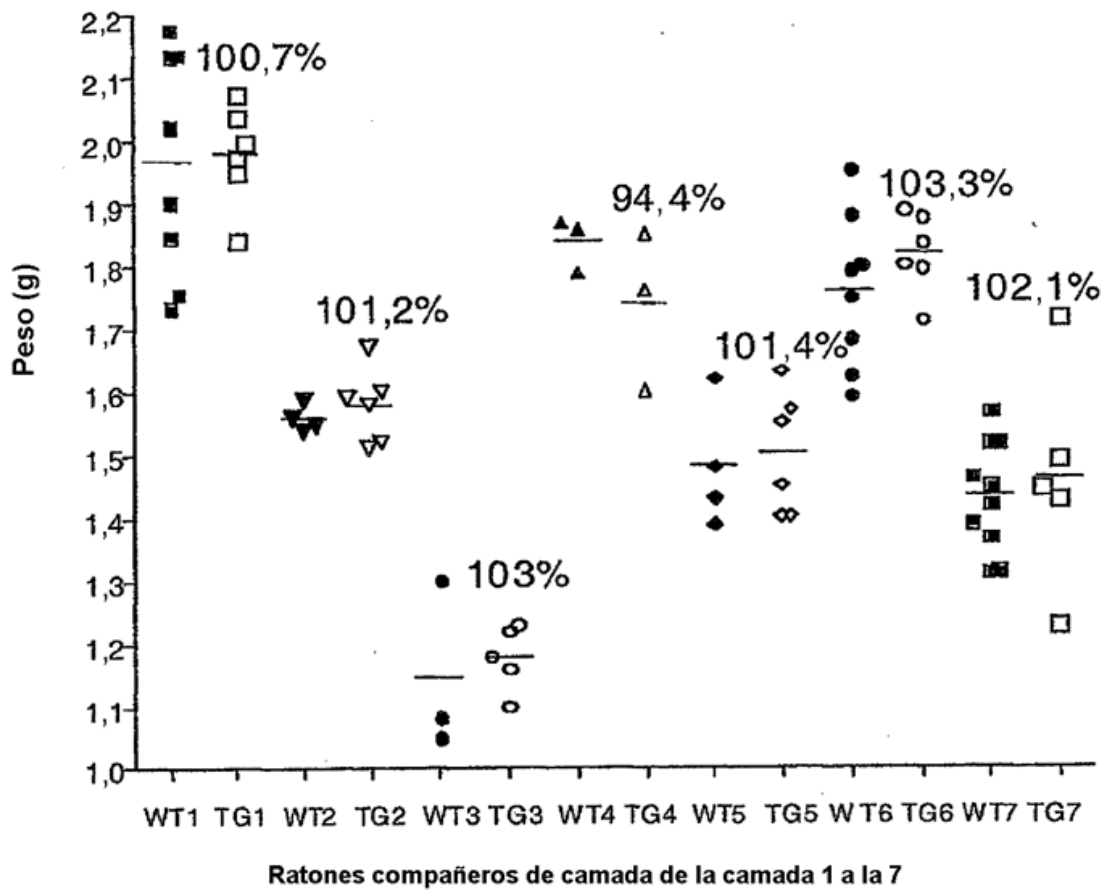


FIGURA 8A

Peso del ratón tras la inyección de 0,1 mg de AcM en el día 11

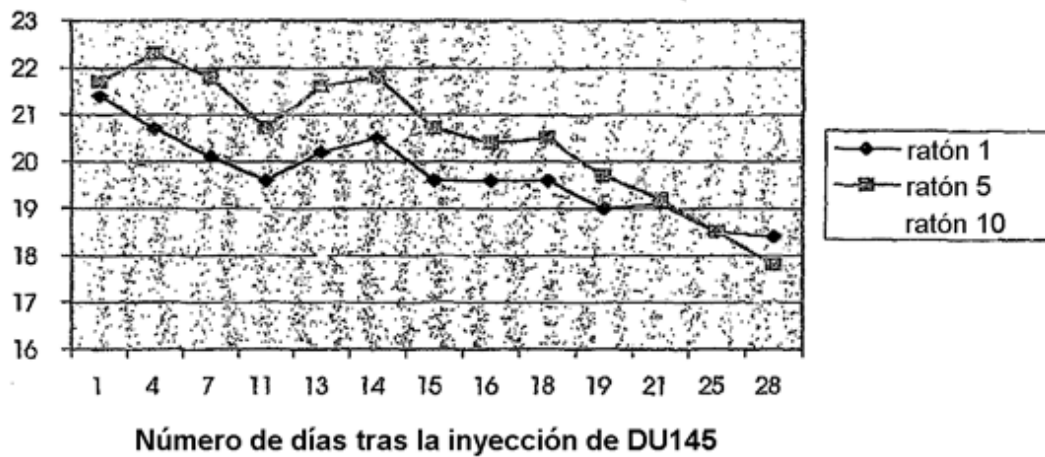


FIGURA 8B

Peso del ratón tras la inyección de 0,3 mg de AcM en el día 11

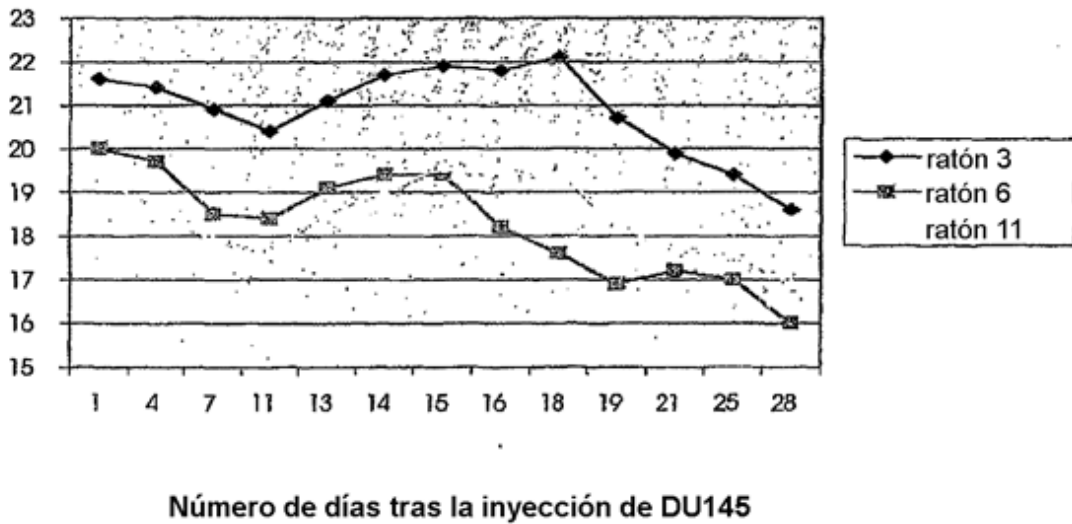




FIGURA 8C

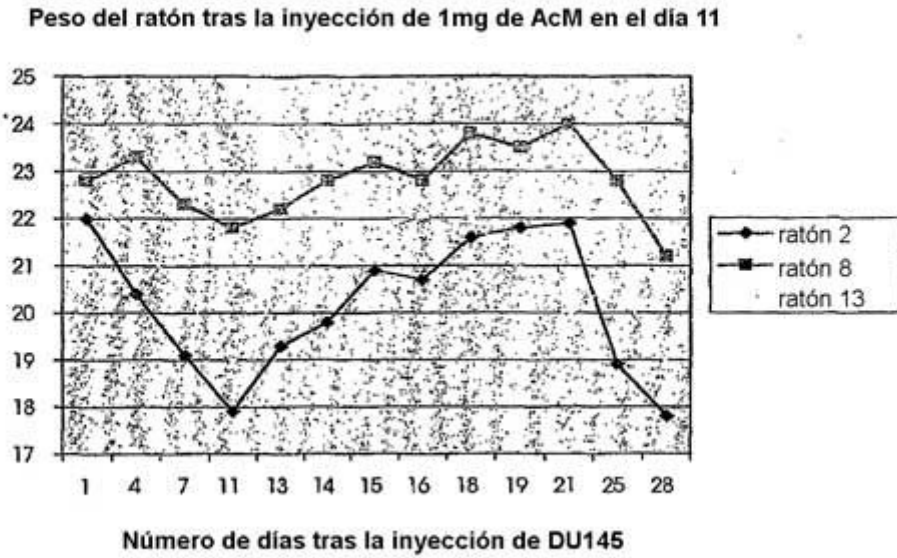


FIGURA 8D

Crecimiento tumoral en ratones en los que se inyectaron células DU145 (recibieron 0,1 mg de AcM en el día 11)

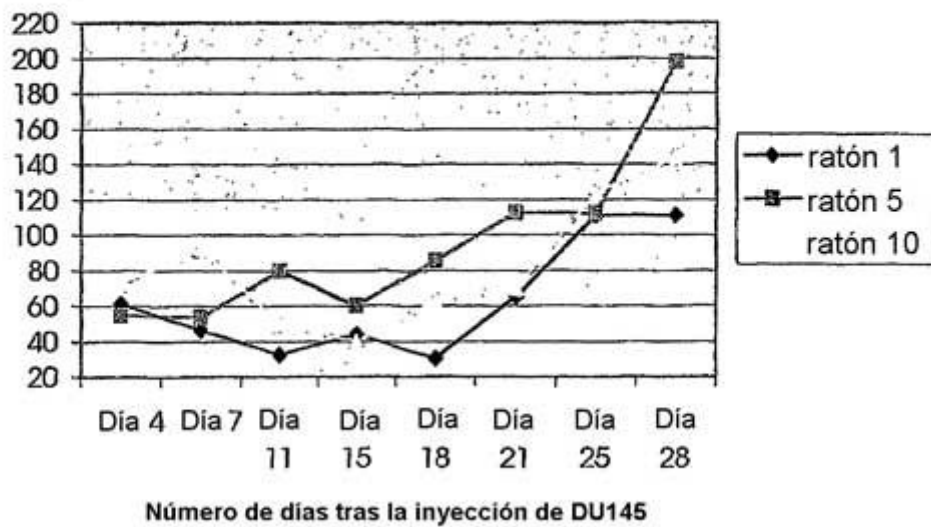


FIGURA 8E

Crecimiento tumoral en ratones en los que se inyectaron células DU145  
(recibieron 0,3 mg de AcM en el día 11)

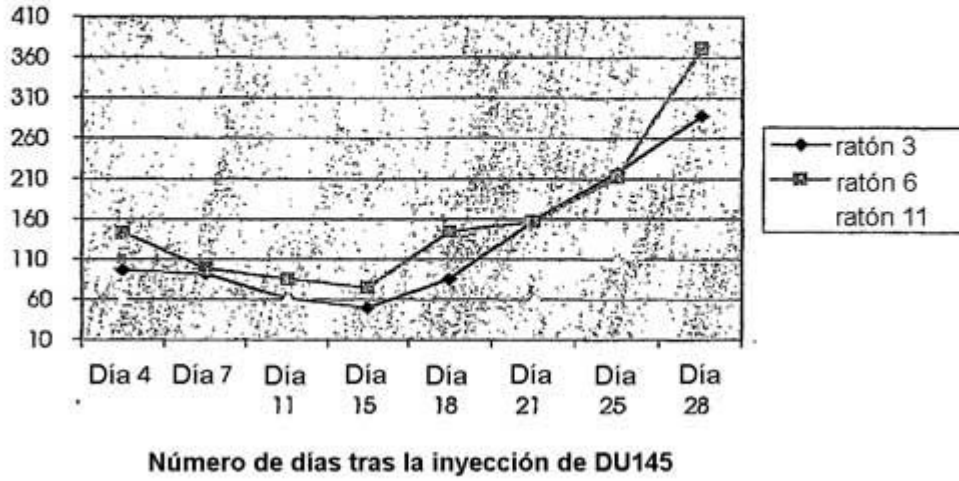


FIGURA 8F

Crecimiento tumoral en ratones en los que se inyectaron células DU145  
(recibieron 1 mg de AcM en el día 11)

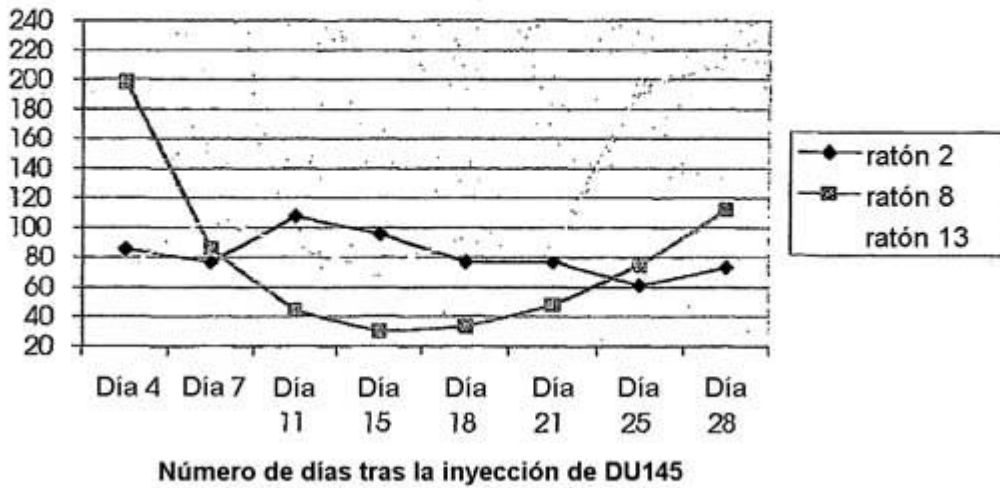


FIGURA 8G

Peso del ratón tras la inyección de PBS sólo en el día 11

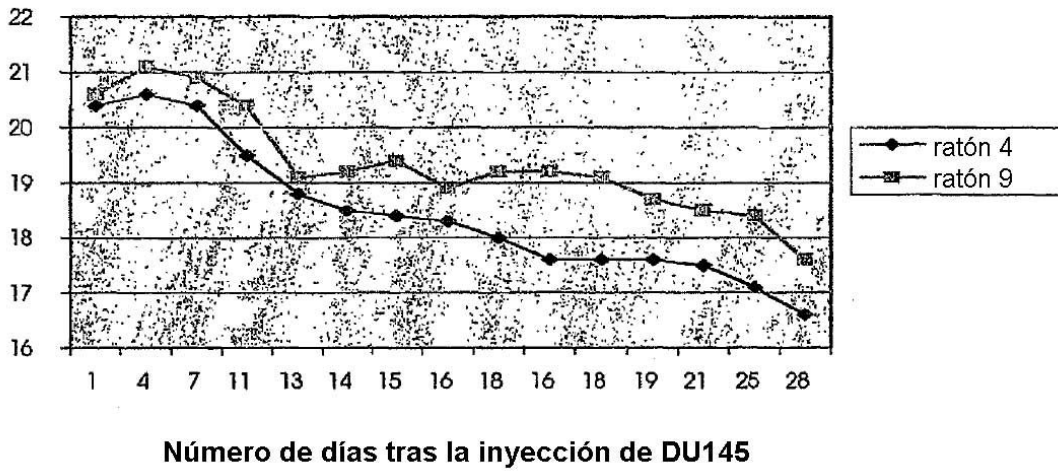
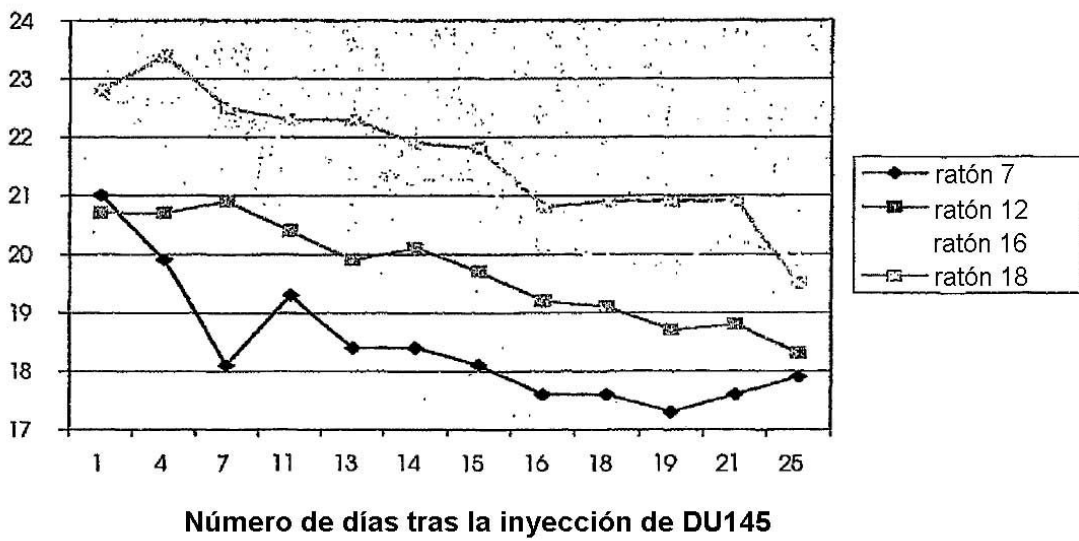


FIGURA 8H

Peso del ratón - sin tratamiento en el día 11



**FIGURA 9**

**Ingesta de alimento en ratones en los que se inyectaron células DU145 que sobreexpresan MIC-1 y células DU145 control**

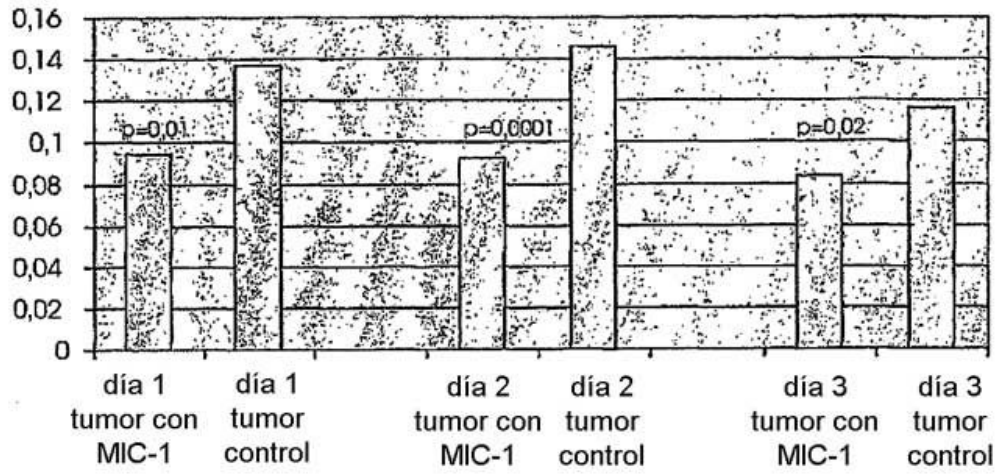


FIGURA 10

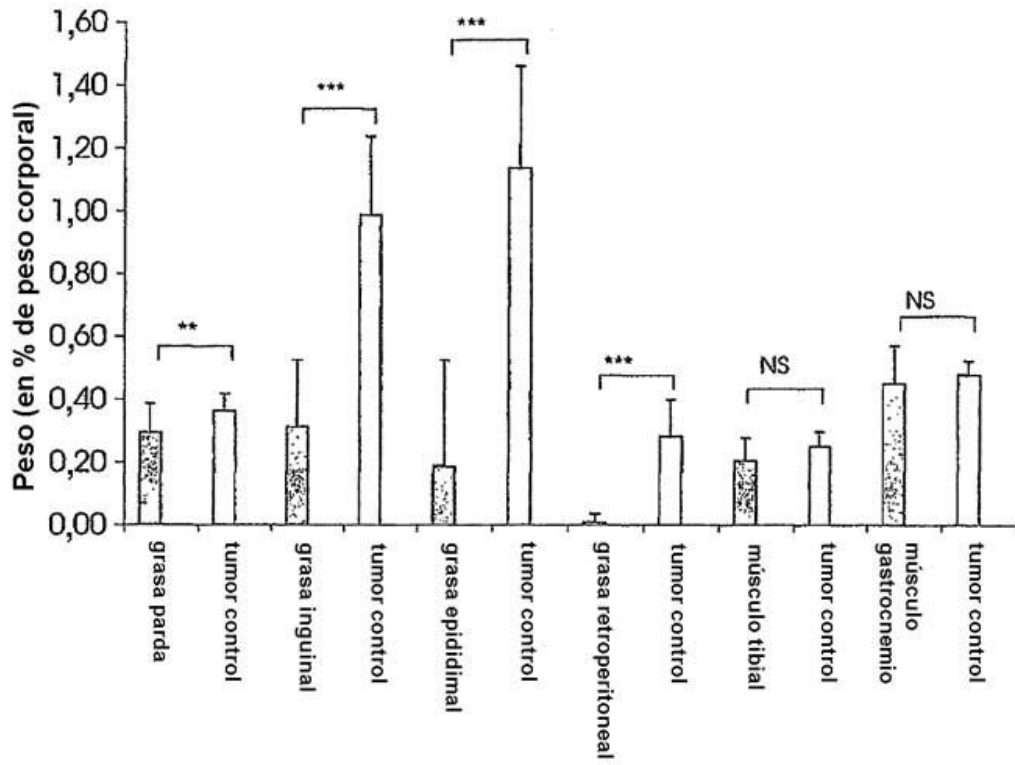


FIGURA 11

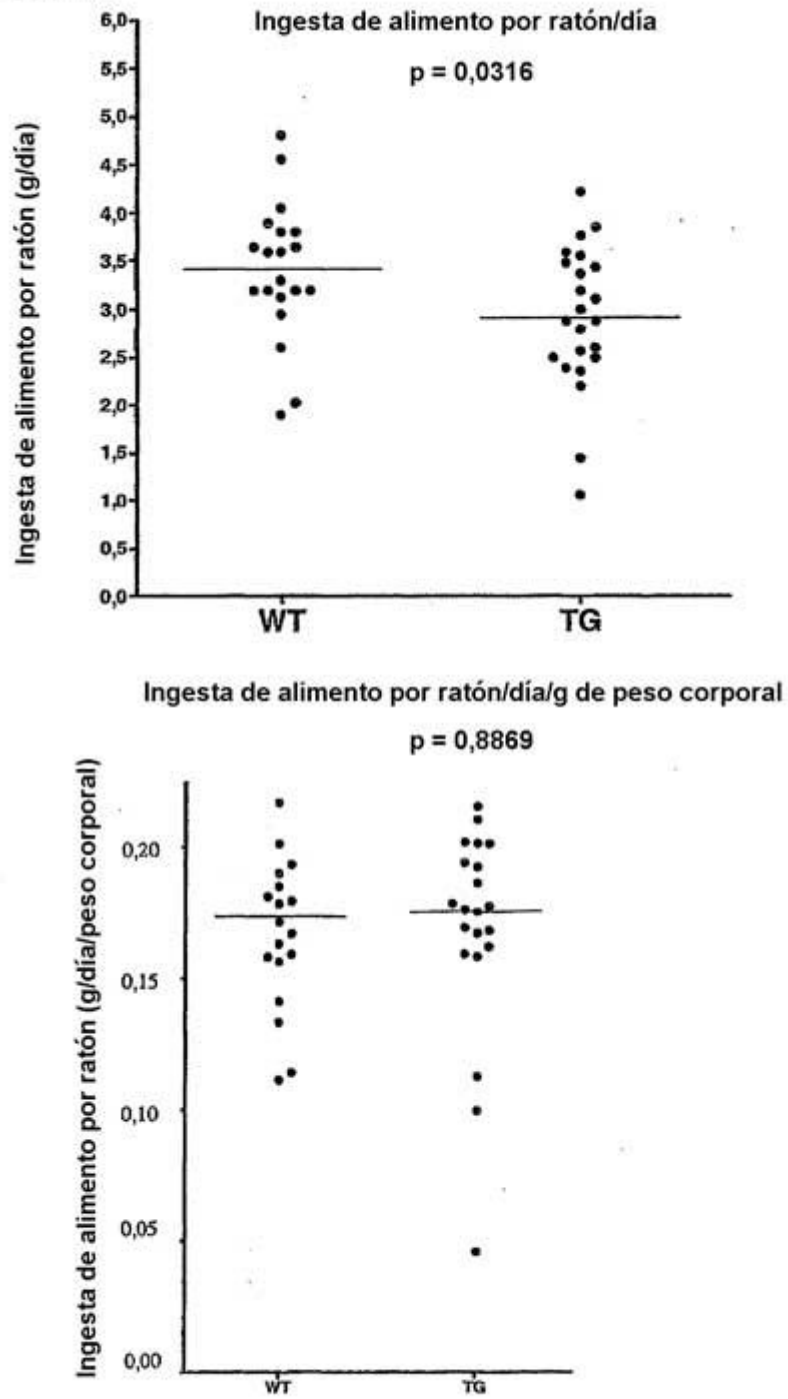


FIGURA 12

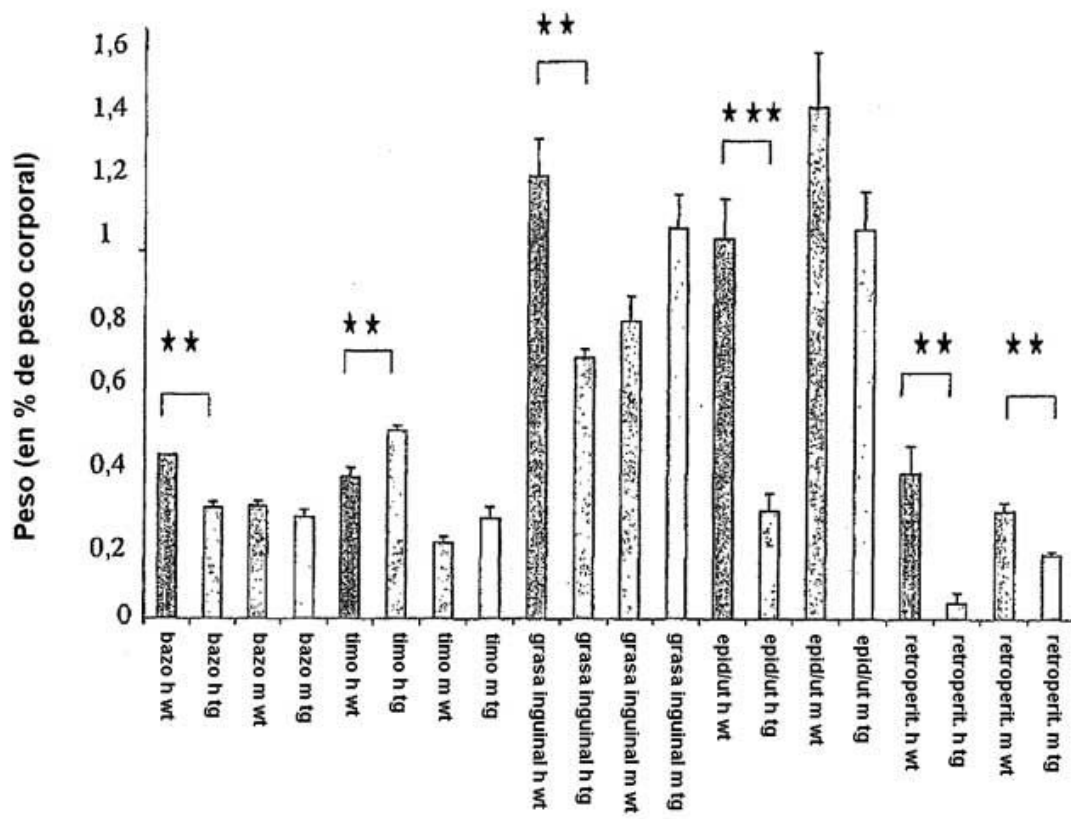


FIGURA 13

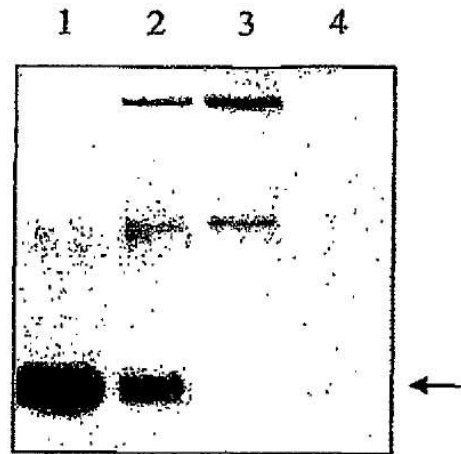




FIGURA 14A

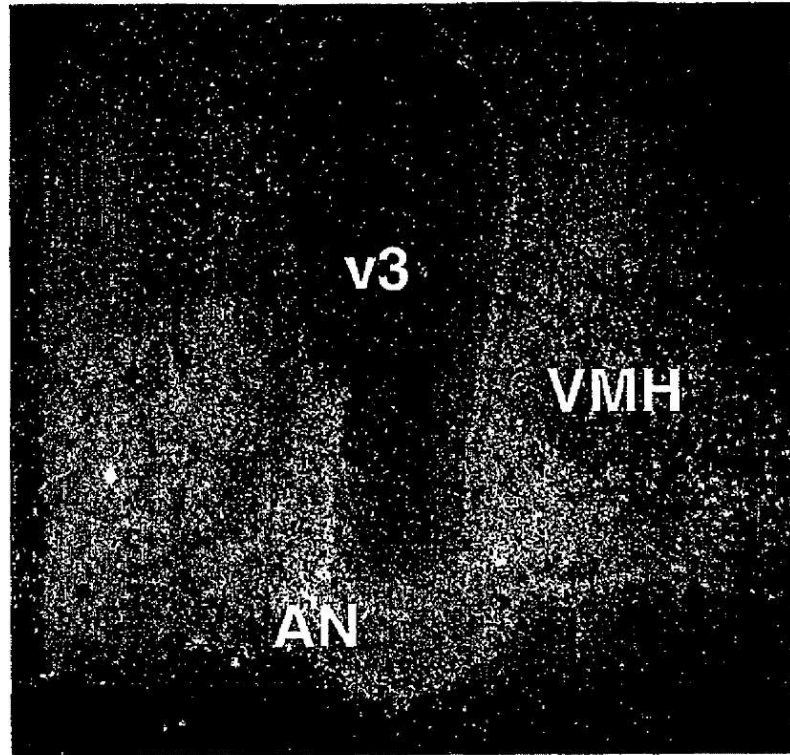


FIGURA 14B

