

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 644**

51 Int. Cl.:

C07K 14/64 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077629**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102179**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13814133 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2938630**

54 Título: **Polipéptidos de fusión y usos de los mismos**

30 Prioridad:

27.12.2012 EP 12199488

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

07.12.2017

73 Titular/es:

**BAYER PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
(100.0%)
Müllerstrasse 178
13353 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**WILMEN, ANDREAS;
LEINWEBER, KIRSTEN;
SCHEERER, NINA ALEXANDRA y
JÖRISSSEN, HANNAH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 645 644 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de fusión y usos de los mismos

La presente invención proporciona polipéptidos de fusión de Relaxina con semivida extendida. De este modo, las partes que extienden la semivida son el resto de Fc de la IgG2 humana o de la IgG4 humana. Además, la invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fusión precedentes, los vectores que contienen los mismos, las composiciones farmacéuticas y el uso médico de tales polipéptidos de fusión.

Antecedentes de la invención

La Relaxina 2 (Relaxina H2, RLN2) como un miembro de la superfamilia de insulina es un péptido de 2 cadenas que exhibe, a nivel genético, la estructura de prohormona de cadena B - C - A típica, dispuesta desde el extremo N- al C-terminal. Otros miembros de esta superfamilia, codificada por 7 genes en los seres humanos, son los genes de Relaxina RLN 1, RLN3, y los genes del péptido tipo insulina INSL3, INSL4, INSL5, y INSL6. La homología de secuencia global entre los elementos de esta familia es baja; no obstante, el análisis filogenético indica que estos genes ha evolucionado del gen ancestral RLN3 (Hsu, S. Y. (2003); Wilkinson, T. N. y col. (2005)). La proteína madura tiene un peso molecular de aproximadamente 6000 Da y es el producto de una escisión enzimática de la prohormona catalizada por la Prohormona-Convertasa 1 (PC1) y 2 (PC2) (Hudson P. y col. (1983)). Las cadenas A y B resultantes están unidas con dos puentes de cisteína intermolecular; la cadena A exhibe un enlace disulfuro intramolecular adicional. La Relaxina inicia efectos pleotrópicos a través de múltiples vías en una variedad de tipos celulares. Esta confiere su actividad por la unión al receptor acoplado a la proteína G de clase I (tipo rhodopsina) denominado LGR7 (receptor 7 acoplado a la proteína G rica en leucina 7) también llamado RXFP1 (receptor de péptido 1 de la familia de Relaxina), y con afinidad significativamente más baja a LRG8/RXFP2 (receptor de péptido 2 de la familia de Relaxina) (Kong RC y col. (2010)) Mol Cell Endocrinol. 320:1-15 En la molécula de Relaxina, un motivo de aminoácidos en la cadena B (Arg-X-X-X-Arg-X-X-Ile/Val-X) (Schwabe y Büllesbach (2007) Adv Exp Med Biol. 612:14-25 y Büllesbach and Schwabe J Biol Chem. 2000 Nov 10;275(45):35276-80) se conserva en todos los péptidos de la Relaxina y es crítico para la interacción de estos péptidos con el correspondiente receptor. La unión de la Relaxina a LGR7/RXFP1 produce la activación de adenilato ciclasa y un aumento de la molécula segunda mensajero AMPc. Por medio de este mecanismo, la Relaxina 2 por ejemplo media la liberación del péptido natriurético auricular en los corazones de ratas (Toth, M. y col. (1996)). También se ha mostrado un efecto inotrópico positivo de la Relaxina 2 sobre los miocitos atriales de rata (Piedras-Renteria, E. S. y col. (1997)). Otras moléculas de transducción de señal que se activan por el complejo de Relaxina/LGR7 son la fosfoinositido-3 quinasa, tirosina quinasa, y fosfodiesterasas (Bartsch, O. y col. (2001), Bartsch, O. y col. (2004)). Las vías de transducción de señal adicionales activadas por este sistema incluyen la vía de óxido nítrico (NO) que llevan al aumento de los niveles de GMP cíclico en corazones de rata y cobayo (Bani-Sacchi, T. y col. (1995)).

La Relaxina actúa como una hormona pleotrópica (Dschietzig T. y col. (2006)) que posee actividad biológica sobre órganos tales como pulmón, riñón, cerebro, y corazón. La fuerte actividad antifibrótica y vasodilatadora de Relaxina es notablemente responsable por los efectos positivos obtenidos con este péptido en varios modelos de enfermedad animal así también como en los estudios clínicos (McGuane J.T. y col. (2005)). El RLN2 tiene múltiples acciones beneficiosas en el sistema cardiovascular en condiciones patológicas. Este mantiene la homeostasis del tejido y protege el miocardio lesionado durante diversos procesos fisiopatológicos. Esto exhibe efectos vasodilatadores pronunciados, por ejemplo, que afectan el flujo y la vasodilatación en arterias coronarias de roedores (Nistri, S. y col. (2003)) y en los lechos vasculares de otros órganos. En ratas espontáneamente hipertensas, el RLN2 redujo la presión arterial, un efecto mediado por el aumento de producción de NO.

Se ha evaluado una actividad cardioprotectora de la Relaxina 2 en diferentes modelos animales tales como cobayas, ratas y cerdos (Perna A.M. y col. (2005), Bani, D. y col. (1998)). El RLN2 mejora la lesión miocárdica, infiltración celular inflamatoria y posterior fibrosis, de este modo se alivia la disfunción ventricular grave (Zhang J. y col. (2005)). La Relaxina 2 exhibe fuerte actividad antifibrótica. En los tejidos lesionados, la activación y proliferación de fibroblastos causa aumento de la producción de colágeno e la fibrosis intersticial. La fibrosis del corazón aumenta por sobrecarga biomecánica e influye en la disfunción, remodelado y arritmogénesis ventricular. En modelos animales, la infusión continua de Relaxina 2 inhibe o incluso revierte la disfunción cardíaca causada por cardiomiopatía, hipertensión, toxicidad cardíaca inducida por isoprenalina, cardiomiopatía diabética e infarto de miocardio. Esta inhibición de fibrogénesis o inversión de fibrosis establecida puede reducir el endurecimiento ventricular y aumentar la función diastólica. En particular, aunque la Relaxina 2 reduce la acumulación de colágeno aberrante, no afecta el contenido de colágeno basal en tejidos sanos, lo que destaca su seguridad para uso terapéutico.

Se ha analizado la Relaxina 2 en varios estudios clínicos como vasodilatador pleotrópico para el tratamiento de los pacientes con insuficiencia cardíaca aguda con evolución muy promisoria. En estos estudios, la Relaxina 2 se asoció con alivio favorable de la disnea y otros resultados clínicos (Teerlink J.R. y col. (2009), Metra M. y col. (2010)) Debido a la limitada semivida *in vivo* de la Relaxina, el tratamiento de los pacientes se debe repetir cada 14 a 21 días, por el cual se debe realizar la administración del compuesto como una infusión continua durante al menos de 48 horas.

Además, la Relaxina 2 también puede ser útil en el tratamiento de enfermedades tales como pancreatitis,

enfermedades relacionadas con la inflamación como artritis reumatoide y cáncer (Cosen-Binker L.I. y col. (2006) Santora K. Y col. (2007)) o escleroderma, fibrosis pulmonar, renal, y hepática (Bennett RG. (2009)). La Relaxina 2 reduce el crecimiento del tumor por xenoinjerto de las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (Radestock Y, Hoang-Vu C, Hombach-Klonisch S. (2008) Breast Cancer Res. 10:R71).

5 La síntesis de Relaxina 2 por procedimientos químicos es difícil. Debido a la baja solubilidad de la cadena B y al requerimiento de la introducción específica y laboriosa de puentes de cisteína entre las cadenas A y B, los rendimientos del péptido activo obtenidos por estos procedimientos son extremadamente bajos (Barlos K.K. y col. (2010)). De modo alternativo, se puede realizar la expresión recombinante de Relaxina 2. Para permitir la escisión eficiente del prepro-péptido durante las modificaciones pos-traducción y la secreción de los péptidos activos maduros y biológicos, las células hospedadoras de expresión se cotransfectan de rutina con los constructos de expresión que codifican la Prohormona-Convertasa 1 y/o 2 (Park J.I. y col. (2008)). No obstante, la eficiencia del procesamiento endoproteolítico de los prepro-péptidos en las células heterólogas a menudo limita en forma significativa la producción de moléculas bioactivas (Shaw J.A. y col. (2002)). La generación de una Relaxina de cadena simple en que un polipéptido no escindible conecta el extremo C-terminal de la cadena A con el extremo N-terminal de la cadena B produce una molécula de Relaxina 2 de cadena simple que exhibe actividad biológica completa.

La semivida de la Relaxina 2 administrada por vía intravenosa en los seres humanos es menor de 10 minutos (Dschietzig T. y col. (2009)). Como consecuencia, en los ensayos clínicos la Relaxina 2 se debe administrar en forma continua durante 48 horas. En consecuencia, el aumento de la semivida biológica de la Relaxina de acción prolongada puede ser de gran ventaja.

El aumento de la semivida biológica se puede realizar por modificación química tal como PEGilación o HESilación del polipéptido de interés, introducción de sitios de N-glicosilación no naturales adicionales o por la fusión genética de este polipéptido con otras moléculas tales como el fragmento Fc de la inmunoglobulina de los anticuerpos, transferrina, albúmina, módulos de unión que se unen *in vivo* a otras moléculas que median una semivida más larga, u otras proteínas, respectivamente.

El documento US20120046229 desvela en el listado de secuencias dos polipéptidos no funcionales de cadena única en los que la cadena A y la cadena B de la Relaxina 2 se fusionan entre sí.

El documento US20120046229 desvela proteínas de fusión en las que las Relaxinas se fusionan al N-terminal de las regiones Fc de las IgG. Las cadenas A y B de la Relaxina se fusionan por una cadena C escindible.

30 La presente invención proporciona variantes de Relaxina de cadena simple fusionadas a la parte Fc del resto Fc humano de un anticuerpo IgG2 o IgG4 con aumento de la semivida.

Sumario de la invención

La invención se refiere a polipéptidos de fusión, de aquí en adelante también denominados como una Relaxina de cadena simple (scRelaxina) fusionados a los restos FC de la IgG humana e IgG4 humana, respectivamente. Estas proteínas de fusión exhiben la actividad biológica de la Relaxina 2 natural, no modificada, pero debido a la fusión a uno de los anteriores restos de IgG mencionados anteriormente exhiben una semivida sérica prolongada.

Mediante el uso de los restos de Fc de IgG2 humana o IgG4 humana se proporciona la ventaja de tener citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1 Actividad de IgG2Fc-scRelaxina e IgG4Fc-scRelaxina no purificadas en un ensayo funcional usando la línea celular CHO-CRELGR7. Como control, se usó hRelaxina 2 (R&D Systems, número de catálogo 6586-RN-025). Los datos se expresan como unidades de luz relativa, que representan la actividad de las variantes de Fc-Relaxina de cadena simple y la expresión de luciferasa inducida por Relaxina 2. Los símbolos representan medias, las barras de error representan S.E.M.

45 La Figura 2 muestra la secuencia de polipéptidos de IgG2Fc-scRelaxina (SEQ ID NO:1). La secuencia extensora está en cursiva, la secuencia de polipéptidos de scRelaxina está subrayada.

La Figura 3 muestra la secuencia de polipéptidos de IgG4Fc-scRelaxina (SEQ ID NO:2).

La Figura 4 muestra la secuencia de polinucleótidos de IgG2Fc-scRelaxin (SEQ ID NO:3).

La Figura 5 muestra la secuencia de polinucleótidos de IgG4Fc-scRelaxina (SEQ ID NO:4).

50 La Figura 6 muestra una representación esquemática de la organización genética de los dominios de Relaxina tipo silvestre y Relaxina de cadena simple así como sus correspondientes polipéptidos.

La Figura 7 muestra una representación esquemática de la organización del dominio de una Relaxina de cadena simple fusionada a un dominio Fc de IgG2 o IgG4, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

El término "resto de aminoácido" se considera que indica un resto de aminoácido contenido en el grupo constituido por los restos de alanina (Ala o A), cisteína (Cys o C), ácido aspártico (Asp o D), ácido glutámico (Glu o E), fenilalanina (Phe o F), glicina (Gly o G), histidina (His o H), isoleucina (Ile o I), lisina (Lys o K), leucina (Leu o L),

metionina (Met o M), asparagina (Asn o N), prolina (Pro o P), glutamina (Gln o Q), arginina (Arg o R), serina (Ser o S), treonina (Thr o T), valina (Val o V), triptofano (Trp o W), y tirosina (Tyr o Y).

La expresión "actividad de Relaxina" se define por la capacidad de Relaxina o sus variantes para la activación de las proteínas G estimuladoras G, en consecuencia la generación del segundo mensajero AMP cíclico, y/o la estimulación de PI3-quinasa. La Relaxina o sus variantes se unen a LGR7, lo que produce la activación intracelular de las proteínas G estimuladoras Gs, lo que produce la posterior generación del segundo mensajero AMP cíclico (AMPC). Sin embargo, la generación de AMPC es una respuesta bifásica dependiente del tiempo. Después de una respuesta corta inicial de AMPC mediada por la adenilato ciclasa de Gs, la señal del receptor cambia a una activación de la proteína G inhibidora y por esto a la respuesta mediada por PI3-quinasa. (Halls M.L., Bathgate R.A., Summers, R.J. (2005)) Signal Switching after Stimulation of LGR7 Receptors by Human Relaxin 2. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1041:288-291).

La expresión "resto que prolonga la semivida" se refiere a un resto farmacéuticamente aceptable, dominio o "vehículo" unido covalentemente ("conjugado") al polipéptido de fusión de la Relaxina directamente o por medio de un conector, que evita o reduce la degradación proteolítica *in vivo* u otra modificación química que disminuye la actividad del polipéptido de fusión de Relaxina, aumenta la semivida u otras propiedades farmacocinéticas, tales como pero sin limitación, aumenta la tasa de absorción, disminuye la depuración, reduce la toxicidad, aumenta la solubilidad, aumenta la actividad biológica y/o selectividad blanco del polipéptido de fusión de Relaxina, en comparación con la forma no conjugada del polipéptido de fusión de Relaxina. La expresión "resto que prolonga la semivida" incluye restos proteicos que prolongan la semivida, tales como albúmina sérica, transferrina o dominio Fc.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan e forma indistinta en el presente documento e incluyen una cadena molecular de dos o más aminoácidos ligados a través de enlaces peptídicos. Los términos no se refieren a una longitud específica del producto. Los términos incluyen modificaciones pos-traducción del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Además, los fragmentos de proteína, análogos, proteínas mutadas o variantes, proteínas de fusión y similares se incluyen en el significado de polipéptido. Los términos también incluyen moléculas en que uno o más análogos de aminoácidos o aminoácidos no canónicos o no naturales se puede sintetizar o expresar en forma recombinante mediante técnicas de ingeniería genética de proteína. Además, las proteínas de fusión de la invención se pueden derivatizar como se describe en el presente documento por técnicas de química orgánica bien conocidas.

La expresión "variante funcional" se refiere a una variante de polipéptido que retiene al menos algo de su actividad biológica natural. En caso de las variantes de Relaxina 2 de acuerdo con la invención, una variante funcional es una variante que muestra al menos de su actividad natural, tal como la activación del receptor de Relaxina LGR7. La activación del receptor de Relaxina LGR7 se puede determinar por un procedimiento divulgado en los procedimientos experimentales.

Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo" cuando se refieren a los polipéptidos de la presente invención incluyen cualquier polipéptido que retiene al menos alguna de las propiedades de unión del receptor del correspondiente polipéptido de Relaxina natural. Los fragmentos de los polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, así como los fragmentos de supresión, y también los polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a las sustituciones, supresiones, o inserciones de aminoácidos. Las variantes se pueden producir en forma natural o no natural. Las variantes no naturales se pueden producir por medio de técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Las variantes de polipéptidos pueden comprender sustituciones, supresiones, o inserciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Las variantes de polipéptidos también se pueden denominar en el presente documento como "análogos de polipéptido". Como se usa en el presente documento, un "derivado" de un polipéptido se refiere a un polipéptido presente que tiene uno o más restos derivatizados químicamente por la reacción de un grupo funcional secundario. También se incluyen como "derivados" los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos naturales de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo, 4-hidroxi prolina se puede sustituir con prolina; 5-hidroxi lisina se puede sustituir con lisina; 3-metilhistidina se puede sustituir con histidina; homoserina se puede sustituir con serina; y ornitina se puede sustituir con lisina.

La expresión "proteína de fusión" indica que la proteína incluye los componentes del polipéptido derivados de más de una proteína o polipéptido original y/o que la proteína de fusión incluye dominios de la proteína derivados de uno o más proteínas o polipéptido originales que no están dispuestos en su orientación natural. Normalmente, una proteína de fusión se expresa a partir de un gen de fusión en que una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptidos de una proteína añadida en fase con, y opcionalmente separada por un conector o extensor de, una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptidos de una proteína diferente. El gen de fusión puede ser expresado por una célula hospedadora recombinante como una proteína única.

La expresión "secuencia de nucleótidos" o "polinucleótido" se considera que indica una extensión consecutiva de dos o más moléculas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético o cualquiera de sus combinaciones.

El término "CE₅₀" (concentración media máxima efectiva) se refiere a la concentración efectiva de un compuesto terapéutico que induce una respuesta media entre la inicial y la máxima después de algún tiempo de exposición especificado.

5 El término "inmunogenicidad" como se usa en relación con una sustancia dada se considera que indica la capacidad de la sustancia de inducir una respuesta del sistema inmunitario. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta mediada por células o anticuerpos (véase, por ejemplo, Roitt: Essential Immunology (8th Edición, Black-well) para definición adicional de inmunogenicidad). Normalmente, la reactividad del anticuerpo reducida será una indicación de reducción de la inmunogenicidad. La reducción de la inmunogenicidad se puede determinar por el uso de cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo *in vivo* o *in vitro*.

10 La expresión "reacción en cadena de polimerasa" o "PCR" generalmente se refiere a un procedimiento para la amplificación de una secuencia de nucleótidos deseada *in vitro*, que se describe por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 4.683.195 y US 4.683.195. En general, el procedimiento de PCR involucra ciclo repetidos de síntesis de extensión del cebador, mediante cebadores de oligonucleótidos capaces de hibridar preferentemente a un ácido nucleico modelo.

15 El término "vector" se refiere a un plásmido u otras secuencias de nucleótidos que son capaces de replicarse dentro de una célula hospedadora o integrarse en el genoma de la célula hospedadora y como tal, son útiles para realizar funciones diferentes en conjunto con células hospedadoras compatibles (un sistema vector-hospedador): para facilitar la clonación de la secuencia de nucleótidos, es decir, producir cantidades utilizables de la secuencia, dirigir la expresión del producto génico codificado por la secuencia e integrar la secuencia de nucleótidos en el genoma de la célula hospedadora. El vector contendrá diferentes componentes de acuerdo con la función que se va a realizar.

20 "Célula", "célula hospedadora", "línea celular" y "cultivo celular" se usan de forma indistinta en el presente documento y se debe entender que todos estos términos incluyen la progenie resultante del crecimiento o cultivo de una célula. El término "semivida" se usa en su significado farmacocinético como el tiempo necesario para que la concentración del fármaco se reduzca a la mitad en comparación con un valor dado *in vivo*. La semivida usualmente se determinará mediante las mediciones de la concentración en suero o plasma. En consecuencia, los términos alternativos "semivida sérica" o "semivida plasmática" se pueden usar para especificar la matriz de origen. Para la determinación de la semivida se pueden considerar no solo la concentración sino también la actividad biológica del medicamento, que luego se denomina como la "semivida funcional" *in vivo*, que significa el tiempo en que la actividad del polipéptido cayó en 50 % de un valor dado. Sin embargo, como la determinación de la concentración de fármaco a menudo es mucho más fácil que la determinación de su actividad biológica en las matrices biológicas, la semivida sérica se puede usar como un indicador para su semivida funcional *in vivo*.)

30 La semivida funcional *in vivo* y la semivida sérica se pueden determinar por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica y por ejemplo, generalmente puede involucrar las etapas de administración adecuada a un mamífero de una dosis adecuada de la secuencia de aminoácidos o compuesto para tratar (preferentemente como un bolo intravenoso); recolección de muestras de sangre u otras muestras de dicho mamífero en intervalos regulares y determinar el nivel o concentración de la secuencia de aminoácidos o compuesto de la invención en dicha muestra de sangre; (preferentemente preparado como suero o plasma. Los parámetros farmacocinéticos tales como por ejemplo Área bajo la curva (AUC), C_{max}, Depuración (CL) y particularmente semivida se pueden calcular a partir de curvas de concentración-tiempo por procedimientos compartimentales o no compartimentales usando un programa de computación farmacocinético validado.

35 "Glicosilación" es una modificación química en la que se adicional restos de azúcar se añaden al polipéptido en sitios específicos. La glicosilación de polipéptidos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión de un resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptido Asn-X-Ser y Asn-X-Thr ("N-X-S/T"), donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. En consecuencia, la presencia de estas secuencias tripéptidos (o motivos) en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación ligado a N. Ligado a O se refiere a la unión de un resto carbohidrato al oxígeno del grupo hidroxilo de serina y treonina.

40 Un polipéptido de fusión "aislado" es uno que se ha identificado y separado de un componente de la célula que se lo expresó. Los componentes contaminantes de la célula son materiales que pueden interferir en los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido de fusión, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido de fusión se purifica (1) a más de 95 % en peso del polipéptido de fusión determinado por ejemplo, por el procedimiento de Lowry, espectroscopia UV-Vis o por SDS-electroforesis en gel capilar (por ejemplo, en un Caliper LabChip GXII, GX 90 o dispositivo Biorad Bioanalyzer), y en realizaciones preferidas adicionales más de 99 % en peso, (2) un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando de azul Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. En forma habitual, sin embargo, los polipéptidos de fusión aislados se prepararán en al menos una etapa de purificación.

Visión de conjunto

Extensión de la semivida por medio de restos proteicos que prolongan la semivida:

Una posibilidad para aumentar la semivida de una scRelaxina 2 de fusión es una fusión con un resto proteico que prolonga la semivida, tal como el fragmento Fc de inmunoglobulina de los anticuerpos. Los polipéptidos de scRelaxina descritos anteriormente se pueden fusionar directamente o medio de un conector a la porción Fc de una inmunoglobulina. "Inmunoglobulinas" son moléculas que contienen cadenas de polipéptidos mantenidas entre sí por enlaces disulfuro, que normalmente tienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. En cada cadena, un dominio (V) tiene una secuencia de aminoácidos variable de acuerdo con la especificidad del anticuerpo de la molécula. Los otros dominios (C) tienen una secuencia relativamente constante común a las moléculas de la misma clase.

Como se usa en el presente documento, la porción "Fc" de una inmunoglobulina tiene el significado comúnmente dado al término en el campo de inmunología. En forma específica, este término se refiere a un fragmento de anticuerpo que se obtiene por la remoción de las dos regiones de unión al antígeno (los fragmentos de Fab) del anticuerpo. Una vía para eliminar los fragmentos Fab es digerir la inmunoglobulina con papaína proteasa. En consecuencia, la porción Fc se forma de fragmentos de tamaño aproximadamente igual de la región constante de ambas cadenas pesadas, que se asocian a través de interacciones no covalentes y opcionalmente enlaces disulfuros. La porción Fc puede incluir las regiones bisagra y se extiende a través de los dominios CH2 y CH3 al extremo C terminal del anticuerpo. Las regiones bisagra representativas para las inmunoglobulinas humanas y de ratón se pueden hallar en *Antibody Engineering, A Practical Guide*, Borrebaeck, C.A.K., ed., W.H. Freeman and Co., 1992.

Existen cinco tipos de regiones de Fc de inmunoglobulina humana con diferentes propiedades efectoras y farmacocinéticas: IgG, IgA, IgM, IgD, e IgE. La IgG es la inmunoglobulina más abundante en el suero. La IgG también tiene la semivida más larga en el suero de cualquier inmunoglobulina (23 días). A diferencia de otras inmunoglobulinas, la IgG recircula de modo eficiente después de la endocitosis después de la unión a un receptor de Fc. Existen cuatro subclases de IgG, G1, G2, G3, y G4, cada una de las cuales tiene diferente efecto o funciones. Estas funciones efectoras generalmente son mediadas a través de la interacción con el receptor de Fc (FcγR) o por la unión de C1q y fijación del complemento. Los FcγR se expresan en un panel de células inmunológicas como células citolíticas naturales (células NK), monocitos, macrófagos o eosinófilos, y la formación del complejo Fc/FcγR recluta estas células en los sitios de antígeno unido, normalmente en la señalización y posteriores respuestas inmunitarias tales como la liberación de mediadores de la inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citolítico. Por ejemplo, la unión a FcγR puede llevar a la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), mientras que la unión a los factores del complemento puede llevar a la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (CDC). En el diseño de las proteínas de fusión de Fc heterólogas en que la porción Fc se utiliza únicamente por su capacidad para extender la semivida, puede ser una ventaja minimizar la función efectora, por ejemplo, tal como la liberación de los mediadores inflamatorios. Toda las subclases de IgG son capaces de unirse a los receptores de Fc (CD16, CD32, CD64), G1 y G3 son más efectivas que G2 y G4 (hlgG1 > hlgG3 > hlgG2 > IgG4).

Por lo tanto, en ciertos casos (por ejemplo, condiciones patológicas de un paciente) es una ventaja usar para un polipéptido de fusión de Relaxina el dominio Fc de una IgG2 humana o anticuerpo IgG4 para reducir la liberación de mediadores de la inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis, y/o ataque citotóxico mientras que todavía proporciona el beneficio de una semivida prolongada del polipéptido de fusión de Relaxina,

La región de unión al receptor Fc de la IgG está formada por restos localizados tanto en la bisagra como en las regiones carboxi terminal del dominio CH2. De acuerdo con el efecto *in vivo* deseado, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener cualquiera de los isotipos descritos anteriormente o pueden contener regiones Fc mutadas en el que se han alterado las funciones de unión de complemento y/o de los receptores Fc. Por lo tanto, las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención pueden contener la porción completa de Fc de una inmunoglobulina, fragmentos de la porción Fc de una inmunoglobulina, o análogos de los mismos fusionados a un compuesto scRelaxina. Independientemente de la estructura final de la proteína de fusión, la región Fc o tipo Fc deben servir para prolongar la semivida plasmática *in vivo* del compuesto de scRelaxina fusionado en el extremo C-terminal o N-terminal. Preferentemente, el compuesto scRelaxina fusionado conserva alguna actividad biológica. La actividad biológica se puede determinar por procedimientos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica. Es preferible que la región Fc usada para las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención derive de una región Fc de IgG2 o IgG4.

Generalmente, la región Fc usada para las proteínas de fusión heterólogas de la presente invención puede derivar de cualquier especie que incluye pero sin limitación a ser humano, rata, ratón y cerdo. Preferentemente, la región Fc usada para la presente invención deriva del ser humano o rata. Sin embargo, de máxima preferencia son las regiones y fragmentos de Fc humanos y sus variantes para reducir el riesgo de la proteína de fusión de ser inmunogénica en los seres humanos. Una "región Fc de la secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc hallada en la naturaleza. Una "variante de la región Fc" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la región Fc de la secuencia nativa en virtud de

al menos una modificación de aminoácido. Preferentemente, la variante de la región Fc tiene al menos una sustitución de aminoácido en comparación con una región Fc de la secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente uno a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente uno a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de la secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. La variante de la región Fc en el presente documento preferentemente poseerá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de la secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido original, y con máxima preferencia al menos aproximadamente 90 % identidad de secuencia con la misma, con más preferencia al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con este. Los polipéptidos de fusión FC pueden formar dímeros. Los dímeros preferidos son homodímeros.

Una realización preferida de la invención es un polipéptido de fusión que comprende un dominio de Fc de un anticuerpo IgG2 o IgG4 humano fusionado por medio de su extremo terminal carboxi a la molécula de scRelaxina (la molécula de scRelaxina tiene la secuencia de aminoácidos subrayada de la Figura 2). Una realización preferida adicional de la divulgación es un polipéptido de fusión que comprende un dominio de Fc de un anticuerpo IgG2 o IgG4 humano fusionada por medio de una unidad extensora a la molécula de scRelaxina.

En una realización más preferida el polipéptido de fusión comprende en orden desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi (como se ilustra en la Figura 7):

- a) un dominio Fc de IgG2 o IgG4 humana,
- b) a unidad extensora, y
- c) la scRelaxina

En una realización más preferida el polipéptido de fusión comprende en orden desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi (como se ilustra en la Figura 7):

- a) un dominio Fc de IgG2 o IgG4 humana,
- b) una unidad extensora como se ilustra en la Figura 2, y
- c) la scRelaxina

Una realización preferida adicional es un homodímero de un polipéptido como se describió anteriormente.

Unidades extensoras:

Tales extensores son conocidos en la técnica y tienen 1 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, tienen 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, tienen 1 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, tienen 1 a aproximadamente 15 aminoácidos de longitud, tienen 1 a 10 aminoácidos de longitud, tienen 4 a 25 aminoácidos de longitud, tienen 4 a 20 aminoácidos de longitud, tienen 4 a 15 aminoácidos de longitud, o tienen 4 a 10 aminoácidos de longitud.

La composición de aminoácidos de las secuencias extensoras es variable, si bien se prefiere un extensor que exhiba una puntuación de inmunogenicidad baja. En una realización de la invención un polipéptido extensor que conecta la scRelaxina 2 con un resto proteico que prolonga la semivida puede estar compuesto de cualquier aminoácido.

En una realización preferida el polipéptido extensor comprende al menos un resto Gly, Ser, Ile, Glu, Arg, Met, y/o Asp. En una realización más preferida el polipéptido extensor comprende los restos Gly y Ser. En una realización preferida adicional el péptido extensor es un conector rico en glicina tal como péptidos que comprenden la secuencia [GGGS]_n como se divulga en la patente EE.UU. N.º 7.271.149. En otras realizaciones, se usa un polipéptido extensor rico en serina, como se describe en la patente EE.UU. N.º 5.525.491. Una realización preferida adicional es un polipéptido extensor que comprende los restos Gly y Ser y tiene una relación de Gly a Ser de al menos 3 a 1.

En una realización preferida el resto proteico que prolonga la semivida es el resto Fc de un anticuerpo IgG2 o IgG4 humano.

En una realización adicional los polipéptidos de fusión anteriormente mencionados que además comprenden al menos una el resto que prolonga la semivida tiene una semivida extendida en comparación con la correspondiente Relaxina tipo silvestre, en los que la extensión de la semivida es al menos 5, 10, 20, 50, 100 o 500 veces. Preferentemente, la semivida se determina como semivida sérica o plasmática, lo que significa la detección de la proteína de fusión en suero o plasma, por ejemplo por medio de un ensayo ELISA de cuantificación disponible en el comercio (por ejemplo, R&D Systems, kit ELISA Relaxina 2 humana Quantikine, número de catálogo DRL200) u otros ensayos adecuados para la cuantificación. La semivida es preferentemente una semivida sérica o plasmática humana. Preferentemente, la semivida también se determina como semivida funcional *in vivo*, lo que significa que se determina la actividad del polipéptido de fusión en suero o plasma. Los ensayos para determinar la actividad de una scRelaxina de la invención son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

Clonación, sistemas de vector, expresión, hospedador, y purificación

La invención también proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de fusión de la invención. Este sistema de vector se une operativamente a una secuencia de expresión

capaz de dirigir su expresión en una célula hospedadora.

Una célula hospedadora adecuada se puede seleccionar del grupo constituido por células bacterianas (tal como *E. coli*), células de levaduras (tales como *Saccharomyces cerevisiae*), células fúngicas, células vegetales, células de insecto y células animales. Las células animales incluyen, pero sin limitación, células HEK293, células CHO, células COS, células BHK, células HeLa y varias células de mamífero primarias. Los derivados de las células mamíferas tales como las células HEK293T también son aplicables.

Moléculas de ADN de la invención

La presente invención también se refiere a las moléculas de ADN que codifican una proteína de fusión de la invención. Las secuencias preferidas se muestran en las Figuras 4 y 5.

Las moléculas de ADN de la invención no se limitan a las secuencias desveladas en el presente documento, sino que también incluyen sus variantes. Las variantes de ADN dentro de la invención se pueden describir con referencia a sus propiedades físicas en la hibridación. Los trabajadores expertos reconocerán que el ADN se puede usar para identificar su complemento y, ya que el ADN es bicatenario, su equivalente u homólogo, mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. También se reconocerá que la hibridación puede producirse con menos de 100 % de complementariedad. Sin embargo, dada la elección de condiciones, se pueden usar técnicas de hibridación para diferenciar entre las secuencias de ADN basadas en su parentesco estructural con una sonda particular. Para la orientación respecto a tales condiciones véase, Sambrook y col., 1989 supra y Ausubel y col., 1995 (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A., & Struhl, K. eds. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley y Sons). La similitud estructural entre dos secuencias de polinucleótidos se puede expresar en función de la "rigurosidad" de las condiciones en las cuales las dos secuencias hibridarán entre sí. Como se usa en el presente documento, el término "rigurosidad" se refiere al grado de que las condiciones desfavorecen la hibridación. Las condiciones rigurosas desfavorecen fuertemente la hibridación, y solo las moléculas más estructuralmente relacionadas se hibridarán entre sí bajo tales condiciones. A la inversa, las condiciones no rigurosas favorecen la hibridación de moléculas que exhiben un menor grado de relación estructural.

La rigurosidad de la hibridación, en consecuencia, se correlaciona directamente con la relación estructural de dos secuencias de ácidos nucleicos. Las siguientes relaciones son útiles para correlacionar la hibridación y el parentesco (donde T_m es la temperatura de fusión de un dúplex de ácido nucleico):

- a. $T_m = 69,3 + 0,41(G+C) \%$
- b. La T_m de un ADN dúplex disminuye en 1 °C con cada aumento de 1 % del número de pares de bases desapareadas.
- c. $(T_m)\mu_2 - (T_m)\mu_1 = 18,5 \log_{10}\mu_2/\mu_1$

donde μ_1 y μ_2 son las fuerzas iónicas de dos soluciones.

La rigurosidad de la hibridación es una función de muchos factores, que incluyen la concentración de ADN total, fuerza iónica, temperatura, tamaño de sonda y la presencia de agentes que alteran los enlaces de hidrógeno. Los factores que promueven la hibridación incluyen concentraciones de ADN totales, fuerzas iónicas altas, temperaturas bajas, tamaño de sonda más larga y la ausencia de agentes que alteran los enlaces de hidrógeno. La hibridación normalmente se realiza en dos fases: la fase de "unión" y la fase de "lavado".

Primero, en la fase de unión, la sonda se une al blanco en las condiciones que favorecen la hibridación. La rigurosidad usualmente se controla en esta etapa por la alteración de la temperatura. Para la rigurosidad alta, la temperatura está usualmente entre 65 °C y 70 °C, a menos que se usen sondas de oligonucleótidos cortos (< 20 nt). Una solución de hibridación representativa comprende 6X SSC, 0,5 % de SDS, 5X solución de Denhardt y 100 µg de ADN portador no específico. Véase, Ausubel y col., sección 2.9, suplemento 27 (1994). Obviamente, se conocen muchas condiciones de tampón diferente, aun funcionalmente equivalente. Cuando el grado de parentesco es menor, se puede elegir una temperatura más baja. Las temperaturas de unión de rigurosidad baja están entre aproximadamente 25 °C y 40 °C. La rigurosidad media está entre al menos aproximadamente 40 °C a menos que aproximadamente 65 °C. Rigurosidad alta es al menos aproximadamente 65 °C.

Segundo, se elimina el exceso de sonda por lavado. En esta fase usualmente se aplican las condiciones más rigurosas. En consecuencia, esta etapa de "lavado" es la más importante para determinar el parentesco por medio de la hibridación. Las soluciones de lavado normalmente contienen concentraciones de sal más bajas. Un ejemplo de solución de rigurosidad media contiene 2X SSC y 0,1 % de SDS. Una solución de lavado de alta rigurosidad contiene el equivalente (en fuerza iónica) de menos que aproximadamente 0,2X de SSC, una solución rigurosa preferida contiene aproximadamente 0,1X SSC. Las temperaturas asociadas con varias rigurosidades son las mismas que se describieron antes para la "unión". La solución de lavado normalmente se reemplaza numerosas veces durante el lavado. Por ejemplo, las condiciones de lavado de rigurosidad alta comprenden el lavado dos veces durante 30 minutos a 55 °C y tres veces durante 15 minutos a 60 °C.

Una realización de la invención es una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido de fusión de la invención.

Constructos y expresión de ADN recombinante La presente invención también proporciona constructos de ADN recombinante que comprenden una o más de las secuencias de nucleótidos de la presente invención. Los constructos recombinantes de la presente invención se usan en relación con un vector, tal como un plásmido, fagémido, fago o vector viral, en el que se inserta una molécula de ADN que codifica un polipéptido de fusión de la invención.

Un polipéptido de fusión proporcionado en el presente documento se puede preparar por expresión recombinante de secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión en una célula hospedadora. Para expresar un polipéptido de fusión en forma recombinante, una célula hospedadora se puede transfectar en vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican un polipéptido de fusión de modo que el polipéptido de fusión se exprese en la célula hospedadora. Las metodologías de ADN recombinante convencionales se usan para preparar y/u obtener ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de fusión, incorporar estos ácidos nucleicos en los vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en las células hospedadoras, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. y col. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en la Patente EE.UU. N.º 4.816.397 por Boss y col.

Para expresar el polipéptido de fusión, se pueden usar procedimientos de expresión de ADN recombinante convencionales (véase, por ejemplo, Goeddel; *Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)). Por ejemplo, El ADN que codifica el polipéptido deseado se puede insertar en un vector de expresión que posteriormente se transfecta en una célula hospedadora adecuada. Las células hospedadoras adecuadas son células procarióticas y eucarióticas. Son ejemplos de células hospedadoras procarióticas por ejemplo bacterias, son ejemplos de células hospedadoras eucarióticas levaduras, células de insecto o mamífero. Se entiende que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, está afectada por factores tales como la elección de la célula hospedadora, el nivel de expresión de la proteína deseada y si la expresión es constitutiva o inducible.

25 **Expresión bacteriana**

Los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano se construyen por inserción de una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales de iniciación y terminación de la traducción adecuadas en la fase de lectura operativa con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si es conveniente, proporcionar la amplificación dentro del hospedador. Los hospedadores procarióticos adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y varias especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*.

Los vectores bacterianos pueden ser, por ejemplo, basados en bacteriófagos, plásmidos o fagémidos. Estos vectores pueden contener un marcador seleccionable y origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos disponibles en el comercio que normalmente contienen elementos del bien conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Después de la transformación de una cepa hospedador adecuada y el cultivo de la cepa hospedador a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime/induce con los medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un período adicional. Las células normalmente se recolectan por centrifugación, se alteran por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se retiene para la purificación posterior.

En los sistemas bacterianos, numerosos vectores de expresión se pueden seleccionar de modo ventajoso de acuerdo con el uso deseado para la proteína que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal proteína pueden ser convenientes vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos del polipéptido de fusión que sean fácilmente purificables. El polipéptido de fusión de la presente invención incluye los productos purificados, productos de procedimientos de síntesis química, y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariótico, que incluye, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y varias especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, con preferencia, de las células de *E. coli*.

Expresión eucariótica

Las células eucariotas se pueden usar para expresar los polipéptidos de la invención. Los sistemas para la expresión de proteínas son conocidas en la técnica. Tales sistemas incluyen, por ejemplo, células eucariotas, medios de cultivo, y vectores de expresión correspondientes. Las células eucariotas comunes para la expresión son, por ejemplo una célula de mamífero, una célula de levadura, una célula vegetal, o una célula de insecto.

Expresión en mamífero y purificación

Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de la célula hospedadora mamífera incluye elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en las células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), virus 40 Simio (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de

adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para la descripción adicional de los elementos regulatorios virales, y sus secuencias, véase, por ejemplo, EE.UU.5.168.062 por Stinski, EE.UU.4.510.245 por Bell y col y EE.UU.4.968.615 por Schaffner y col. Los vectores de expresión recombinantes también pueden incluir orígenes de replicación y marcadores seleccionables (véase, por ejemplo, EE.UU.4.399.216, 4.634.665 y EE.UU.5.179.017, por Axel y col.).

5 Los marcadores seleccionables adecuados incluyen genes que confieren resistencia a fármacos tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en que se ha introducido el vector. Por ejemplo, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) confiere resistencia al metotrexato y el gen neo confiere resistencia a G418. La transfección del vector de expresión en una célula hospedadora se puede llevar a cabo usando técnicas convencionales tal como electroporación, precipitación con fosfato de calcio, y DEAE-dextrano, lipofección o transfección mediada por polielectión.

10 Las células hospedadoras de mamíferos adecuadas para expresar los polipéptidos de fusión proporcionados en el presente documento incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621, células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En algunas realizaciones, el vector de expresión se diseña de modo que la proteína expresada se secreta en el medio de cultivo en que crecen las células hospedadoras. La transfección/expresión transitoria de los anticuerpos por ejemplo se puede obtener siguiendo los protocolos de Durocher y col (2002) Nucl.Acids Res. Vol 30 e9. La transfección/expresión estable de anticuerpos por ejemplo, se puede obtener siguiendo los protocolos del sistema UCOE (T. Benton y col. (2002) Cytotechnology 38: 43-46). El polipéptido de fusión se puede recuperar del medio de cultivo por medio de procedimientos de purificación convencionales.

15 Un polipéptido de fusión de la invención se puede recuperar y purificar de los cultivos celulares recombinantes por procedimientos bien conocidos que incluyen, pero sin limitación, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de Proteína A, cromatografía de Proteína G, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfo-celulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. La cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") también se puede emplear para la purificación. Véase, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology, o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), por ejemplo, Capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10, incorporado cada uno totalmente en el presente documento por referencia.

20 Los polipéptidos de fusión de la invención incluyen productos purificados o aislados, productos de procedimientos de síntesis química y productos obtenidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador eucariótico, que incluye, por ejemplo, células de levaduras (por ejemplo Pichia), plantas superiores, insectos y mamíferos, con preferencia células de mamíferos. De acuerdo con el hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, el polipéptido de fusión de la presente invención puede estar glicosilado o no glicosilado, se prefiere glicosilado. Tales procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, supra, Secciones 17.37-17.42; Ausubel, supra, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20.

25 Un homodímero preferido de la invención se puede obtener por la transformación de una célula hospedadora con un vector de acorde que comprende un polinucleótido de la invención, preferentemente un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO 3 o 4, que permite la expresión de un polipéptido de fusión de la invención, preferentemente un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o 2, el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido de fusión y la formación del homodímero, y el aislamiento del homodímero. Las condiciones que permiten la formación de un homodímero son condiciones que permiten la formación de los enlaces disulfuro intracatenarios entre un polipéptido de fusión de la invención. Tales condiciones son por ejemplo en las células hospedadoras eucariotas. Una célula hospedadora preferida para el proceso es una célula hospedadora eucariota, más preferida es una célula hospedadora de mamífero.

Uso terapéutico

Una realización de la invención es el uso de una composición farmacéutica o un polipéptido de fusión de la invención en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, enfermedades renales, pancreatitis, inflamación, cáncer, escleroderma, fibrosis pulmonar, renal y hepática.

50 Enfermedades cardiovasculares

Los trastornos del sistema cardiovascular, o trastornos cardiovasculares, significan en el contexto de la presente invención por ejemplo los siguientes trastornos: hipertensión (presión arterial alta), trastornos vasculares periféricos y cardíacos, cardiopatía cardíaca coronaria, angina de pecho estable e inestable, insuficiencia miocárdica, disfunción isquémica persistente ("miocardio hibernado"), disfunción posisquémica temporal ("miocardio atontado"), insuficiencia cardíaca, trastornos del flujo sanguíneo periférico, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio.

En el contexto de la presente invención, el término insuficiencia cardíaca incluye las manifestaciones de insuficiencia cardíaca aguda y crónica, con reducción de la fracción de eyección (HFrEF) e insuficiencia cardiaca con fracción de

- 5 eyección conservada (HFpEF), así como tipos más específicos o relacionados de enfermedad, tal como insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia ventricular derecha, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia global, cardiomiopatía isquémica (ICM), cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía hipertrófica (HCM), defectos cardíacos congénitos, defectos de la válvula cardíaca, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de la válvula cardíaca, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, defectos de la válvula cardíaca combinados, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, cardiomiopatía alcohólica, trastornos de almacenamiento cardíaco y metabólicos y fases agudas de insuficiencia cardíaca agravada.
- 10 Las enfermedades de insuficiencia cardíaca preferidas se seleccionan del grupo de enfermedades que comprenden insuficiencia cardíaca con reducción de la fracción de eyección (HFrEF) e insuficiencia cardíaca con fracción de eyección conservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia ventricular derecha, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia global, cardiomiopatía isquémica (ICM), cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía hipertrófica (HCM), y defectos cardíacos congénitos.
- 15 Los compuestos de acuerdo con la invención también son adecuados para reducir el área del miocardio afectada por un infarto, el remodelado cardíaco adverso posterior a infarto de miocardio y para la profilaxis de los infartos secundarios.
- 20 Los compuestos de acuerdo con la invención también son adecuados para la profilaxis y/o tratamiento de trastornos tromboembólicos, daño por reperfusión después de la isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombotosis arterial y venosa, edemas, isquemias tales como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y ataques isquémicos transitorios, para cardioprotección en relación con las operaciones de bypass arterial coronario (CABG), angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (PTCA), PTCA después de la trombólisis, PTCA de rescate, trasplantes cardíacos y operaciones a corazón abierto, y para la protección de órganos en relación con los trasplantes, operaciones de bypass, exámenes de catéter y otros procedimientos quirúrgicos. Otras áreas de
- 25 indicación son, por ejemplo, la prevención y/o tratamiento de trastornos respiratorios, tales como, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (bronquitis crónica, EPOC), asma, enfisema pulmonar, bronquiectasia, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular hipertensión arterial pulmonar.

Enfermedad renal

- 30 La presente invención se refiere al uso de un polipéptido de fusión de la invención como medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de las enfermedades renales, en especial las enfermedades renales aguda y crónicas y las insuficiencias renales crónicas, así como la falla renal aguda y crónica, que incluye etapas aguda y crónicas de la falla renal con y sin requerimiento de diálisis, así como las enfermedades renales subyacentes o relacionadas tales como hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, glomerulonefritis primarias, secundaria, así como aguda y crónica, glomerulonefritis membranosa y
- 35 membranoproliferativa, síndrome Alport, glomerulosclerosis, enfermedades tubulares intersticiales, enfermedades nefropáticas, tales enfermedades renales primarias y congénitas, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas como rechazo al trasplante renal, enfermedades renales inducidas por el complejo inmune, así como enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, enfermedades renales diabéticas y no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefrosclerosis, nefrosclerosis hipertensiva, síndrome nefrótico, que se caracteriza y se asocia diagnósticamente con una reducción anormal de la depuración de creatinina y/o excreción de agua,
- 40 concentraciones sanguíneas aumentadas anormales de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración de la actividad de las enzimas renales, tales como glutamilsintetasas, osmolaridad urinaria y volumen urinario, aumento de microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolas, dilatación tubular, hiperfosfatemia y/o el requerimiento de diálisis.
- 45 Además, un polipéptido de fusión de la invención se puede usar como medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de los carcinomas renales, después de la resección incompleta del tumor del riñón, deshidratación después del uso excesivo de diuréticos, aumento de la presión arterial no controlada con hipertensión maligna, obstrucción e infección del aparato urinario, amiloidosis, así como enfermedades sistémicas asociadas con daño glomerular, tal como lupus eritematoso, y enfermedades sistémicas inmunológicas reumáticas, así como estenosis arterial renal,
- 50 trombotosis arterial renal, trombotosis de la vena renal, neuropatía inducida por analgésicos y acidosis tubular renal.
- Además, un polipéptido de fusión de la invención se puede usar como medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de las enfermedades renales intersticiales aguda y crónica inducida por medio de contraste e inducida por fármacos, síndrome metabólico y dislipidemia.
- 55 Además, la presente invención incluye el uso de un polipéptido de fusión de la invención como medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de las secuelas asociadas con enfermedades renales aguda y/o crónica, tales como edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, alteraciones electrolíticas (por ejemplo, hiperpotasemia, hiponatremia), así como metabolismo de hueso y carbohidratos.

Enfermedades pulmonares

Además, los polipéptidos de fusión de acuerdo con la invención también son adecuadas para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedades pulmonares en especial de trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (PAH) y otras formas de hipertensión pulmonar (PH) que incluyen hemicardiopatía izquierda, HIV, anemia drepanocítica, tromboembolismos (CTEPH), sarcoidosis, EPOC o hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome disneico agudo (ARDS), lesión pulmonar aguda (ALI), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar (por ejemplo enfisema pulmonar inducida por el humo de cigarrillo) y fibrosis quística (CF).

Trastornos fibróticos

Los polipéptidos de fusión de acuerdo con la invención también son adecuadas para el tratamiento y/o profilaxis de los trastornos fibróticos de los órganos internos tales como, por ejemplo, el pulmón, el corazón, el riñón, la médula ósea y en particular el hígado, y también las fibrosis dermatológicas y trastornos oculares fibróticos. En el contexto de la presente invención, el término trastornos fibróticos incluye en particular los siguientes términos: fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, fibrosis endomiocárdica, nefropatía, glomerulonefritis, fibrosis renal intersticial, daño fibrótico resultante de la diabetes, fibrosis de médula ósea y trastornos fibróticos similares, escleroderma, morfea, queloides, cicatrización hipertrófica (también después de procedimientos quirúrgicos), nevosi, retinopatía diabética, vitreorretinopatía proliferativa y trastornos del tejido conectivo (por ejemplo sarcoidosis).

Cáncer

El cáncer es una enfermedad en que un grupo de células presenta crecimiento descontrolado. Los cánceres usualmente se clasifican en carcinomas que es un cáncer derivado células epiteliales (Este grupo incluye muchos de los cánceres más comunes, que incluyen los de mama, próstata, pulmón y colon); sarcomas, que derivan del tejido conectivo, o células mesenquimáticas; linfoma y leucemia, derivados de las células hematopoyéticas; tumor de célula germinal, que deriva de células pluripotentes; y blastomas, que es un cáncer derivado de tejido "precursor" o embrionario inmaduro.

La presente invención adicionalmente proporciona el uso de un polipéptido de fusión de la invención para preparar un medicamento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, en particular los trastornos mencionados anteriormente.

La presente invención adicionalmente proporciona un procedimiento para el tratamiento y/o prevención de trastornos, en particular los trastornos mencionados anteriormente, mediante una cantidad efectiva de al menos un polipéptido de fusión de la invención.

La presente invención adicionalmente proporciona polipéptidos de fusión de la invención para usar en un procedimiento para el tratamiento y/o profilaxis de enfermedad cardíaca coronaria, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, e infarto de miocardio

Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de fusión de Relaxina de cadena simple en un vehículo farmacológicamente aceptable. La proteína de fusión de Relaxina de cadena simple se puede administrar en forma sistémica o local. Se puede usar cualquier modo apropiado de administración conocido en la técnica que incluye, pero sin limitación, administración intravenosa, intraperitoneal, intraarterial, intranasal, por inhalación, oral, subcutánea, por inyección local o en la forma de un implante quirúrgico.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que pueden comprender polipéptidos de fusión de la invención, solos o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que se puede administrar en cualquier portador farmacéutico biocompatible y estéril, que incluye, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, y agua. Cualquiera de estas moléculas se puede administrar a un paciente solo o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas, en las composiciones farmacéuticas donde se mezcla con excipiente(s) o vehículos farmacéuticamente aceptables. En una realización de la presente invención, el portador farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte.

Dosis terapéuticamente eficaz

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para obtener el fin deseado, por ejemplo insuficiencia cardíaca. La determinación de una dosis efectiva está bien dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente en ensayos *in vitro*, por ejemplo activación del receptor LGR7, *ex vivo* en corazones de rata perfundidos aislados, o en modelos animales, usualmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se usa para obtener un intervalo de concentración y vía de administración convenientes.

Tal información se puede usar después para determinar dosis y vías útiles para la administración en los seres humanos.

Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del polipéptido de fusión que mejora los síntomas o la afección. La eficacia terapéutica y la toxicidad de tales compuestos se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro* o animales experimentales, por ejemplo, la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población) y DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación, DE50/DL50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos grandes. Los datos obtenidos de los ensayos *in vitro* y estudios en animales se usan para formular un intervalo de dosis para uso humano. La dosis de tales compuestos se halla con preferencia en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis varía en este rango de acuerdo con la forma de dosis empleada, sensibilidad del paciente, y la vía de administración.

Las cantidades de dosis normales pueden variar de 0,1 a 100.000 miligramos de dosis total, de acuerdo con la vía de administración. Las pautas en cuanto a dosis y procedimientos de administración particulares se proporcionan en la bibliografía. Véase las Patentes EE.UU. N.º 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Los expertos en la técnica emplearán diferentes formulaciones para los polinucleótidos que para las proteínas o sus inhibidores. De modo similar, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para las células, condiciones, localizaciones, etc. particulares.

La presente invención también se describe con los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención con referencia a las realizaciones específicas.

Estas ejemplificaciones, si bien ilustran ciertos aspectos específicos de la invención, no representan limitaciones ni circunscriben el alcance de la invención desvelada. Todos los ejemplos se realizaron usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la técnica, excepto cuando se describen de otro modo en detalle. Las técnicas de biología molecular de rutina de los siguientes ejemplos se pueden llevar a cabo como se describe en los manuales de laboratorio convencionales, tal como Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Ejemplos

Protocolos experimentales

Construcción de las variantes de Relaxina:

Las secuencias ADNc de las variantes de Relaxina se generaron por síntesis química del gen. Los genes sintetizados se subclonaron en el vector de expresión de mamífero pCEP4 (Invitrogen, número de catálogo V044-50). Como secuencia líder señal para la secreción correcta de la proteína resultante, se usaron la secuencia líder de la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP, composición de aminoácidos MLTPPLLLLLPLLSALVAA) o de CD33 (composición de aminoácidos MPLLLLLPLLWAGALA). Para la subclonación de los constructos sintetizados se usaron las enzimas de restricción HindIII y BamH1 de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Expresión de las variantes de Relaxina:

Para la expresión en pequeña escala (hasta 2 mililitros de volumen de cultivo) las células HEK293 (ATCC, número de catálogo CRL-1573) se transfectaron en forma transitoria por medio del reactivo de transfección Lipofectamine2000 (Invitrogen, número de catálogo 11668-019) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en D-Mem F12 (Gibco, n.º 31330), 1 % de Penicilina-estreptomina (Gibco, n.º 15140) y 10 % de suero de carnero fetal (FCS, Gibco, n.º 11058) en una incubadora humidificada a 5 % de dióxido de carbono a 37 °C.

Tres a cinco días después de la transfección, se analizó el medio acondicionado de las células transfectadas para determinar la actividad por medio de la línea celular CHO-CRE-GR7 transfectada en forma estable. Para la expresión en gran escala (10 mililitros de volumen de cultivo y más) los constructos se expresaron en forma transitoria en células de mamífero descritas en Tom y col., 2007. En breves palabras, el plásmido de expresión se transfectó en las células HEK293-6E y se incubó en matraces Fernbach o Wave-Bags. La expresión fue a 37 °C durante 5 a 6 días en medio F17 (Invitrogen). Se añadieron suplemento de 5 g/l de triptona TN1 (Organotechnie), 1 % de Ultra-Low IgG FCS (Invitrogen) y 0,5 mM de ácido valproico (Sigma) después de la transfección.

Cuantificación de las variantes de Relaxina expresadas:

Para la cuantificación de las variantes de Relaxina secretadas y purificadas, se usó el kit ELISA de cuantificación disponible en el comercio (R&D Systems, kit ELISA Relaxina-2 Quantikine, número de catálogo DRL200) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ensayo de actividad:

Se transfectaron células CHO K1 (ATCC, número de catálogo CCL-61) en forma estable con el constructo del gel indicador de luciferasa como elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE) (Biomyx Technology, pHTS-CRE, número de catálogo P2100) que produce en una línea celular CHO-CRE-Luciferasa.

- 5 Esta línea celular posteriormente se transfectó en forma estable con el receptor LGR7/RXFP1 humano (número de referencia NM_021634.2), clonado como el fragmento de ADN de 2271 pares de base de largo en el vector de expresión de mamífero pcADN3.1(-) (Invitrogen, número de catálogo V79520), que produce la línea celular CHO-CRE-LGR7. Esta línea celular se cultivó en D-Mem F12 (Gibco, n.º 31330) 2 mM de Glutamax (Gibco, n.º 35050), 100 nM de piruvato (Gibco, n.º 11360-070), 20 mM de HEPES (Gibco, n.º 15630), 1 % de penicilina-estreptomicina (Gibco, n.º 15140) y 10 % de suero de carnero fetal (FCS, Gibco, n.º 11058).

- 10 Para la estimulación, el medio se cambió por OptiMem (Gibco, n.º 11058) + 1 % de FCS que contiene diferentes concentraciones de las variantes de proteínas de Relaxina de cadena simple-Fc expresadas en forma recombinante purificada o no purificada (usualmente a partir de una concentración de 100 nM, seguido por diluciones 1:2). Como control positivo, se usó Relaxina 2 humana (Acceso Genbank número NP_604390.1) expresada en forma recombinante disponible en el comercio (R&D Systems, número de catálogo 6586-RN-025). Posteriormente, las células se incubaron durante 6 horas en una incubadora humidificada a 5 % de dióxido de carbono a 37 °C. Después de 6 horas las células se analizaron para determinar la actividad de Luciferasa por medio de un sistema de ensayo de Luciferasa (Promega, n.º E1500) y mediante el uso del lector Tecan Infinite 500, modo de luminiscencia, tiempo de integración de 1000 milisegundos, tiempo de medición de 30 segundos.

- 15 Se usaron unidades de luminiscencia relativa para determinar valores de CE50 de las diferentes moléculas por medio del programa de ordenador Graph Pad Prism Version 5.

Prueba de inmunogenicidad

- 25 La prueba de inmunogenicidad se realiza usando el programa de ordenador NetMHCIIpan (Center for Biological Sequence Analysis; Department of Systems Biology; Technical University of Denmark) que calcula la potencial afinidad de unión de las proteínas o péptidos al complejo MHCII. A mayor afinidad de unión calculada mayor riesgo de inducir anticuerpos contra la proteína o polipéptido de interés.

La determinación *in vitro* del mapeo de epítomos de las células T se realiza de acuerdo con el protocolo publicado por Reijonen and Kwok (Reijonen H., Kwok WW. (2003) Use of HLA class II tetramers in tracking antigen-specific T cells and mapping T-cell epitopes. *Methods* 29:282-288).

Ejemplo 1: IgG2Fc-scRelaxina

- 30 La IgG2Fc-scRelaxina consiste en una variante de la cadena simple de la Relaxina 2 humana, en que el extremo C-terminal de la cadena A y el extremo N-terminal de la cadena B se conectan por medio de un conector GGGSGGGSG. El extremo N-terminal de la cadena A se conecta por medio de un polipéptido como extensor que consiste en la composición de aminoácidos GGS GGSP al resto Fc de la molécula de IgG2 humana. Esto produce un polipéptido como se ilustra en la SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 2: IgG4Fc-scRelaxina

- 40 La IgG2Fc-scRelaxina consiste en una variante de la cadena simple de la Relaxina 2 humana, en que el extremo C-terminal de la cadena A y el extremo N-terminal de la cadena B se conectan por medio de un conector GGGSGGGSG. El extremo N-terminal de la cadena A se conecta por medio de un polipéptido como extensor que consiste en la composición de aminoácidos GGS GGSP al resto Fc de la molécula de IgG4 humana. Esto produce un polipéptido como se ilustra en la SEQ ID NO: 2.

Citas adicionales:

- Hsu, S. Y. (2003). New insights into the evolution of the relaxin-LGR signaling system. *Trends Endocrinol Metab* 14:303-309
- 45 Wilkinson, T. N., Speed, T. P., Tregear, G. W., Bathgate, R. A. (2005). Evolution of the relaxin-like peptide family. *BMC Evol Biol* 5:14
- Hudson P, Haley J, John M, Cronk M, Crawford R, Haralambidis J, Tregear G, Shine J, Niall H. (1983) Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature* 301: 628-631
- 50 Toth, M., Taskinen, P., & Ruskoaho, H. (1996). Relaxin stimulates atrial natriuretic peptide secretion in perfused rat heart. *J Endocrinol* 150: 487-495
- Piedras-Renteria, E. S., Sherwood, O. D., and Best, P. M. (1997). Effects of relaxin on rat atrial myocytes: I. Inhibition of I(to) via PKA-dependent phosphorylation. *Am J Physiol* 272:H1791-H1797
- Bartsch, O., Bartlick, B., and Ivell, R. (2001). Relaxin signaling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity. *Mol Hum Reprod* 7:799-809
- 55 Bartsch, O., Bartlick, B., and Ivell, R. (2004). Phosphodiesterase 4 inhibition synergizes with relaxin signaling to

- promote decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 89:324-334
- Bani-Sacchi, T., Bigazzi, M., Bani, D., Mannaioni, P. F., and Masini, E. (1995) Relaxin-induced increased coronary flow through stimulation of nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 116:1589-1594
- 5 Dschietzig T, Bartsch C, Baumann G, Stangl K. (2006) Relaxin - a pleiotropic hormone and its emerging role for experimental and clinical therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 112:38-56
- McGuane JT, Parry LJ. (2005) Relaxin and the extracellularmatrix: Molecular mechanisms of action and implications for cardiovascular disease. *Expert. Rev. Mol.Med.* 7:1-18
- Nistri, S., Chiappini, L., Sassoli, C. and Bani, D. (2003) Relaxin inhibits lipopolysaccharide-induced adhesion of neutrophils to coronary endothelial cells by a nitric oxide-mediated mechanism. *FASEB J.* 17:2109-2111
- 10 Perna AM, Masini E, Nistri S, Briganti V, Chiappini L, Stefano P, Bigazzi M, Pieroni C, Bani Sacchi T, Bani D. (2005) Novel drug development opportunity for relaxin in acute myocardial infarction: evidences from a swine model. *FASEB J.* 19:1525-1527
- Bani, D., Masini, E., Bello, M. G., Bigazzi, M. and Sacchi, T. B. (1998) Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart. *Am. J. Pathol.* 152:1367-1376;
- Zhang J, Qi YF, Geng B, Pan CS, Zhao J, Chen L, Yang J, Chang JK, Tang CS. (2005) Effect of relaxin on myocardial ischemia injury induced by isoproterenol. *Peptides* 26:1632-1639
- 15 Teerlink JR, Metra M, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Weatherley BD, Marmor A, Katz A, Grzybowski J, Unemori E, Teichman SL, Cotter G. (2009) Relaxin for the treatment of patients with acute heart failure (Pre-RELAX-AHF): a multicentre, randomised, placebo-controlled, parallel-group, dose-finding phase IIb study. *Lancet.* 373:1429-1439
- 20 Metra M, Teerlink JR, Felker GM, Greenberg BH, Filippatos G, Ponikowski P, Teichman SL, Unemori E, Voors AA, Weatherley BD, Cotter G. (2010) Dyspnoea and worsening heart failure in patients with acute heart failure: results from the Pre-RELAX-AHF study. *Eur J Heart Fail.* 12:1130-1139
- Cosen-Binker LI, Binker MG, Cosen R, Negri G, Tiscornia O. (2006) Relaxin prevents the development of severe acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 12:1558-1568
- 25 Santora K, Rasa C, Visco D, Steinetz BG, Bagnell CA. (2007) Antiarthritic effects of relaxin, in combination with estrogen, in rat adjuvant induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 322:887-893
- Bennett RG. (2009) Relaxin and its role in the development and treatment of fibrosis. *Transl Res.* 154:1-6
- Barlos KK, Gatos D, Vasileiou Z, Barlos K. (2010) An optimized chemical synthesis of human relaxin-2. *J Pept Sci.* 16:200-211.
- 30 Park JI, Semyonov J, Yi W, Chang CL, Hsu SY (2008) Regulation of receptor signaling by relaxin A chain motifs: derivation of pan-specific and LGR7-specific human relaxin analogs. *J Biol Chem.* 283:32099-32109
- Shaw JA, Delday MI, Hart AW, Docherty HM, Maltin CA, Docherty K (2002) Secretion of bioactive human insulin following plasmid-mediated gene transfer to nonneuroendocrine cell lines, primary cultures and rat skeletal muscle *in vivo*. *J Endocrinol* 172:653-672
- 35 Dschietzig T, Teichmann S, Unemori E, Wood S, Boehmer J, Richter C, Baumann G, Stangl K (2009) Intravenous Recombinant Human Relaxin in Compensated Heart Failure: A Safety, Tolerability, and Pharmacodynamic Trial. *J Cardiac Fail* 5:182-190
- WO 97/26265
- WO 99/03861
- 40 WO 00/06568
- WO 00/06569
- WO 02/42301
- WO 03/095451
- WO 01/19355
- 45 WO 01/19776
- WO 01/19778
- WO 01/19780
- WO 02/070462
- WO 02/070510
- 50 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> Bayer Pharma AG
- <120> Polipéptidos de fusión y usos de los mismos
- <130> BHC 12 1 036
- <160> 4
- 55 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 291
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 645 644 T3

<220>

<223> scRelaxina IgG2 humana - polipéptido de fusión

<400> 1

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
20 25 30

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
35 40 45

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys
50 55 60

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
65 70 75 80

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
85 90 95

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
100 105 110

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
115 120 125

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
130 135 140

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
145 150 155 160

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

ES 2 645 644 T3

165 170 175

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
180 185 190

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
195 200 205

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Ser Pro Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys Cys
225 230 235 240

Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Gly Gly
245 250 255

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys Leu
260 265 270

Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met Ser
275 280 285

Thr Trp Ser
290

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptido de fusión scRelaxina IgG4 humana

<400> 2

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80

ES 2 645 644 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
100 105 110

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Pro Gln Leu Tyr Ser Ala Leu Ala Asn Lys
225 230 235 240

Cys Cys His Val Gly Cys Thr Lys Arg Ser Leu Ala Arg Phe Cys Gly
245 250 255

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Trp Met Glu Glu Val Ile Lys
260 265 270

Leu Cys Gly Arg Glu Leu Val Arg Ala Gln Ile Ala Ile Cys Gly Met
275 280 285

Ser Thr Trp Ser
290

<210> 3
<211> 873
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 645 644 T3

<223> polinucleótido para el polipéptido de fusión scRelaxina IgG2 humana

<400> 3

```

gtggaatgcc cgccgtgccc ggcgcccgcg gtggcgggccc cgagcgtggt tctggttccg      60
ccgaaaccga aagataccct gatgattagc cgcaccccgg aagtgacctg cgtggtggtg      120
gatgtgagcc atgaagatcc ggaagtgcag ttttaactggt atgtggatgg catggaagtg      180
cataacgcga aaaccaaacc gcgcaagaa cagttaaca gcaccttcg cgtggtgagc      240
gtgctgaccg tggatcatca ggattggctg aacggcaaag aatataaatg caaagtgagc      300
aacaaggccc tgccgvcgccc gattgaaaa accattagca aaaccaaagg ccagccvcgvc      360
gaaccvcagc tgtataccct gccgcccagc cgcgaagaaa tgacaaaaa ccaggtgagc      420
ctgacctgcc tggatgaaag cttttatccg agcgatattg cggatggaatg ggaaagcaac      480
ggccagcccg aaaacaacta taaaaccacc ccgcccgatgc tggatagcga tggcagcttt      540
tttctgtata gaaactgac cgtggataaa agccgctggc agcagggcaa cgtgttttagc      600
tgcagcgtga tgcataagc gctgcataac cattataccc agaaaagcct gagcctgagc      660
ccgggcaaag gcggcagcgg cggcagcccg cagctgtata gcgvcgctggc gaacaaatgc      720
tgccatgtgg gctgcaccaa acgcagcctg gcgvcgctttt gcggcggcgg cagcggcggc      780
ggcagcggca gctggtgga agaagtgatt aaactgtgcg gccvcgaact ggtgvcgvcg      840
cagattgcga tttgvcgcat gagcacctgg agc      873

```

<210> 4

5 <211> 876

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido que codifica el polipéptido de fusión scRelaxina IgG4 humana

10 <400> 4

```

ccgcccgtgcc cgagctgccc ggcgcccgaa tttctgggvcg gccvcagcgt gtttctgttt      60
ccgcccgaac cgaaagatac cctgatgatt agccvcaccc cggaaagtgc ctgvcgtggtg      120
gtggatgtga gccaggaaga tccggaagtg cagttaact ggtatgtgga tggcgtggaa      180
gtgcataacg cgaaaaccaa accgvcgcaa gaacagttta acagcaccta tvcgvcgtgvc      240
agcvcgtvcga ccgtgvcgca tcaggattgg ctgaacggca aagaatataa atgcaaaagt      300
agcaacaaag gcctgcccag cagcattgaa aaaaccatta gcaaagcga aggccagccc      360
cvcgaaccvc aggtgtatac cctgcccvcg agccaggaag aaatgaccaa aaaccaggtg      420
agcctgacct gcctggtgaa aggcctttat ccgagvcgata ttgvcggtgga atgggaaagc      480
aacggccagc cggaaaacaa ctataaaacc accccvcvcg tvcctgvcgtag cgcagvcagvc      540
tttttctgt atagcccvcct gaccvcgvcg aaaagcvcg gvcaggaagvc caacvcgtttt      600

```

ES 2 645 644 T3

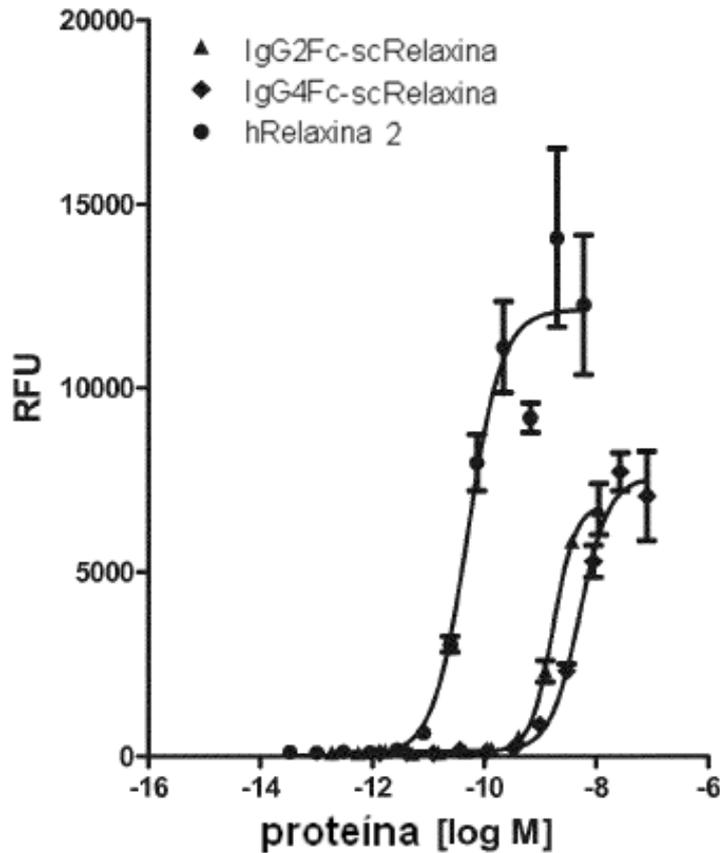
agctgcagcg	tgatgcatga	agcgctgcat	aaccattata	cccagaaaag	cctgagcctg	660
agcctgggca	aaggcggcag	cggcggcagc	ccgcagctgt	atagcgcgct	ggcgaacaaa	720
tgctgccatg	tgggctgcac	caaacgcagc	ctggcgcgct	tttgcggcgg	cggcagcggc	780
ggcggcagcg	gcagctggat	ggaagaagtg	attaaactgt	gcggccgcga	actggtgcgc	840
gcgcagattg	cgatttgccg	catgagcacc	tggagc			876

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fusión que tiene actividad de Relaxina que comprende en orden desde el amino terminal al carboxi terminal:
 - a. un dominio Fc de IgG4
 - b. una unidad extensora, y
 - c. el polipéptido de scRelaxina que tiene la secuencia de aminoácidos:

QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCGGGSGGGSGSWMEEVIKLCGRELVRAQIA
ICGMSTWS.
2. Un polipéptido de fusión que tiene actividad de Relaxina que comprende la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO2.
3. Un homodímero de un polipéptido de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.
4. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.
5. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula hospedadora que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 5 o un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.
7. Un procedimiento de producción de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un homodímero de acuerdo con la reivindicación 3 que comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 6 y aislar el polipéptido u homodímero.
8. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un homodímero de acuerdo con la reivindicación 3.
9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2 o un homodímero de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso como un medicamento.
10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, un polipéptido de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, o un homodímero de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso como medicamento para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, trastorno fibrótico o enfermedad renal.
11. La composición farmacéutica, el polipéptido de fusión o el homodímero para su uso como medicamento para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la enfermedad cardiovascular se selecciona del grupo de enfermedades que comprende enfermedad cardíaca coronaria, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio.
12. La composición farmacéutica, el polipéptido de fusión o el homodímero para su uso como medicamento para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la enfermedad de insuficiencia cardíaca se selecciona del grupo de enfermedades que comprende insuficiencia cardíaca con reducción de la fracción de eyección (HFrEF), insuficiencia cardíaca con fracción de eyección conservada (HFpEF), insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia ventricular derecha, insuficiencia ventricular izquierda, insuficiencia global, cardiomiopatía isquémica (ICM), cardiomiopatía dilatada (DCM), cardiomiopatía hipertrófica (HCM), y defectos cardíacos congénitos.

Figura 1:



	hRelaxina 2	IgG2Fc-scRelaxina	IgG4Fc-scRelaxina
IC50	5,103e-011	1,705e-009	5,090e-009

Figura 2:

VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
 MEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
 TKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSG
 GSPQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCGGSGGGSGSGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAI
CGMSTWS

Figura 3:

PPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGSG
 GSPQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFCGGSGGGSGSGSWMEEVIKLCGRELVRAQIAI
 CGMSTWS

Figura 4:

GTGGAATGCCCGCCGTGCCCGGCGCCCGCGGTGGCGGGCCCGAGCGTGTTTCTGT
TTCCGCCGAAACCGAAAGATACCCTGATGATTAGCCGCACCCCGGAAGTGACCTG
CGTGGTGGTGGATGTGAGCCATGAAGATCCGGAAGTGCAGTTTAACTGGTATGTG
GATGGCATGGAAGTGCATAACGCGAAAACCAAACCGCGCGAAGAACAGTTTAAAC
AGCACCTTTCGCGTGGTGGAGCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGATTGGCTGAACG
GCAAAGAATATAAATGCAAAGTGAGCAACAAAGGCCTGCCGGCGCCGATTGAAA
AAACCATTAGCAAACCAAAGGCCAGCCGCGCGAACCAGGTGTATACCCTGC
CGCCGAGCCGCGAAGAAATGACCAAAAACCAAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGA
AAGGCTTTTATCCGAGCGATATTGCGGTGGAATGGGAAAGCAACGGCCAGCCGG
AAAACAACATAAAAACCAACCCCGCCGATGCTGGATAGCGATGGCAGCTTTTTTCT
GTATAGCAAACCTGACCGTGGATAAAAGCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTAG
CTGCAGCGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTATAACCCAGAAAAGCCTGAGC
CTGAGCCCGGGCAAAGGCGGCAGCGGCGGCAGCCCGCAGCTGTATAGCGCGCTG
GCGAACAAATGCTGCCATGTGGGCTGCACCAAACGCAGCCTGGCGCGCTTTTGCG
GCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCAGCTGGATGGAAGAAGTGATTAACCTGT
GCGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTGGA
GC

Figura 5:

CCGCCGTGCCCGAGCTGCCCGGCGCCGGAATTTCTGGGCGGGCCCGAGCGTGTTTC
TGTTTCCGCCGAAACCGAAAGATACCCTGATGATTAGCCGCACCCCGGAAGTGAC
CTGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCAGGAAGATCCGGAAGTGCAGTTTAACTGGTAT
GTGGATGGCGTGGAAGTGCATAACGCGAAAACCAAACCGCGCGAAGAACAGTTT
AACAGCACCTATCGCGTGGTGGAGCGTGCTGACCGTGGTGCATCAGGATTGGCTGA
ACGGCAAAGAATATAAATGCAAAGTGAGCAACAAAGGCCTGCCGAGCAGCATTG
AAAAAACCATTAGCAAAGCGAAAGGCCAGCCGCGCGAACCAGGTGTATACCC
TGCCGCCGAGCCAGGAAGAAATGACCAAAAACCAAGGTGAGCCTGACCTGCCTGG
TGAAAGGCTTTTATCCGAGCGATATTGCGGTGGAATGGGAAAGCAACGGCCAGC
CGGAAAACAACATAAAAACCAACCCCGCCGGTGGTGGATAGCGATGGCAGCTTTTT
TCTGTATAGCCGCTGACCGTGGATAAAAGCCGCTGGCAGGAAGGCAACGTGTTT
AGCTGCAGCGTGATGCATGAAGCGCTGCATAACCATTATAACCCAGAAAAGCCTG
AGCCTGAGCCTGGGCAAAGGCGGCAGCGGCGGCAGCCCGCAGCTGTATAGCGCG
CTGGCGAACAAATGCTGCCATGTGGGCTGCACCAAACGCAGCCTGGCGCGCTTTT
GCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCAGCTGGATGGAAGAAGTGATTAAC
TGTGCGGCCGCGAACTGGTGC GCGCGCAGATTGCGATTTGCGGCATGAGCACCTG
GAGC

Figura 6:

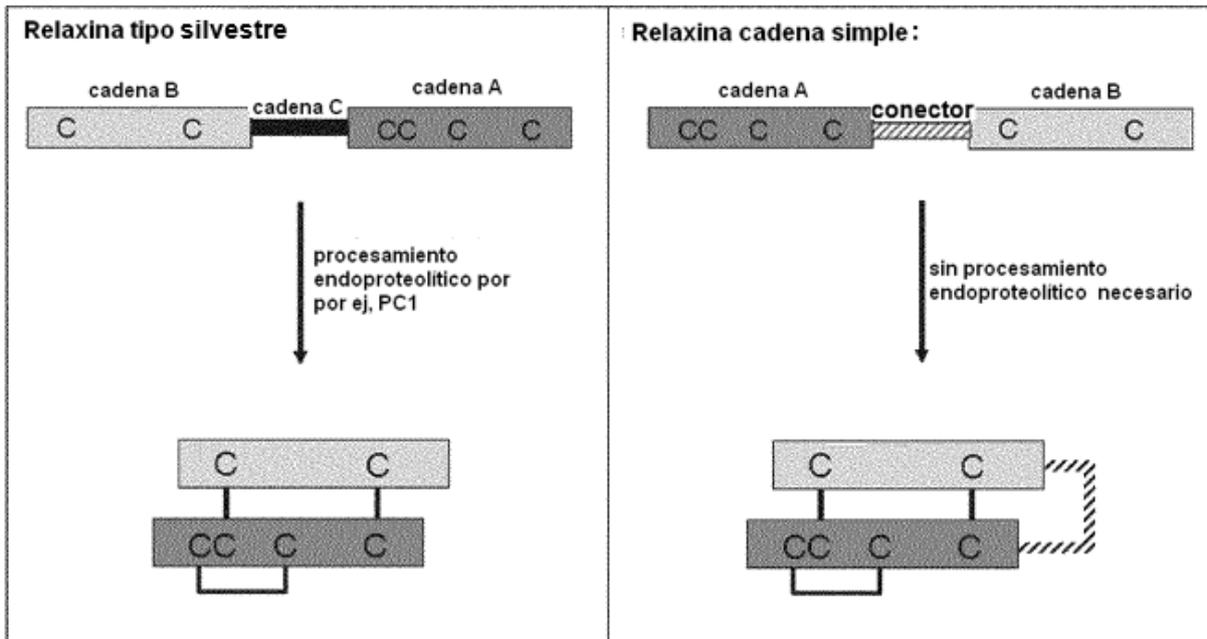


Figura 7:

