

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 174**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)

**A61K 38/48** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2008 E 16169069 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 3091075**

54 Título: **Proteínas de fusión de un dominio de enlazamiento a colágeno y hormona paratiroidea**

30 Prioridad:

**09.04.2007 US 922433 P**

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

**09.07.2018**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (33.3%)  
2404 N. University Avenue  
Little Rock, AR 72207, US;  
NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION  
KAGAWA UNIVERSITY (33.3%) y  
OCHSNER CLINIC FOUNDATION (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SAKON, JOSHUA;  
MATSUSHITA, OSAMU;  
GENSURE, ROBERT C. y  
PONNAPAKKAM, TULASI**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 675 174 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de un dominio de enlazamiento a colágeno y hormona paratiroidea

## 5 Antecedentes de la invención

10 La osteoporosis es una enfermedad ósea que se caracteriza por el adelgazamiento del tejido óseo y la pérdida de la densidad ósea con el tiempo. Es ampliamente prevalente en los ancianos. La Fundación Nacional de la Osteoporosis calcula que para el año 2020 casi 14 millones de estadounidenses sufrirán de osteoporosis. Unos 18 millones más pueden tener una masa ósea baja u osteopenia. La osteoporosis puede ocurrir ya sea debido a que el cuerpo no puede producir suficiente hueso nuevo o reabsorbe gran cantidad del hueso antiguo, o ambos.

15 La osteoporosis a menudo progresa sin dolor hasta que un hueso se rompe. Cualquier hueso puede verse afectado, pero una de las principales preocupaciones es la cadera. Una fractura de cadera afecta la capacidad de una persona para caminar y causa incapacidad prolongada y, a veces permanente.

20 La osteoporosis puede ser tratada con terapias anabólicas o terapias contra la reabsorción. Las terapias anabólicas forman hueso nuevo. Sin embargo, las terapias contra la reabsorción no lo hacen. En vez de eso, hacen más lenta la reabsorción del hueso existente. Un factor importante en el control de la remodelación ósea es la hormona paratiroidea (PTH). La PTH y sus análogos son la única clase de agentes terapéuticos anabólicos con eficacia clínica demostrada. La teriparatida es un agente terapéutico aprobado que es una versión abreviada de la PTH. Se compone de los 34 residuos de aminoácidos N-terminales de PTH madura (PTH (1-34)). La teriparatida se administra mediante inyección subcutánea una vez al día.

25 PTH es un péptido de 84 aminoácidos. Está implicado en la homeostasis de iones minerales. El aumento de la PTH moviliza el calcio del hueso en respuesta a las dietas deficientes en calcio o la insuficiencia de vitamina D. La PTH también afecta a los osteoblastos y las células estromales. Aunque el hiperparatiroidismo se asocia con la pérdida de masa ósea, la administración de PTH provoca ganancia de hueso. La PTH se une a los receptores en los osteoblastos, las células óseas especializadas que sintetizan hueso, y esto parece prolongar la vida de los osteoblastos y aumentar la actividad de los osteoblastos, causando ganancia de hueso.

30 El péptido relacionado con PTH (PTHrP) es una proteína de 141 aminoácidos que es homóloga a la PTH sobre sus primeros 13 aminoácidos pero diverge a partir de entonces (1-3). La PTH y PTHrP actúan a través de un receptor común de PTH/PTHrP.

35 Se necesitan nuevos tratamientos para la osteoporosis. Se requieren métodos mejorados para suministrar PTH, teriparatida, u otros agentes agonistas del receptor de PTH/PTHrP.

## 40 Resumen

Una realización divulgada en este documento implica composiciones o agentes bioactivos que comprenden un segmento de polipéptido de enlazamiento a colágeno enlazado a un agonista del receptor de PTH/PTHrP. Los inventores han construido proteínas de fusión que contienen residuos 1-33 de la PTH, un fragmento agonista activo de PTH, fusionadas a un dominio de enlazamiento a colágeno (CBD) de ColH, una colagenasa de *Clostridium histolyticum*. Los inventores han encontrado que la proteína de fusión es más activa que PTH (1-34) en la promoción de crecimiento de hueso *in vivo* en ratones, incluso cuando se administra sistémicamente. Con la administración local, por ejemplo, en un sitio de fractura, se espera que la diferencia en eficacia sea aún mayor. Los péptidos que son antagonistas del receptor de PTH/PTHrP también se pueden acoplar a un CBD para una bioactividad específica y mejorada.

50 También se presentan composiciones o agentes bioactivos que contienen un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno acoplado a un agonista o antagonista no peptídico del receptor de PTH PTHrP.

55 El colágeno es la proteína más abundante en mamíferos. Es el principal componente proteico del hueso y el cartílago. De este modo una proteína de fusión del agente bioactivo de CBD dirige el agente bioactivo al colágeno, y en general al hueso y al cartílago. Las proteínas de fusión CBD-PTH tienen vidas medias más largas que la PTH debido a su enlazamiento estable al colágeno, que tiende a retirarlas de la circulación. Se pueden administrar localmente, por ejemplo, en un sitio de fractura, y tenderán a permanecer en el sitio de administración durante el enlazamiento a colágeno en o cerca del sitio de administración. En apoyo de esta vida media más larga, se muestra un factor de crecimiento epidérmico (EGF) que contiene proteína de fusión con un CBD que tiene un tiempo de vida media mucho más largo que EGF solo (8). También se presentan datos en los Ejemplos 4 y 5 en el presente documento que muestran que una proteína de fusión PTH-CBD administrada en forma semanal o mensual es tan eficaz o más eficaz que la PTH (1-34) administrada diariamente.

65 Una realización proporciona una composición que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un agonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno bacteriano.

Una realización proporciona una composición que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un agonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es un segmento de una colagenasa.

5

Una realización proporciona una composición que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un agonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde, durante un período de 8 semanas, el aumento de la densidad mineral ósea de la composición inyectada con un vehículo por vía intraperitoneal semanalmente en un ratón en relación con el vehículo solo es al menos 50% mayor que el aumento de la densidad mineral ósea de una cantidad equimolar de una composición que consiste del agonista de PTH/PTHrP en relación con el vehículo solo.

10

Es decir, el agente bioactivo (composición) provoca un aumento en la densidad mineral ósea en ratones cuando se administra en una dosis adecuada en un vehículo, tal como una solución reguladora acuosa. Un tratamiento de control con el vehículo solo también puede dar lugar a algún cambio en la densidad mineral ósea, por ejemplo debido a que los ratones son jóvenes que aún están creciendo o ratones de edad avanzada cuya densidad mineral ósea está por el contrario declinando. La forma adecuada para medir el efecto del agente bioactivo es medir el aumento de la densidad mineral ósea en ratones experimentales tratados con el agente de menos (o disminución) en la densidad mineral ósea en los ratones de control tratados con vehículo solo. Este aumento en la densidad mineral ósea con la administración del agente después de la corrección por el cambio en la densidad mineral ósea en los ratones de control que recibieron el vehículo solo es al menos 50% mayor que el aumento de la densidad mineral ósea en los ratones tratados con un agente que contiene solamente el agonista del receptor de PTH/PTHrP (no acoplado a un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno), nuevamente después de corrección por cualquier cambio en la densidad mineral ósea en los ratones de control tratados con vehículo solo. Por ejemplo, en la FIG. 3 en este documento, se describe en el Ejemplo 4, los ratones de control de vehículo tienen un aumento en la densidad mineral ósea durante un período de tratamiento de 8 semanas del 5%, los ratones tratados con PTH (1-34) (un agonista de PTH/PTHrP) tienen un aumento en BMD de alrededor del 7,5%, y los ratones tratados con una proteína de fusión PTH-CBD que contiene PTH (1-33) acoplada a un dominio de enlazamiento a colágeno tienen un aumento de BMD de más del 15%. Los ratones tratados con la proteína de fusión PTH-CBD tienen por lo tanto un aumento de BMD después de la corrección por el cambio con el vehículo solo de más de 10% (más de 15% menos 5%), y los ratones tratados con PTH (1-34) tienen un aumento en BMD después de la corrección por el cambio con el vehículo solo de alrededor de 2,5% (alrededor de 7.5%, menos 5%). Por lo tanto, la inyección semanal intraperitoneal de la proteína de fusión causa más de 300% más (más de 4 veces como mucho, más del 10% versus 2,5%) de aumento en BMD que la inyección de la PTH (1-34).

15

20

25

30

Otra realización proporciona una proteína de fusión que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno bacteriano; enlazado a un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP.

35

Otra realización proporciona una proteína de fusión que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno de una colagenasa; enlazado a un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP.

40

Otra realización proporciona una proteína de fusión que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a un segmento de polipéptido antagonista del receptor de PTH/PTHrP.

Otra realización proporciona una composición que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a un agonista del receptor de PTH/PTHrP no peptidílico.

45

Otra realización proporciona una composición que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a un antagonista del receptor de PTH/PTHrP no peptidílico.

Otra realización proporciona una composición que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a un antagonista del receptor de PTH/PTHrP.

50

Otra realización proporciona un método para promover el crecimiento óseo en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un agonista del receptor de PTH/PTHrP.

55

Otra realización proporciona un método para promover el crecimiento óseo en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un agonista del receptor de PTH/PTHrP.

Otra realización proporciona un método para promover el crecimiento de pelo en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende: (i) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (ii) un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP.

60

Otra realización proporciona un método para promover el crecimiento de pelo en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende: (i) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (ii) un antagonista del receptor de PTH/PTHrP.

65

5 Otra realización proporciona un método para promover el crecimiento del tejido alrededor de un implante en un mamífero que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un agonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde antes, durante o después de la etapa de administrar la composición, el mamífero recibe un implante que se pone en contacto con el tejido en el mamífero; y en donde la etapa de administrar la composición es eficaz para promover el crecimiento del tejido alrededor del implante.

10 Otra realización proporciona un método de promoción de la reconstitución inmune en un mamífero que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un agonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde antes, durante o después de la etapa de administrar la composición, el mamífero recibe una administración de células madre de médula ósea. La composición mejora la reconstitución inmune mediante el mejoramiento del injerto, la multiplicación y/o diferenciación de las células madre de la médula ósea.

15 Otra realización proporciona un método para promover la movilización de células madre de médula ósea en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un agonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde la administración de la composición aumenta el número de células madre en la sangre circulante del mamífero (por ejemplo, 7, 14, o 30 días después de la administración de la proteína de fusión).

20 Otra realización proporciona un método para tratar o prevenir la osteodistrofia renal en un mamífero que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un antagonista del receptor PTH/PTHrP; en donde el mamífero está afectado con osteodistrofia renal o enfermedad renal y la composición es eficaz para reducir la pérdida ósea en el mamífero.

25 Otra realización proporciona un método para tratar o prevenir (es decir, reducir la incidencia de) la metástasis ósea del cáncer en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una composición que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un antagonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde la composición se administra en una dosis eficaz para reducir la incidencia de la metástasis ósea del cáncer o retardar el crecimiento del cáncer metastático en el hueso.

#### Breve descripción de los dibujos

35 La FIG. 1 es un gel de SDS-PAGE que muestra los resultados de un experimento que muestra que dos proteínas de fusión PTH-CBD se unen a colágeno.

40 La FIG. 2 es un gráfico que muestra la acumulación de AMPc *in vitro* en las células estimuladas con PTH (1-34) o proteínas de fusión PTH-CBD.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra el aumento de la densidad mineral ósea de la columna en los ratones tratados con una inyección intraperitoneal semanal durante 8 semanas de regulador (vehículo), PTH (1-34), proteína de fusión PTH-PKD-CBD, o proteína de fusión PTH-CBD.

45 La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra la densidad mineral ósea absoluta de la columna de segmentos de la columna extirpados de ratones sacrificados después del tratamiento durante 8 semanas con una inyección intraperitoneal semanal de regulador (vehículo), PTH (1-34), proteína de fusión PTH-PKD-CBD, o proteína de fusión PTH-CBD.

50 La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra los niveles de calcio en suero de los ratones después de 8 semanas de inyecciones semanales de regulador (vehículos), PTH (1-34), proteína de fusión PTH-PKD-CBD, o proteína de fusión PTH-CBD.

55 La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra la concentración de fosfatasa alcalina en suero de los ratones después de 8 semanas de inyecciones semanales de regulador (vehículos), PTH (1-34), proteína de fusión PTH-PKD-CBD, o proteína de fusión PTH-CBD.

60 La FIG. 7 es una micrografía de secciones de hueso de la tibia de un ratón de control tratado con vehículo y un ratón que recibió durante 8 semanas una inyección semanal de la proteína de fusión PTH-CBD. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina. La micrografía muestra un aumento de la masa ósea cortical y trabecular en el hueso del ratón tratado con PTH-CBD.

65 La FIG. 8 es gráfico de líneas de la densidad mineral ósea con el tiempo para los ratones tratados mensualmente con PTH-CBD, PTH (1-34), o control de vehículo durante 6 meses. A los 6 meses, el grupo que recibió PTH (1-34) fue tratado diariamente durante dos semanas (indicado por la flecha en el eje X). A continuación, todos los grupos dejaron de recibir tratamiento durante el resto del estudio.

La FIG. 9 es un gráfico de líneas de la densidad mineral ósea con el tiempo para los ratones tratados con PTH (1-34) diariamente durante 14 días (PTH), con la proteína de fusión PTH-CBD una vez al inicio del estudio (CBD-PTH-6), con la proteína de fusión PTH-CBD en el tiempo 0 y una segunda vez a los 3 meses (CBD-PTH-3), y con el control de vehículo.

La FIG. 10 es un gráfico de barras que muestra la concentración de fosfatasa alcalina en suero de los ratones después de 8 semanas de inyecciones semanales de regulador (vehículo), PTH (1-34), proteína de fusión PTH-PKD-CBD, o proteína de fusión PTH-CBD.

La FIG. 11 es un gráfico de barras de la densidad mineral ósea en los ratones que recibieron una dosis única de una gama de cantidades de dosificación de PTH-CBD por inyección subcutánea. La densidad mineral ósea fue seguida durante 32 semanas. Cada dosis fue administrada a dos ratones.

La FIG. 12 muestra fotografías de los ratones descritos en el Ejemplo 8 que tienen alopecia inducida por quimioterapia y un lugar afeitado en sus lomos, tratados con la proteína de fusión PTH-CBD mediante inyección subcutánea en el lugar sin pelo, o los controles no tratados. Hay 3 ratones en cada grupo, y las fotos se tomaron a los 0 días, 14 días, y 21 días después de la inyección de PTH-CBD. Las fotos muestran un mayor crecimiento de pelo en los sujetos tratados con la proteína de fusión PTH-CBD.

#### Descripción detallada

Esta divulgación implica composiciones, incluyendo agentes bioactivos y proteínas de fusión, que comprenden un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un agonista o antagonista del receptor de PTH/PTHrP. En una realización preferida, las composiciones son proteínas de fusión en donde el agonista o antagonista de PTH/PTHrP es un segmento de polipéptido, en donde el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno y el segmento de polipéptido de PTH/PTHrP están enlazados entre sí en una proteína de fusión. Sin embargo, la porción del agonista o antagonista de PTH/PTHrP también puede ser un agonista o antagonista no peptídico.

Los términos "proteína de fusión" y "polipéptido de fusión" se pueden utilizar para referirse a un único polipéptido que comprende dos segmentos funcionales, por ejemplo, un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno y un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP. Las proteínas de fusión pueden ser de cualquier tamaño, y el único polipéptido de la proteína de fusión pueden existir en una forma multimérica en su estado funcional, por ejemplo, mediante conexión con disulfuro de cisteína de dos monómeros del único polipéptido. Un segmento de polipéptido puede ser un polipéptido sintético o un polipéptido de origen natural. Tales polipéptidos pueden ser una porción de un polipéptido o pueden comprender una mutación.

El segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es un polipéptido que se enlaza a colágeno y puede ser parte de una proteína de fusión mayor, agente bioactivo, o agente farmacéutico. La determinación de si una composición, segmento de polipéptido, proteína de fusión, o agente bioactivo, o agente farmacéutico se enlaza a colágeno puede hacerse como se describe en el Ejemplo 2 a continuación. Brevemente, se incuba con colágeno en regulador de enlazamiento, y luego se filtra la mezcla a través de un filtro que permite su paso, pero que bloquea el colágeno y por lo tanto retiene los materiales que se enlazan al colágeno. Se analiza luego el filtrado para detectar la presencia en la composición del segmento de polipéptido, la proteína de fusión o el agente farmacéutico o bioactivo. Preferiblemente, al menos 90%, más preferiblemente al menos 99% de la composición que se enlaza a colágeno, el segmento de polipéptido, la proteína de fusión o el agente farmacéutico o bioactivo es retenido por el filtro en este ensayo, en comparación con cuando la filtración se realiza sin colágeno.

Una forma de realización divulgada en este documento implica proteínas de fusión que comprenden un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP.

El segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP puede ser un polipéptido sintético o un polipéptido de origen natural. Tales polipéptidos pueden ser una porción de un polipéptido o pueden comprender una mutación. La actividad agonista con el receptor de PTH/PTHrP puede analizarse como se describe en el Ejemplo 3 a continuación mediante un ensayo de estimulación del AMPc. Un agonista estimulará la síntesis de AMPc. Preferiblemente, un agonista puede activar la actividad del receptor al menos 10% tanto como PTH (1-34).

En una realización específica cuando se inyecta por vía intraperitoneal semanalmente en ratones la proteína de fusión agonista causa por lo menos 50% más de aumento de la densidad mineral ósea (en comparación con el control de vehículo) que una cantidad equimolar de un polipéptido que consiste del segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP cuando se inyecta por vía intraperitoneal semanalmente (en comparación con el control de vehículo) durante un período de 8 semanas (como en el Ejemplo 4 a continuación). Así mismo, en otras formas de realización específicas, la proteína de fusión provoca un incremento estadísticamente significativo mayor ( $p < 0,05$ ) en BMD, o al menos el doble de aumento en BMD, que una cantidad equimolar de un polipéptido que consiste del segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP o que PTH (1-34).

- 5 En algunas realizaciones de las proteínas de fusión, el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno bacteriano. En una realización más específica, es un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno de *Clostridium*.
- 10 En algunas realizaciones de las proteínas de fusión, el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es un segmento de una colagenasa, o una colagenasa bacteriana, o una colagenasa de *Clostridium*. Preferiblemente, el segmento es sólo una porción de la colagenasa y el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno no tiene actividad de colagenasa.
- 15 En algunas realizaciones, la colagenasa es ColH, SEQ ID NO: 6.
- En algunas realizaciones, el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es o incluye los residuos 901-1021 de la SEQ ID NO: 6 (residuos 38-158 de SEQ ID NO: 1), o un fragmento de los residuos 38-158 de SEQ ID NO: 1 de al menos 8 residuos de aminoácidos de longitud.
- 20 En algunas realizaciones, el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es de al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 98%, o al menos 99% idéntico a los residuos 38-158 de la SEQ ID NO: 1.
- En algunas realizaciones, el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es o incluye los residuos 807-1021 de la SEQ ID NO: 6 (residuos 37-251 de la SEQ ID NO: 2).
- 25 En realizaciones específicas, el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno es o comprende un fragmento de los residuos 901-1021 de SEQ ID NO: 6, por ejemplo, un fragmento de al menos 8, al menos 10, al menos 20, al menos 30 al menos 40 , o al menos 50 residuos de aminoácidos consecutivos de los residuos 901-1021 de SEQ ID NO: 6.
- Entre otras proteínas el segmento que se enlaza a colágeno puede derivarse de ColG (5), una colagenasa de clase I de *Clostridium histolyticum* . ColH es una colagenasa de clase II (6).
- 30 El segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno puede ser también un segmento de polipéptido de sialoproteína ósea, fibronectina, o el factor de von Willebrand, como se describe en las referencias (30-33), o puede ser ácido poliglutámico (34).
- 35 En realizaciones específicas, el segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP es un segmento de polipéptido de PTH o PTHrP. Una isoforma humana de PTH es la SEQ ID NO: 7. Una isoforma humana de PTHrP es la SEQ ID NO: 8.
- 40 En realizaciones específicas, el segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP es o incluye los residuos 1-33 de la SEQ ID NO: 1 (residuos 1-33 de PTH (SEQ ID NO: 7)).
- En realizaciones específicas, el segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP es o incluye los residuos 1-34 de la PTH (SEQ ID NO: 7). En otras realizaciones, es un fragmento de los residuos 1-34 de la PTH (SEQ ID NO: 7).
- 45 En realizaciones específicas, el segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP es o incluye los residuos 1-84 de la PTH (SEQ ID NO: 7).
- 50 En realizaciones específicas, el segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP es o incluye los residuos 1-14 de la PTH (SEQ ID NO: 7).
- En realizaciones específicas, el agonista del receptor de PTH/PTHrP es un segmento de polipéptido de PTH o PTHrP.
- 55 En una realización, el segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP es N-terminal para el segmento del polipéptido que se enlaza a colágeno en la proteína de fusión. Es decir, los dos segmentos de polipéptido tienen cada uno un N-terminal y un C-terminal, y el N-terminal del segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno se enlaza directamente o a través de un segmento de polipéptido enlazador al C-terminal del segmento de polipéptido agonista PTH/PTHrP.
- 60 Los dos segmentos de polipéptidos de las proteínas de fusión se pueden enlazar directa o indirectamente. Por ejemplo, los dos segmentos se pueden enlazar directamente a través de, por ejemplo, un enlace peptídico o entrelazamiento química, o indirectamente, a través, por ejemplo, de un segmento enlazador o polipéptido enlazador.
- 65 Esta divulgación también proporciona una proteína de fusión que comprende un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un segmento de polipéptido antagonista del receptor de PTH/PTHrP.
- El segmento polipéptido antagonista del receptor de PTH/PTHrP puede ser un polipéptido sintético o un polipéptido de

origen natural. Tales polipéptidos pueden ser una porción de un polipéptido o pueden comprender una mutación. La actividad antagonista con el receptor de PTH/PTHrP puede ser analizada como se describe en el Ejemplo 3 más adelante por medio de un ensayo de estimulación de AMPc. Un antagonista inhibirá la estimulación de la síntesis de AMPc por PTH (1-34). Preferiblemente, cuando se mezcla con PTH (1-34), el antagonista puede inhibir la activación del receptor por PTH (1-34) en al menos un 50%. Por el contrario, cuando no se mezcla con PTH, el antagonista activa el receptor en al menos 5% de la activación máxima del receptor por PTH (1-34).

En las proteínas de fusión que contienen un antagonista del receptor de PTH/PTHrP, el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno pueden ser los mismos segmentos que se encuentran en las fusiones que contienen un agonista del receptor de PTH/PTHrP.

En algunas realizaciones, el antagonista del receptor de PTH/PTHrP es un segmento del polipéptido PTH o PTHrP.

El antagonista del receptor de PTH/PTHrP puede incluir en una realización PTH (7-34), es decir, los residuos 7-34 de PTH (SEQ ID NO: 7). En otra realización, es o incluye los residuos 7-33 de PTH (SEQ ID NO: 7). En otras realizaciones, es un fragmento de los residuos 7-34 de SEQ ID NO: 8.

En otra realización, el antagonista del receptor de PTH/PTHrP incluye PTH (7-14), es decir, los residuos 7-14 de PTH (SEQ ID NO: 7).

En otra realización, los antagonistas del receptor de PTH/PTHrP pueden incluir los residuos 1-14 de PTH con una extensión N-terminal. La adición de una extensión N-terminal a PTH o fragmentos N-terminales activos de PTH convierten a los péptidos PTH en antagonistas. La extensión de N-terminal puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, o más aminoácidos de longitud. La identidad de los aminoácidos en la extensión del N-terminal no es típicamente importante. En otra realización, el antagonista del receptor de PTH/PTHrP incluye los residuos 1-33 de PTH con una extensión de Gly-Ser en el N-terminal (SEQ ID NO: 11).

En otra realización, el antagonista del receptor de PTH/PTHrP incluye PTHrP (7-34), es decir, los residuos 7-34 de la SEQ ID NO: 8, o un fragmento de residuos 7-34 de SEQ ID NO: 8.

En otra realización, el antagonista del receptor de PTH/PTHrP incluye TIP (7-39) de ratón (referencia 18). Otros antagonistas del receptor de PTH/PTHrP que pueden ser utilizados en las proteínas de fusión también se divulgan en la referencia (18).

En una realización, el segmento del polipéptido antagonista del receptor PTH/PTHrP es N-terminal al segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno en la proteína de fusión antagonista. Es decir, los dos segmentos de polipéptido tienen cada uno un N-terminal y un C-terminal, y el N-terminal del segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno se enlaza directamente o a través de un segmento de polipéptido enlazador al C-terminal del segmento de polipéptido antagonista de la PTH/PTHrP.

Como con el agonista, los dos segmentos de polipéptido de las proteínas de fusión antagonistas pueden enlazarse directa o indirectamente.

Esta divulgación también proporciona un método para promover el crecimiento óseo en un mamífero que implica la administración al mamífero de una proteína de fusión que comprende un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un segmento de polipéptido agonista de PTH/PTHrP.

En realizaciones particulares, la administración de la proteína de fusión al mamífero aumenta el volumen de mineral óseo trabecular y/o la densidad mineral ósea trabecular o retarda la pérdida de volumen de mineral óseo trabecular y/o la densidad de mineral óseo trabecular.

En realizaciones particulares, la administración de la proteína de fusión al mamífero aumenta el volumen de mineral de óseo cortical y/o la densidad del mineral óseo cortical o retarda la pérdida de volumen de mineral óseo cortical y/o densidad de mineral óseo cortical.

El volumen de mineral óseo es visible a partir de la tinción histológica de las láminas portaobjetos. El término "volumen de mineral óseo", como se usa aquí, se refiere al volumen ocupado por el hueso mineralizado. "La densidad de mineral óseo", como se usa aquí se refiere a la densidad del hueso aéreo, es decir, la cantidad de mineral óseo por unidad de área bidimensional de hueso. Se puede medir mediante rayos X, o DEXA (Ejemplo 4 más adelante).

Los inventores han encontrado que la proteína de fusión PTH-CBD aumenta tanto el volumen mineral óseo como la densidad mineral ósea tanto del hueso trabecular como cortical. El efecto sobre el hueso cortical es sorprendente, debido a que PTH (1-34) ha demostrado tener poco efecto sobre la densidad mineral ósea cortical o incluso disminuir la densidad mineral ósea cortical, incluso a medida que aumenta la densidad mineral ósea trabecular (25-27).

La proteína de fusión se puede administrar sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa. Los

- inventores han encontrado que cuando se administra la proteína de fusión en forma subcutánea se enlaza localmente en el sitio de la inyección, si la proteína de fusión se disuelve en regulador de pH neutro. Pero, si la proteína de fusión se disuelve en pH 4.5 o en regulador con pH inferior, el dominio que se enlaza a colágeno no enlaza colágeno, y la proteína de fusión tiene tiempo para dispersarse sistémicamente antes de enlazar al colágeno en otras partes del cuerpo a pH neutro. Por lo tanto, en una realización, la administración sistémica de las proteínas de fusión implica la administración de la proteína de fusión disuelta en regulador o solución acuosa a un pH inferior a aproximadamente a 5.0 o un pH de 4.5 o inferior. En otra realización, la administración sistémica de las proteínas de fusión implica la administración de las proteínas de fusión disueltas en solución acuosa a pH inferior aproximadamente a 6.0.
- 5
- 10 En realizaciones particulares, la proteína de fusión se administra mediante inyección, por ejemplo, inyección intravenosa o subcutánea o intraperitoneal. La administración mediante inyección puede ser administración sistémica o administración local.
- 15 En realizaciones particulares, la proteína de fusión es administrada en un implante ortopédico. Los ejemplos de implantes ortopédicos en los cuales se puede administrar la proteína de fusión incluyen un relleno ortopédico de huesos del hueso, un adjunto para la estabilización de la fractura ósea, un dispositivo de fijación intramedular, un dispositivo de aumento/reemplazo de la articulación, una placa de fijación ósea, un tornillo, una tachuela, un clip, una grapa, un clavo, un perno, una barra, un ancla, un dispositivo de aumento de tornillo, o un dispositivo de reconstrucción craneal. Otro ejemplo de un implante ortopédico es un implante dental. Los ejemplos de implantes dentales incluyen un reemplazo artificial de la raíz del diente, puentes y prótesis sobre implantes. Otros ejemplos serán conocidos por los expertos en la técnica.
- 20
- 25 Para ser administrado en un implante, como se usa aquí, significa que la proteína de fusión puede estar asociada con el implante, mediante, por ejemplo, por adhesión, unión covalente o no covalente a la superficie del implante, atrapamiento en los poros de una capa de polímero de un implante, o mezcla con un componente del implante, tal como partículas cerámicas. Si las partículas cerámicas son porosas, la proteína de fusión puede ser atrapada en los poros. Por "atrapada en los poros" se entiende que la difusión de la proteína de fusión fuera del material se reduce debido a la estructura del poro, no necesariamente que la proteína de fusión no pueda difundirse fuera del material hasta que el material se rompa.
- 30
- 35 Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser atrapada en un polímero biodegradable como se describe en la Patente estadounidense No. 7.060.299. Se puede formar en partículas con una goma de polisacárido, y luego se atrapan las partículas en una matriz de un polímero como se describe en la Patente estadounidense No. 7.060.299. El polímero puede ser formado como un recubrimiento sobre la superficie de un implante.
- 40 La proteína de fusión también se puede unir a una superficie tal como el oro en un implante a través de sulfhidrilos de la proteína, como se describe en la Patente estadounidense No. 6.428.579.
- 45 La proteína de fusión se puede mezclar con un material cerámico o con partículas cerámicas, incluyendo por ejemplo hidroxiapatita o fosfato tricálcico, ambos de los cuales se utilizan a menudo como material de relleno para remodelación ósea (Solicitud de Patente Publicada de los Estados Unidos No. 20030091609).
- 50 Un polímero poroso puede formarse mediante la formación del polímero en un disolvente orgánico con partículas de un material que no es soluble en el disolvente orgánico, tal como cristales de sal o de azúcar. Después de que se cura el polímero, se pueden remover las partículas para exponer los poros abiertos mediante el lavado de la matriz polimérica en una solución acuosa que solubiliza las partículas de sal o de azúcar. La incubación de la matriz polimérica con una solución de la proteína de fusión puede permitir que la proteína de fusión se difunda dentro de los poros del polímero y quede atrapada allí (Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos No. 20030091609).
- 55 Otros métodos de adhesión de proteínas a una superficie de un material se divulgan en la Patente estadounidense No. 6.617.142. Incluso otros métodos se encuentran disponibles para los expertos en la técnica.
- 60 La proteína de fusión se puede mezclar con una matriz ósea desmineralizada (DBM). Las matrices óseas desmineralizadas se preparan mediante extracción ácida de un hueso de aloinjerto, lo que resulta en la pérdida de la mayoría del componente mineralizado pero la retención de proteínas de colágeno y no colagenosas, incluyendo factores de crecimiento. La DBM se utiliza como un sustituto o extensor de injerto óseo. Ya que la DBM contiene grandes cantidades de colágeno, las proteínas de fusión se unirán al colágeno de la DBM si se mezclan con DBM en regulador de unión.
- 65 En realizaciones particulares, el implante ortopédico incluye hidroxiapatita, fosfato tricálcico, o una matriz ósea desmineralizada. En otras realizaciones, el implante ortopédico incluye un polímero. Muchos polímeros naturales y sintéticos pueden ser incluidos en un implante ortopédico (por ejemplo, como un revestimiento). Ejemplos de polímeros porosos naturales incluyen gelatina, fibrina, colágeno, elastina, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparina, heparina, celulosa, quitina, quitosano, mezclas o copolímeros de los mismos, o una amplia variedad de otros típicamente divulgados como útiles en dispositivos médicos implantables. Ejemplos de polímeros porosos sintéticos incluyen silicona, poliuretano, polisulfona, polietileno, polipropileno, poliamida, poliéster,

5 ácidos policarboxílicos, polivinilpirrolidona (PVP), polímeros de anhídrido maleico, poliamidas, alcoholes de polivinilo (PVA), óxidos de polietileno, polímeros de ácido poliacrílico, politetrafluoroetileno, ácido polihidroxietilmetacrílico (pHEMA), poliaminopropilmetacrilamida (por pAPMA), ácido poliacrilamido-2-metilpropanosulfónico (pAMPS), poliacrilamida, ácido poliacrílico, mezclas o copolímeros de los mismos, o una amplia variedad de otros típicamente divulgados como útiles en dispositivos médicos implantables. Ejemplos adicionales de polímeros porosos sintéticos incluyen polímeros porosos sintéticos biodegradables, tales como ácido poliglicólico, ácido poliláctico, polidioxanona, poli(-caprolactona), polianhídridos, poli(3-hidroxibutirato), poli(orto-ésteres), poli(aminoácidos), poliiminocarbonatos, y mezclas o copolímeros de los mismos.

10 Por lo tanto, otra realización proporciona un método para promover el crecimiento del tejido alrededor de un implante en un mamífero que comprende: administrar al mamífero una proteína de fusión que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP. Antes, durante, o después de la etapa de administración de la proteína de fusión, el mamífero recibe un implante puesto en contacto con el tejido en el mamífero; y la etapa de administrar la proteína de fusión es eficaz para promover el crecimiento del tejido alrededor del implante. El crecimiento de tejido promovido alrededor del implante puede ser hueso, cartílago, u otro tejido. En una realización, puede ser piel.

15 En una realización particular, la etapa de administrar la proteína de fusión comprende colocar un implante en contacto con el tejido en el mamífero, en donde el implante comprende la proteína de fusión.

20 En una realización particular, el implante es un implante dental.

En una realización particular, el implante es un injerto de hueso.

25 En otras realizaciones, el implante es un relleno ortopédico para los huecos del hueso, un adjunto para la estabilización de la fractura ósea, un dispositivo de fijación intramedular, un dispositivo de aumento/reemplazo de articulación, una placa de fijación para huesos, un tornillo, una tachuela, un clip, una grapa, un clavo, un perno, una barra, un ancla, un dispositivo de aumento de tornillo, o un dispositivo de reconstrucción craneal.

30 En realizaciones específicas, el implante comprende hueso intacto. Aquí, en una realización, se incubó el implante con la proteína de fusión durante un tiempo suficiente para permitir que la proteína de fusión se una a colágeno en el hueso intacto antes de implantar el implante en el mamífero.

35 En realizaciones específicas, el implante comprende cemento óseo, hidroxiapatita, o hueso desmineralizado.

En realizaciones específicas, el implante comprende osteoblastos.

40 En realizaciones específicas, el implante es predominantemente de plástico, metal, o cerámica (es decir, la mayoría de su masa es de material plástico, metal, o cerámico).

Otra realización proporciona un método para la promoción del crecimiento de pelo en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una proteína de fusión que comprende: un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP.

45 Se ha encontrado que las proteínas de fusión que contienen los agonistas del receptor eran más eficaces que aquellas que contienen antagonistas del receptor en la promoción del crecimiento de pelo en ratones tratados con ciclofosfamida para inducir la alopecia inducida por quimioterapia (Ejemplo 8 más adelante). Una proteína de fusión que contiene un antagonista del receptor de PTH/PTHrP también fue analizada y también indujo algún crecimiento de pelo, pero el pelo que creció parece menos grueso (datos no mostrados). Por lo tanto, las proteínas de fusión que contienen ya sea un agonista o un antagonista del receptor de PTH/PTHrP se pueden utilizar para promover el crecimiento de pelo, pero se prefieren las proteínas de fusión que contienen un agonista del receptor para la alopecia inducida por quimioterapia.

50 Para promover el crecimiento de pelo, se pueden administrar localmente las proteínas de fusión en un sitio deseado del crecimiento del pelo, por ejemplo, por inyección subcutánea o intradérmica. Las proteínas de fusión se unen a colágeno en la piel cerca del sitio de la inyección subcutánea o intradérmica y seguirán enlazadas en el sitio para un efecto de larga duración. Las proteínas de fusión también se pueden administrar sistémicamente para promover el crecimiento del pelo. Esto se prefiere para el tratamiento de alopecia inducida por quimioterapia.

55 En una realización del método para promover el crecimiento del cabello, el mamífero está afectado con alopecia inducida por quimioterapia.

60 Otra realización proporciona un método para la promoción de la reconstitución inmune en un mamífero que comprende: administrar al mamífero una proteína de fusión que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde antes, durante o después de la administración de la proteína de fusión, el mamífero recibe una administración de células madre de médula ósea. Tal como se utiliza aquí, el término "células madre de médula ósea" puede referirse a cualesquiera células

madre que pueden implantarse en la médula ósea y se diferencian en una variedad de tipos de linfocitos. Por lo tanto, las células madre se pueden obtener, por ejemplo, de la sangre del cordón umbilical, los embriones, la propia sangre o la médula ósea del mamífero, o de la sangre o la médula ósea de otro mamífero. Se espera que la administración de la proteína de fusión muestre un aumento en la supervivencia después de la ablación de la médula ósea y un trasplante de células madre en ratones. También se espera que aumente la tasa del número de neutrófilos, es decir, el número de neutrófilos son mayores en puntos de tiempo específicos (por ejemplo, 7, 14, 21, o 30 días) después del trasplante en pacientes o en animales experimentales que reciben la proteína de fusión en combinación con el trasplante de células madre que en un grupo de comparación que no recibe la proteína de fusión.

En una realización, las células madre serán células madre de la sangre del cordón umbilical. La sangre del cordón umbilical es una alternativa especialmente útil para los pacientes que necesitan un trasplante de células madre que no tienen un donante emparentado o no emparentado que coincide en el MHC. Pero el número de células madre en una sola unidad de sangre de cordón umbilical es a menudo insuficiente para el injerto exitoso después de un trasplante de células madre de médula ósea (10). Se espera que la administración de la proteína de fusión divulgada en este documento que contiene un agonista del receptor de PTH/PTHrP mejore el injerto de las células madre y aumente las probabilidades de éxito de un injerto con una o dos unidades de sangre de cordón umbilical.

En otra realización, las células madre serán células madre de sangre autóloga. A menudo muy pocas células madre se movilizan de un paciente para soportar el trasplante autólogo de células madre. La administración de la proteína de fusión se espera que mejore la probabilidad de éxito del injerto cuando el número de células madre trasplantadas es menos que óptimo. También se espera que mejore la probabilidad de éxito del injerto cuando el número de células madre trasplantada se considera adecuada.

Preferiblemente, la proteína de fusión se administra antes o junto con la administración de las células madre para promover el injerto de las células madre en la médula ósea. Pero también se puede administrar después de la administración de las células madre.

Otra realización proporciona un método para la promoción de la movilización de células madre de médula ósea en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una proteína de fusión que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP. Se espera que la administración de la proteína de fusión aumente el número de células madre en la sangre circulante del mamífero (por ejemplo, 7, 14, o 30 días después de administrar la proteína de fusión). En una realización específica, este método comprende además la recolección de células madre de la sangre del mamífero después de la etapa de administrar la proteína de fusión al mamífero.

El trasplante autólogo de células madre cura linfomas en muchos pacientes y mejora la supervivencia en el mieloma múltiple. Sin embargo, aproximadamente el 20% de los pacientes no moviliza las células madre suficientes para apoyar con seguridad el trasplante autólogo de células madre (11). Se espera que la proteína de fusión descrita en este documento que contiene un agonista del receptor de PTH/PTHrP promueva la movilización de células madre.

Se espera que otra realización proporcione un método para el tratamiento de infarto de miocardio en un mamífero que comprende: administrar a un mamífero después de que el mamífero sufre un infarto de miocardio una proteína de fusión que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP.

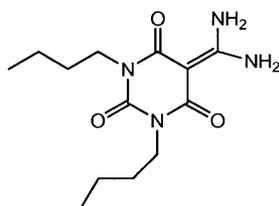
Otra realización proporciona un método para el tratamiento o prevención de osteodistrofia renal en un mamífero que comprende: administrar al mamífero una proteína de fusión que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un segmento de polipéptido antagonista del receptor de PTH/PTHrP; en donde el mamífero está afectado con osteodistrofia renal o enfermedad renal. En esta realización, se espera que la proteína de fusión sea eficaz para reducir la pérdida ósea en el mamífero.

Se espera que otra realización proporcione un método para el tratamiento o reducción de la incidencia de metástasis ósea del cáncer en un mamífero, que comprende: administrar al mamífero una proteína de fusión que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un segmento de polipéptido antagonista del receptor de PTH/PTHrP.

PTHrP se asocia positivamente con metástasis ósea (15, 16, 17). El carcinoma de mama metastásico al hueso expresa PTHrP en más del 90% de los casos, frente al 17% en las metástasis a sitios no óseos (15). En un modelo de ratón, las células tumorales humanas transfectadas con un ADNc para sobreexpresar PTHrP humano habían aumentado la metástasis al hueso (15). Por el contrario, la administración de un anticuerpo anti-PTHrP disminuyó las metástasis óseas (15, 17).

La unión de PTHrP a su receptor altera el microambiente de la médula en forma favorable para promover la metástasis. Una proteína de fusión que contiene un segmento de CBD y un antagonista del receptor de PTH/PTHrP probablemente ocupará el receptor en el hueso y por lo tanto disminuye la aparición de metástasis. Se prevé una desaceleración del crecimiento de los tumores metastásicos en el hueso.

En todas las realizaciones descritas aquí, las proteínas de fusión que comprenden (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a (b) un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP puede ser reemplazado por agentes farmacéuticos que comprenden (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a (b) un agonista del receptor de PTH/PTHrP o un agonista del receptor de PTH/PTHrP no peptídico. Un ejemplo de un agonista del receptor de PTH/PTHrP no peptídico es el compuesto AH3960 (19).

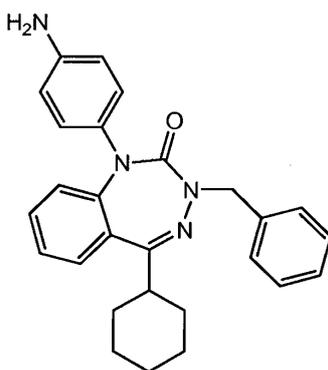


AH3960

AH3960 contiene dos grupos amino. Éstos se pueden utilizar para entrelazar el compuesto a los grupos amino en el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno a través de un agente de entrelazamiento tal como DSG (glutarato de disuccinimidilo) o a través de la combinación de SANH (succinimidil-4-hidrazinonicotinato acetona hidrazona) y SFB (benzoato de succinimidil-4-formilo). AH3960 puede ser entrelazado a través de su grupo amino a un grupo carboxilo del segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno mediante EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida). Estos productos están disponibles a través de Pierce (piercenet.com, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Los protocolos y condiciones de reacción también están disponibles en la literatura del producto de Pierce (piercenet.com).

Del mismo modo, en las realizaciones descritas aquí que involucran las proteínas de fusión antagonistas del receptor, proteínas de fusión que comprenden (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a (b) un segmento de polipéptido antagonista del receptor de PTH/PTHrP puede ser reemplazado por agentes farmacéuticos que comprenden (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a (b) un antagonista del receptor de PTH/PTHrP o de un antagonista del receptor de PTH/PTHrP no peptídico.

Por lo tanto, otra realización proporciona un agente farmacéutico que comprende: (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a (b) un antagonista del receptor de PTH/PTHrP, en donde el antagonista puede ser no peptídico. Los antagonistas no peptídicos del receptor de PTH/PTHrP incluyen compuestos divulgados en (20), incluyendo el compuesto 2 a continuación:



2

El compuesto 2 se puede acoplar a través de su grupo amino a grupos amino o carboxilo del segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno como se describió anteriormente para el compuesto AH3960. En el compuesto 3 de referencia (20), el grupo amino del compuesto 2 se reemplaza con un grupo carboxilo. Este se puede acoplar a grupos amino del segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno con EDC.

En otra realización de los agentes farmacéuticos que comprenden (a) un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno; enlazado a (b) un segmento de polipéptido agonista o segmento de polipéptido antagonista del receptor de PTH/PTHrP, el segmento (a) y el segmento (b) son polipéptidos separados, y los dos polipéptidos están enlazados por entrelazamiento químico. Los dos polipéptidos pueden ser entrelazados a través de grupos amino por reactivos que incluyen DSG (glutarato de disuccinimidilo) o glutaraldehído. También se pueden entrelazar a través de grupos amino por formación de derivados de un polipéptido con SANH (succinimidil-4-hidrazinonicotinato acetona hidrazona) y el otro con SFB (benzoato de succinimidil-4-formilo), y después se mezclan los dos polipéptidos que formaron derivados para entrelazamiento. Los dos polipéptidos se pueden entrelazar entre un grupo amino de un polipéptido y un carboxilo del

otro por reacción con EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida). Los polipéptidos también se pueden entrelazar (por ejemplo, acoplados covalentemente) por cualquier otro método adecuado conocido por una persona ordinariamente capacitada en la técnica. Estos reactivos de entrelazamiento están disponibles a través de Pierce (piercenet.com, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL). Los protocolos y condiciones de reacción también están disponibles en la literatura del producto de Pierce (piercenet.com). Estos y otros métodos de entrelazamiento aplicables se describen en Solicitudes de Patente estadounidenses publicadas Nos. 20060258569 y 20070224119.

Con base en los datos suministrados en este documento, las dosis individuales de los agentes farmacéuticos que comprenden un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP pueden ser aproximadamente las mismas en una base molar como las dosis utilizadas para PTH (1-34). Sin embargo, los agentes farmacéuticos que comprenden un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno enlazado a un segmento de polipéptido agonista del receptor de PTH/PTHrP se pueden administrar con menos frecuencia, ya que el enlazamiento del agonista al segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno produce una actividad mucho más prolongada *in vivo*.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar diversos aspectos de la divulgación sin limitar el alcance de la misma.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

Expresión de las proteínas de fusión de dominio que se enlaza a colágeno-PTH

Se construyó un plásmido que expresa una proteína de fusión PTH-CBD insertando la secuencia codificadora de PTH-CBD en pGEX-5X-1 (GE Lifesciences). La secuencia del plásmido resultante es la SEQ ID NO: 3. Los nucleótidos 258 a 1409 de la SEQ ID NO: 3 codifican una proteína de fusión que contiene glutatión S-transferasa (GST) fusionada en su extremo C terminal a una proteína de fusión PTH-CBD. La SEQ ID NO: 4 es la proteína de fusión GST-PTH-CBD completamente codificada. Los residuos 222-225 son IEGR (SEQ ID NO: 5), un sitio de reconocimiento del factor Xa de proteasa. Los residuos 226-383 de la SEQ ID NO: 4 corresponden a la SEQ ID NO: 1 y son la proteína de fusión PTH-CBD. El factor Xa escinde después de la Arg que es el residuo de aminoácido 225 de la SEQ ID NO: 4 para liberar la SEQ ID NO: 1, la proteína de fusión PTH-CBD. Los residuos 1-33 de la SEQ ID NO: 1 son los 33 residuos N-terminales de PTH. Los residuos 38-158 son un dominio de enlazamiento a colágeno (CBD) de la ColH colagenasa de *Clostridium histolyticum*. El CBD de la proteína de fusión corresponde a los residuos 901-1021 de ColH (SEQ ID NO: 6). Los residuos 34-37 de la SEQ ID NO: 1 son un segmento enlazador.

Una segunda proteína de fusión PTH-CBD, PTH-PKD-CBD (SEQ ID NO: 2), se expresó a partir del un plásmido por lo demás idéntico a la SEQ ID NO: 3 con un segmento de inserción más largo del gen colH que la expresa. Al igual que la SEQ ID NO: 1, se expresó como parte de una proteína de fusión GST y escindida de GST por el Factor Xa. Los residuos 1-33 de la SEQ ID NO: 2 son los 33 residuos N-terminales de PTH. Los residuos 34-36 son un segmento enlazador. Y los residuos 37-251 son los residuos 807-1021 de ColH. Esta proteína de fusión incluye un dominio de la enfermedad renal poliquística (PKD) de ColH (residuos 807-900 de ColH), además del dominio de enlazamiento a colágeno de los residuos 901 a 1021 de ColH encontrado tanto en la SEQ ID NO: 1 como en la SEQ ID NO: 2. Se pensaba que la inclusión del dominio PKD podría minimizar las interferencias dominio-dominio u otros impedimentos estéricos entre el dominio de la PTH y el dominio CBD.

Purificación de proteína de fusión CBD - Se transformó *E. coli* BL21 con los plásmidos recombinantes. Cada clon se cultivó en un litro de medio 2YT-G hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.7. Se añadió isopropil-1-tio-beta-D-galactopiranosido hasta una concentración final de 0.1 mM, y se cultivaron las células durante otras 2 horas. Con el fin de evitar proteólisis durante los procedimientos de purificación, se añadió fluoruro de fenilmetilsulfonilo al cultivo hasta una concentración final de 1 mM. Se recogieron las células por centrifugación, y se rompieron en una célula de presión francesa. Se removieron los restos celulares por centrifugación, y se usó el lisado aclarado para la purificación de la proteína de fusión mediante un método por lotes utilizando perlas de glutatióna-Sefarosa 4B (volumen, 4 ml; GE Lifesciences) como lo describe el fabricante. Se escindió la etiqueta de GST de cada proteína de fusión por incubación con el Factor Xa (New England Biolabs, 0.2 µg/mg de proteína de fusión) durante 20 h a temperatura ambiente. Las fracciones de proteína escindidas se dializaron tres veces contra 1 litro de Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM a 4°C para remover la glutatióna. El fragmento de GST N-terminal se eliminó mediante la aplicación de la fracción a una columna de glutatióna-Sefarosa 4B (volumen de lecho, 2 ml). Se confirmaron diez residuos de aminoácidos del N-terminal para cada fragmento en un secuenciador automático de proteínas (Modelo 492, Perkin-Elmer). La masa molecular del fragmento C-terminal purificado se confirmó por desorción por láser asistida por matriz acoplado a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS).

##### Ejemplo 2

Demostración del enlazamiento de colágeno por las proteínas de fusión PTH-CBD

Se añadieron cinco mg de colágeno insoluble de tipo I, (C-9879, Sigma) a un dispositivo de microcentrífuga ULTRA

LIBRE, membrana DURAPORE de bajo enlazamiento de 0.22 micrómetros (Millipore, Bedford, MA) y se colocó en un tubo de microcentrífuga (Catálogo No: UFC30GV00-Millipore). Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente a menos que se especifique lo contrario. Se añadió el regulador de enlazamiento de colágeno (200 microlitros) (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, CaCl<sub>2</sub> 5 mM) para hinchar las fibras de colágeno. Después de la incubación durante 30 minutos, se centrifugó el tubo a 15.000 g durante 15 minutos. Se repitió la centrifugación después de cambiar la dirección del tubo en el rotor. Se resuspendió el precipitado de colágeno en 60 ml de regulador de enlazamiento de colágeno que contenía 100 pmol de proteína de fusión y se incubó durante 30 minutos. Después, se centrifugó la mezcla a través del dispositivo a 15.000 × g durante 15 minutos. Las proteínas enlazadas al colágeno serían retenidas por el filtro junto con el colágeno. Las proteínas que no se unen a colágeno pasarían a través suyo en el filtrado. Se analizó el filtrado por SDS-PAGE.

La FIG. 1 muestra una fotografía del gel SDS-PAGE. El carril 1 de la izquierda es de marcadores de peso molecular. El carril 2 es el filtrado de una mezcla que contiene proteína de fusión PTH-PKD-CBD filtrada sin colágeno. El carril 3 muestra el filtrado de una mezcla de proteína de fusión PTH-PKD-CBD con el colágeno. Los carriles 4 y 5 muestran el filtrado de la proteína de fusión PTH-CBD incubado con y sin colágeno, respectivamente. El resultado muestra que ambas proteínas de fusión fallaron en pasar a través del filtro cuando se incubaron con colágeno, pero pasaron a través de cuando se incubaron sin colágeno. Esto muestra ambas proteínas de fusión unidas a colágeno.

### Ejemplo 3

#### Actividad biológica *in vitro* de proteínas de fusión PTH-CBD

Las células HKRK-B7, que son células LLCPK transfectadas de forma estable con la PTH1R humana, fueron amablemente proporcionadas por Tom Gardella, Unidad de Endocrinología, Hospital General de Massachusetts. Las células se describen en la referencia (7). Las células HKRK-B7 se cultivaron en placas de 24 pozos hasta un 90 por ciento de confluencia, que se logró típicamente 2-3 días después de la siembra inicial. El medio de cultivo era DMEM (con L-glutamina) + suero bovino fetal al 10% (FBS).

Cuando las células alcanzaron 90% de confluencia, se lavaron estas una vez con 0,5 ml de regulador de enlazamiento (Tris-HCl 50 mM, pH 7.8, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 5 mM, 0.25% de suero de caballo, 0.0025% de suero fetal bovino). La placa se colocó en hielo, y se añadieron 200 microlitros de regulador IBMX (DMEM sin antibiótico y FBS, HEPES 35 mM, pH 7.4, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 1 mg/ml de albúmina de suero bovino) por pozo. IBMX es un inhibidor de la fosfodiesterasa. Se añadió péptido o PTH en las concentraciones indicadas en 100 microlitros de regulador de enlazamiento. Las células fueron incubadas luego con el péptido, la PTH, o sin adición (control) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el medio y se colocaron las placas en hielo seco para congelar las células durante 3 minutos. Se añadieron a continuación 500 microlitros de HCl 50 mM a cada pozo. Las placas se mantuvieron congeladas hasta el inmunoensayo.

Se midió la concentración de AMPc por inmunoensayo (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, MA, EE.UU.; kit de AMPc EIA, # BT-730).

Los resultados de la concentración de AMPc de las células lisadas en los pozos se muestran en la FIG. 2 para las células incubadas con de  $1 \times 10^{-12}$  M a  $1 \times 10^{-7}$  M de péptido de fusión o PTH (1-34). PTH (1-34), PTH-CBD (SEQ ID NO: 1), y PTH-PKD-CBD (SEQ ID NO: 2), todas estimularon la síntesis de AMPc en un grado similar.

### Ejemplo 4

#### Actividad *in vivo* de las proteínas de fusión PTH-CBD

Se adquirieron ratones hembra C57BL/6J sanos, 5-8 semanas de edad y 13-18 gramos, a través del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE.UU.) y fueron alojados en jaulas en la instalación para animales en la Fundación Clínica Ochsner en condiciones estándar. Los animales se mantuvieron durante un período de aclimatación de 2 semanas antes de los experimentos.

Las mediciones DEXA de línea de base de cuerpo completo (absorciometría dual de rayos X) se obtuvieron por duplicado para cada animal utilizando un instrumento Hologic QDR-1000plus adaptado para aplicación en el ratón de la siguiente manera. Se utilizó un modo de resolución ultra alta (espaciado de línea de 0.03950 cm y resolución de 0.03749 cm). Los animales fueron anestesiados con pentobarbital y se colocan boca abajo para la exploración DEXA. La densidad mineral ósea (BMD) se determinó dentro de una caja de 8 x 16 píxeles que cubre la región de la columna vertebral lumbar. Se midió la BMD para cada franja vertical de un solo píxel, y se determinaron los valores de pico. La validez de esta técnica se determinó mediante la comparación de las mediciones por duplicado en cada ratón.

Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal semanalmente durante ocho semanas, ya sea con el vehículo solo (regulador de enlazamiento de colágeno, pH 7.5, Tris HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM) o vehículo que contiene análogos de PTH de la siguiente manera:

Grupo A (8 animales): vehículo

Grupo B (6 animales): 80 µg/kg/dosis de PTH (1-34) humana

5 Grupo C (6 animales): 546 µg/kg/dosis de PTH-PKD-CBD (SEQ ID NO: 2)

Grupo D (6 animales): 344 µg/kg/dosis de PTH-CBD (SEQ ID NO: 1)

10 Las dosis de los tres compuestos de PTH se ajustaron en función de sus pesos moleculares, de tal manera que cada uno se suministró con el mismo equivalente molar (0,02 micromoles/kg/dosis).

15 Una semana después de la octava inyección, los animales fueron sacrificados con una dosis letal de pentobarbital. Se obtuvieron mediciones por duplicado de la BMD para cada ratón mediante la técnica descrita anteriormente. Se calculó el porcentaje de aumento de la BMD para cada ratón, y los resultados (media +/- error estándar) se muestran en la FIG. 3. Se determinó la significancia estadística mediante una prueba t pareada de una cola. Diferencias estadísticamente significativas de control de vehículo se indican mediante \* (p <0,05) y \*\* (p <0,01) en las FIGS. 3 y 4.

20 En la conclusión del estudio, los segmentos de la columna vertebral lumbar de los ratones también fueron extirpados de los tejidos blandos y se tomaron mediciones de BMD de los segmentos de la espina dorsal extirpados. Los resultados de la BMD de los segmentos de la columna vertebral extirpados de la media del segmento de hueso entero, no mediciones pico de BMD como las que se obtienen a partir de las exploraciones de animales completos.

25 Las comparaciones estadísticas utilizadas fueron grupos a través de ANOVA (p <0,05), y las comparaciones de Bonferroni de cada grupo frente al control.

30 La proteína de fusión PTH-CBD (SEQ ID NO: 1) produjo un aumento medio de 17% en la BMD en el período de tratamiento de 8 semanas. Tanto PTH (1-34) como la proteína de fusión PTH-PKD-CBD (SEQ ID NO: 2) produjeron un aumento de aproximadamente 7.5% en la densidad mineral ósea. Los ratones en el grupo de control de vehículo tuvieron un aumento del 5% en la BMD en el período de tratamiento de 8 semanas. (FIG. 3). Tanto las proteínas de fusión PTH-CBD (p <0.01) como PTH-PKD-CBD (p <0.05) produjeron aumentos de BMD que fueron estadísticamente significativamente mayores que los controles del vehículo, mientras que la PTH (1-34) no lo hizo. Pero la fusión PTH-CBD produjo aproximadamente el doble de aumento de la BMD tanto de PTH (1-34) como de la proteína de fusión PTH-PKD-CBD. (FIG. 3).

35 La BMD de los segmentos de la columna lumbar escindidos de los cuatro grupos de ratones al final del período de tratamiento de 8 semanas se muestra en la FIG. 4. Una vez más, el grupo de PTH-CBD fue estadísticamente significativamente diferente del control de vehículo (p <0.05). Las diferencias entre otros grupos con el control de vehículo y entre ellos mismos no alcanzaron significancia estadística.

40 Se midieron también los niveles de calcio en suero en los ratones antes, durante y después del estudio. Se sabe que la PTH con una inyección diaria con lleva un riesgo de hipercalcemia. No hubo diferencias en los niveles de calcio en suero entre cualquiera de los grupos, lo que indica que las proteínas de fusión PTH-CBD no causaron hipercalcemia (FIG. 5).

45 También se midieron los niveles de fosfatasa alcalina en suero. La fosfatasa alcalina en suero se incrementó en los grupos PTH (1-34), PTH-PKD-CBD y PTH-CBD (FIG. 6). La fosfatasa alcalina elevada se correlaciona con hiperparatiroidismo y períodos de crecimiento de los huesos. Por lo tanto, esto es una evidencia de aumento del recambio óseo con los tres agentes.

50 La tinción de secciones de tibia con hematoxilina y eosina mostró aumento de hueso trabecular y cortical en los ratones tratados con 8 semanas de PTH-CBD versus control de vehículo (FIG. 7).

No se encontró evidencia de tumores óseos en ratones en cualquiera de los grupos por DEXA o examen post mortem.

55 Se concluye que la proteína de fusión PTH-CBD es más activa que PTH (1-34) en la promoción de aumento de la densidad mineral ósea *in vivo*.

#### Ejemplo 5

60 Administración mensual de la PTH-CBD *in vivo*

65 Con los resultados alentadores que muestran la eficacia de la PTH-CBD para aumentar la densidad mineral ósea después de la administración semanal, se probó a continuación la eficacia de esta proteína de fusión con la administración mensual. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de PTH-CBD (344 µg/kg/dosis), PTH (80 µg/kg/dosis), o vehículo solo mensualmente en regulador como se describe en el Ejemplo 4. Había 10 ratones en cada grupo. La densidad mineral ósea (BMD) se midió mediante DEXA como se describe en el Ejemplo 4 cada 2 meses. Se

correlacionaron las mediciones DEXA con la densidad mineral ósea absoluta mediante correlación entre las mediciones de DEXA y las mediciones de tejido extirpado en el estudio semanal del Ejemplo 4.

5 Las mediciones seriales de BMD cada 2 meses mostraron que la administración mensual de PTH-CBD dio lugar a un aumento significativo en la BMD después de 4 meses de terapia, que se mantuvo durante 6 meses de terapia (FIG. 8) (P <0.01, que se muestra por \*\* en FIG. 8). No es sorprendente que la administración mensual de PTH (1-34) no tuviera ningún efecto sobre la densidad mineral ósea. Después de 6 meses (tal como se indica por la flecha en la FIG. 8), se discontinuó la administración de PTH-CBD, y se sometió a los animales en el Grupo PTH (1-34) de 2 semanas de terapia diario. La medición de BMD 2 meses después mostró que las ganancias en densidad mineral ósea después de 10 la administración de PTH-CBD se mantuvieron (a pesar de la disminución en BMD en el grupo de control de vehículo, esperado para la edad), y que la administración diaria de la PTH (1-34) dio como resultado aumentos en BMD que se aproximan, pero no alcanzaron aquellas del grupo de PTH-CBD.

15 Los ratones fueron seguidos durante otros 6 meses, y los datos mostraron que la BMD de los grupos PTH (1-34) y PTH-CBD disminuyeron en forma paralela y se mantuvieron más altos que los ratones no tratados de control de vehículo.

Se midió también la concentración en suero de fosfatasa alcalina en estos grupos de ratones en el punto de tiempo de la semana 48. Los resultados se muestran en la FIG. 10. Incluso en las 48 semanas, 22 semanas después de la última administración de la proteína de fusión PTH-CBD, se elevó la concentración de fosfatasa alcalina en el grupo que 20 recibió la proteína de fusión PTH-CBD en comparación con los ratones de control de vehículo y los ratones que recibieron PTH (1-34).

Conclusión:

25 Junto con los datos en Ejemplo 4, estos datos indican que la administración mensual de PTH-CBD mostró una eficacia al menos igual a la inyección diaria de PTH en la promoción de un aumento en la densidad mineral ósea. Es importante destacar que, la dosis de PTH-CBD suministrada en cada inyección es el equivalente molar de la dosis diaria de PTH (1-34); Por lo tanto, la dosis total administrada es realmente 1/30 de la dosis con PTH (1-34). Los datos sugieren que 30 incluso intervalos de dosis mayores, a la mensual pueden ser efectivos, y que los efectos sobre la BMD se mantienen durante un tiempo más largo después de terminar la terapia con PTH-CBD que con PTH (1-34).

Ejemplo 6

Administración cada 3 y 6 meses de PTH-CBD *in vivo*

35 Con los resultados alentadores que muestran la eficacia de PTH-CBD para aumentar la densidad mineral ósea después de la administración mensual, se analizó después la eficacia de esta proteína de fusión con la administración cada 3 o cada 6 meses. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de PTH-CBD (344 µg/kg/dosis x 1) (CBD-PTH-6 de la FIG. 9), PTH-CBD (344 µg/kg/dosis a los 0 y 3 meses) (CBD-PTH-6 de la FIG. 9), PTH (1-34) (80 mg/kg/dosis al día durante 2 semanas), o solo vehículo (x1) en regulador como se describe en el Ejemplo 4. Había once ratones en cada grupo. Se midió la densidad mineral ósea (BMD) por DEXA a los 3 meses y después de eso en forma mensual. El estudio prosigue, y se dispone de datos hasta el punto de tiempo de 5 meses.

45 Las mediciones seriales de BMD mostraron que una dosis única de PTH-CBD dio como resultado aumentos significativos en BMD después de 4 meses de terapia (FIG. 9). La administración de la segunda dosis de PTH-CBD en el punto de 3 meses no causó aumentos adicionales en BMD en los puntos de 4 y 5 meses. La administración diaria de PTH (1-34) durante 2 semanas causó el aumento esperado en la BMD a los 3 meses, pero a los 5 meses la BMD había disminuido de nuevo a los niveles de control. Los ratones en este estudio fueron seguidos durante 7 meses más.

50 Conclusión:

Junto con los datos de los Ejemplos 4 y 5, estos datos sugieren que una dosis única de PTH-CBD es suficiente para promover aumento sostenido de la densidad mineral ósea. Es importante destacar que, la dosis de PTH-CBD dada en cada inyección es el equivalente molar de la dosis diaria de PTH (1-34); por lo tanto, la dosis total administrada en realidad es 1/14 de la dosis de PTH (1-34) en el intervalo de 5 meses para los que se tienen datos en este momento. Se continuará recopilando datos en este estudio por otros 7 meses. Los datos también indican que los efectos sobre la BMD se mantienen durante un tiempo más largo después de la cesación de la terapia con PTH-CBD que con PTH (1-34).

60 Ejemplo 7

Dosis preliminar y estudio de la respuesta en el tiempo

65 Para determinar aproximadamente la dosis óptima de PTH-CBD, se suministró una dosis única de la proteína de fusión por administración subcutánea a los ratones en un intervalo de dosis de 2 a 8000 microgramos/kg y la se analizó la BMD a los ratones mediante DEXA cada 4 semanas durante 20 semanas. Con la dosis más alta, la BMD disminuyó

entre 4 semanas y 12 semanas y luego aumentó. Por lo tanto, parecía tener un efecto catabólico transitorio y luego un posible efecto anabólico. Las dosis intermedias de 40-400 microgramos/kg, que abarca la dosis de 344 microgramos/kg utilizada en los Ejemplos 4 y 5, parecen tener el efecto anabólico mayor durante las primeras 8 semanas. La dosis más baja ensayada, 2 microgramos/kg parecía tener menos efecto anabólico durante las primeras 16 semanas. (FIG. 11).

5

#### Ejemplo 8

Uso de PTH-CBD para promover el crecimiento de pelo

10 Hay informes de que los agonistas y antagonistas de PTH pueden modular el crecimiento de pelo en modelos animales de pérdida genética de pelo y después de la administración de quimioterapia (8, 9). Se analizó si PTH-CBD podría, después de administración subcutánea, alterar el patrón de crecimiento de pelo después pérdida de pelo inducida por quimioterapia con ciclofosfamida.

15 Materiales y métodos:

Se trataron ratones hembra sanos C57BL/6J (como en el Ejemplo 4) con 150 mg/kg de ciclofosfamida cada mes durante 3 meses. El agente quimioterapéutico causó el adelgazamiento del pelo y el cambio de color de negro a blanco. Adicionalmente, se afeitó un punto sobre el lomo. En el punto de remoción de pelo, se inyectó por vía subcutánea PTH-CBD en una dosis de 320 mg/kg. También se ensayó la inyección de una proteína de fusión CBD que contenía un antagonista del receptor de PTH/PTHrP (SEQ ID NO: 9). Esta proteína de fusión fue elaborada mediante la inserción de una secuencia de escisión de trombina (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, SEQ ID NO: 12) entre los segmentos GST y PTH (1-33) de la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 1. Se escindió la proteína de fusión GST-PTH-CBD resultante mediante trombina entre los residuos Arg y Gly de la secuencia de escisión de trombina para liberar la proteína de fusión Gly-Ser-PTH-CBD de la SEQ ID NO: 9.

25

Resultados:

30 Los animales tratados con PTH-CBD mostraron crecimiento más rápido del pelo en el lugar de la extracción, y se revirtieron tanto el adelgazamiento inducido por la quimioterapia como el cambio de color del pelo, incluso en sitios distantes del sitio de la inyección de PTH-CBD (FIG. 12). Se analizó también una proteína de fusión CBD que contenía un antagonista del receptor de PTH/PTHrP en estudios piloto. Sin embargo, la proteína de fusión antagonista produjo únicamente pelo pelusa en el sitio de la inyección y no funcionó tan bien como la proteína de fusión agonista de PTH-CBD (resultados no mostrados). La proteína de fusión antagonista produjo más pelo que el tratamiento de control de vehículo (resultados no mostrados).

35

Conclusión: PTH-CBD puede revertir la alopecia inducida por quimioterapia, y los efectos no están limitados a la zona de la inyección.

40 Ejemplo 9

El uso de PTH-CBD para promover la reconstitución inmunitaria

45 Se irradian ratones C57B1/6 hembra con 10 Gy de radiación (fuente de <sup>137</sup>Cs). 24 horas después, se inyectan los ratones con  $2 \times 10^5$  células mononucleares de médula ósea (BMMNC) de un ratón B6.SJL donante. Inmediatamente antes de recibir las BMMNC, se inyectan también los ratones receptores con solución salina (control de vehículo), 344 g/kg de PTH-CBD (SEQ ID NO: 1), u 80 g/kg de PTH (1-34).

45

50 Se espera que una parte o la totalidad de los ratones que recibieron BMMNC mueran. Se espera que un mayor porcentaje de los ratones que recibieron PTH (1-34) sobrevivan. Se espera que un porcentaje aún mayor de los ratones que recibieron PTH-CBD sobrevivan.

50

También se espera que el recuento de neutrófilos se incremente más rápidamente en los ratones que recibieron la proteína de fusión PTH-CBD que en los ratones que reciben una cantidad equimolar de PTH o que recibieron el control de vehículo.

55

Ejemplo 10

Uso de PTH-CBD para promover la movilización de células madre de médula ósea

60

Se inyectan ratones machos C57BL de 6 a 8 semanas de edad por vía subcutánea con una dosis única de 80 mcg/kg de PTH (1-34) o 344 mcg/kg de PTH-CBD (SEQ ID NO: 1) o solución salina (control de vehículo). Catorce días después, se recolecta sangre periférica de los ratones, y se determinan las células c-KIT/Sca-1 mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (21). Se determina que PTH-CBD provoca un mayor incremento en células doblemente positivas c-KIT/Sca-1 que una sola dosis de PTH (1-34).

65

Para probar la capacidad de las células madre movilizadas con PTH-CBD para repoblar, se recoge sangre 14 días después del tratamiento con PTH, PTH-CBD, o control de vehículo como se describió anteriormente. Se lisan los glóbulos rojos como se describe en (22). Se transfunden las células totales recolectadas a partir de 900 mcl de sangre en un ratón que fue sometido a una dosis letal de radiación (900 cGy) 24 horas antes. Se espera que un mayor porcentaje de ratones receptores sobrevivan cuando se administran las células de sangre de un ratón donante tratado con PTH-CBD que de un ratón tratado con PTH (1-34) o control de vehículo. Además, se espera que la administración de la proteína de fusión aumente el número de células madre en la sangre circulante del mamífero (por ejemplo, 7, 14, o 30 días después de la administración de la proteína de fusión)

10 Ejemplo 11

Uso de una proteína de fusión antagonista del receptor de CBD-PTH/PTHrP para la prevención y tratamiento de metástasis de médula ósea de cáncer de mama

15 Cuando se administra como una inyección diaria, la PTH (1-34) estimula el crecimiento óseo en diversas especies y en mujeres con osteoporosis. Sin embargo, la administración continua de PTH como una infusión (es decir adenoma paratiroideo) resulta en pérdida de hueso.

20 El cáncer de mama hace metástasis en el hueso mediante la producción de un factor, un péptido relacionado con PTH (PTHrP), que activa al receptor PTH/PTHrP, incrementando el recambio óseo en la región local. La eliminación de tejido óseo que resulta de esta cascada crea un hueco en el hueso donde las células cancerosas pueden crecer y causa la liberación de factores de crecimiento a partir de la matriz de colágeno remodelada lo que promueve el crecimiento del tumor. En este estudio, se muestra que un péptido antagonista de PTH-CBD tiene la capacidad para tratar o prevenir (reducir la incidencia de) la metástasis ósea del cáncer de mama. El modelo utilizado es el ratón sin pelo inmunodeficiente.

25 Los animales reciben una inyección única de células de cancerosas de mama humana MCF-7 etiquetadas con una sonda fosforescente. Se toman semanalmente imágenes de los animales usando un generador de imágenes de cuerpo completo para evaluar las lesiones metastásicas del hueso. Una vez que están presentes 2 o más lesiones en cada animal, los animales recibieron una inyección única de PTH (7-33)-CBD o control de vehículo. Se continúa con la toma de imágenes semanalmente durante 2 meses más para controlar el crecimiento de la metástasis existente y la aparición de nuevas metástasis.

35 Métodos experimentales:

Se obtienen 22 ratones sin pelo de 3-5 semanas de edad y 13-18 gramos. Se registra el peso inicial de los animales junto con su estado general de salud. Se mantienen los animales durante un período de aclimatación de 2 semanas antes de los experimentos. (edad final de 5-8 semanas).

40 Se obtienen imágenes de línea base de cada animal, usando el generador de imágenes de cuerpo completo Bioluminescent/Fluorescent Imager (Xenogen Biosciences, Cranbury, NJ) después de anestesia con isoflourano. Los animales recibieron luego una inyección única de células MCF-7 transfectadas en forma estable con un plásmido que expresa la luciferasa de luciérnaga (23, 24). Se toman nuevas imágenes de los animales después de la inyección y en forma semanal a partir de entonces para supervisar la metástasis ósea.

45 Cuando se presentan 2 o más lesiones metastásicas en los huesos de cada ratón, se dividen en forma aleatoria los animales en 2 grupos:

50 Grupo 1: 11 animales- se administra por vía intraperitoneal con vehículo una vez.

Grupo 2: 11 animales- se administra con 344 mcg/kg de PTH (7-33)-CBD (SEQ ID NO: 10) por vía intraperitoneal una vez.

55 Los animales se sedaron con isoflourano y se obtuvieron imágenes de cuerpo entero en forma semanal durante un período de 2 meses.

Análisis de datos:

60 Durante el período experimental, se pesaron y examinaron los animales semanalmente para detectar cualquier signo de enfermedad. Se analizan las imágenes de cuerpo entero para determinar el número de lesiones metastásicas y la intensidad de la emisión de luz luminiscente de cada lesión.

65 Al final del período experimental, se sacrifican los animales mediante inyección de una dosis letal de pentobarbital (100 mg/kg). Las regiones del hueso, que contienen (contenían) lesiones metastásicas en cualquier momento durante el estudio se preparan para examen histológico.

Resultados:

Se espera que los ratones inyectados con PTH (7-33)-CBD desarrollen menos lesiones óseas metastásicas y tengan un crecimiento más lento de las lesiones óseas metastásicas que los ratones que recibieron control de vehículo.

Ejemplo 12

Uso de una proteína de fusión antagonista del receptor de CBD-PTH/PTHrP para la prevención y tratamiento de la osteodistrofia renal

La osteodistrofia renal es una enfermedad ósea que se produce cuando los riñones fallan en mantener los niveles adecuados de calcio y fósforo en la sangre. Es un problema común en las personas con enfermedad renal y afecta al 90 por ciento de los pacientes de diálisis. La osteodistrofia renal es una de las principales causas de fracturas en pacientes con enfermedad renal crónica. En este estudio, se muestra que el péptido antagonista de PTH-CBD tiene la capacidad para tratar o prevenir la osteodistrofia. El modelo utilizado es ratones hembra normales alimentados con una dieta alta de fósforo para inducir la osteodistrofia renal.

Los animales luego reciben una inyección única de PTH (7-33)-CBD o control de vehículo. Los animales se mantienen durante 6 meses después del período inicial de tratamiento para evaluar la duración de los efectos terapéuticos. La densidad mineral ósea y los niveles de fosfatasa alcalina se miden en forma mensual.

Plan Experimental:

Se obtienen ratones C57BL/6J hembra normales sanos, de 3-5 semanas de edad y 13-18 gramos. Se registra el peso inicial de los animales junto con su estado de salud general. Los animales se mantienen durante un periodo de aclimatación de 2 semanas antes de los experimentos (edad final de 5-8 semanas).

Los animales son alimentados con dieta alta en fósforo para inducir la osteodistrofia renal (ROD). Los animales se supervisan periódicamente por su estado de salud. Las muestras de sangre se recogen para evaluar los niveles de calcio, fósforo, PTH y vitamina D. Los resultados de osteodistrofia renal de un fosfato en suero anormalmente elevado (hiperfosfatemia) y calcio en suero bajo (hipocalcemia), ambos debidos a la disminución de la excreción de fosfatos por el riñón dañado, niveles bajos de vitamina D o hiperparatiroidismo terciario (disfunción de la glándula paratiroidea, debido a estimulación constante).

También se pueden hacer mediciones de la densidad mineral ósea basal.

Los animales se dividen en los siguientes grupos:

Grupo 1: 11 animales- se les administra vehículo por vía intraperitoneal una vez.

Grupo 2: 11 animales- se les administra 344 mcg/kg de PTH (7-33)-CBD (SEQ ID NO: 10) por vía intraperitoneal una vez.

Los animales se sedaron con pentobarbital y se mide la densidad mineral ósea (BMD) al inicio del estudio y mensualmente durante la duración del estudio (6 meses). Se obtienen muestras de sangre a partir de cortes de la cola al inicio del estudio y cada mes (bajo sedación como anteriormente).

Análisis de los datos:

Durante el periodo experimental, los animales se pesaron y se examinaron semanalmente para detectar cualquier signo de enfermedad. Las mediciones de la densidad mineral ósea se analizan mediante ANOVA en cada punto de tiempo. Los valores de fosfatasa alcalina y calcio se miden a partir de cada muestra de sangre y se analizan por ANOVA en cada punto de tiempo.

Al final del periodo experimental, los animales se sacrificaron mediante la inyección de una dosis letal de pentobarbital (100 mg/kg). Las muestras de sangre se recogen para realizar ensayos bioquímicos (PTH intacta, calcio, fósforo, fosfatasa alcalina, osteocalcina). Los ensayos cuantitativos de hueso incluyen histomorfometría, BMC y BMD del cuerpo completo y la columna vertebral extirpada, y la evaluación de las propiedades biomecánicas. Los datos se analizan por ANOVA.

Resultados:

Se espera que los animales inyectados con PTH (7-33)-CBD respondan con aumentos o disminuciones más lentas en todas las medidas de la densidad mineral ósea en comparación con los ratones que recibieron el control de vehículo. Se espera también que los ratones inyectados con PTH (7-33)-CBD muestren crecimiento óseo trabecular o pérdida más lenta de hueso trabecular que los ratones que recibieron control de vehículo.

Resumen del listado de secuencias

- 5 SEQ ID NO: 1 proteína de fusión PTH-CBD
- SEQ ID NO: 2 proteína de fusión PTH-PKD-CBD
- SEQ ID NO: 3 vector que expresa al precursor de la proteína de fusión PTH-CBD
- 10 SEQ ID NO: 4 proteína de fusión GST-4 PTH-CBD expresada por el vector
- SEQ ID NO: 5 secuencia de reconocimiento del Factor Xa
- 15 SEQ ID NO: 6 ColH colagenasa
- SEQ ID NO: 7 PTH.
- SEQ ID NO: 8 PTHrP.
- 20 SEQ ID NO: 9 proteína de fusión CBD con el antagonista del receptor de PTH
- SEQ ID NO: 10 proteína de fusión PTH (7-33)-CBD
- SEQ ID NO: 11 Gly-Ser-PTH (1-33) antagonista de PTH/PTHrP
- 25 SEQ ID NO: 12 secuencia de reconocimiento de trombina

Referencias

- 30 1. Broadus AE et al. 1988. N. Engl. J. Med. 319: 556-563.
2. Thiede MA et al. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4605-4609.
- 35 3. Orloff, JJ et al. 1994. Endocrine Rev. 15: 40-60.
4. Schilli, MB et al. 1997. J. Invest. Dermatol. 108: 928-932.
5. Matsushita, O. et al. 1999. J. Bacterial. 181: 923-933.
- 40 6. Yoshihara, K. et al. 1994. J. Bacterial. 176: 6489-6496.
7. Jonsson KB, John MR, Gensure RC, Gardella TJ, Juppner H. 2001. Tuberoinfundibular peptide 39 binds to the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor, but functions as an antagonist. Endocrinology 142(2): 704-9.
- 45 8. Schilli MB, Ray S, Paus R, Obit-Tabot E, Holick MF. 1997. Control of hair growth with parthyroid hormone (7-34). J. Invest. Dermatol. 108: 928-932.
9. Peters EM, Foitzik K, Paus R, Ray S, Holick MF. 2001. A new strategy for modulating chemotherapy-induced alopecia, using PTH/PTHrP receptor agonist and antagonist. J Invest Dermatol. 117(2):173-8.
- 50 10. Ballen K. 2007. Targeting the stem cell niche: squeezing blood from bones. Bone Marrow Transplantation 39: 655-660.
11. Ballen K. et al. 2007. Phase I trial of parathyroid hormone to facilitate stem cell mobilization. Biology of Blood and Marrow Transplantation 13: 838-843.
- 55 12. Calvi LM et al. 2003. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature 425: 841-846.
13. Wuthrich RP, Martin D, Bilezikian JP. 2007. The role of calcimimetics in treatment of hyperparathyroidism. Eur. J. Clin. Invest. 37: 915-922.
- 60 14. Dolgos S. et al. 2008. Determinants of bone mass in end-stage renal failure patients at the time of kidney transplantation. Clin. Transplant. epub ahead of print.
- 65 15. Guise TA. 1997. Parathyroid hormone-related protein and bone metastases. Cancer 80(8 Suppl): 1572-80.

16. Henderson MA, Danks JA et al. 2006. Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predicts improved prognosis. *Cancer Res.* 66: 2250-56.
- 5 17. Saito H, Tsunenari T et al. 2005. Humanized monoclonal antibody against parathyroid hormone-related protein suppresses osteolytic bone metastasis of human breast cancer cells derived from MDA-MB-231. *Anticancer Res.* 25: 3817-23. Erratum in 26: 445.
- 10 18. Hoare SR, Usdin TB. 2002. Specificity and stability of a new PTH1 receptor antagonist, mouse TIP(7-39). *Peptides* 23: 989-98.
- 15 19. Rickard DJ et al. 2007. Intermittent treatment with parathyroid hormone as well as a non-peptide small molecule agonist of the PTH1 receptor inhibits adipocyte differentiation in human bone marrow stromal cells. *Bone* 39: 1361-1372.
- 20 20. McDonald IM et al. 2007. Discovery and characterization of novel, potent, non-peptide parathyroid hormone receptor antagonists. *J. Med. Chem.* 50: 4789-4792.
- 25 21. Stokman G et al. 2008. Enhanced mobilization of bone marrow cells does not ameliorate renal fibrosis. *Nephrol. Dial. Transplant* 23: 483-491.
- 30 22. Abraham M et al. 2007. Enhanced unique pattern of hematopoietic cell mobilization induced by the CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003. *Stem cells* 25: 2158-2166.
- 35 23. Caceres G et al. 2003. Determination of chemotherapeutic activity in vivo by luminescent imaging of luciferasetransfected human tumors. *Anticancer Drugs* 14: 569-74.
- 40 24. Jenkins DE et al. 2005. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Research* 7:R444-R454.
- 45 25. Compston JE. 2007. Skeletal actions of intermittent parathyroid hormone: effects on bone remodelling and structure. *Bone* 40(6): 1447-52.
- 50 26. Fox J, Miller MA, Newman MK, Recker RR, Turner CH, Smith SY. 2007. Effects of daily treatment with parathyroid hormone 1-84 for 16 months on density, architecture and biomechanical properties of cortical bone in adult ovariectomized rhesus monkeys. *Bone* 41(3): 321-30.
- 55 27. Zhou H, Iida-Klein A, Lu SS, Ducayen-Knowles M, Levine LR, Dempster DW, Lindsay R. 2003. Anabolic action of parathyroid hormone on cortical and cancellous bone differs between axial and appendicular skeletal sites in mice. *Bone* 32(5): 513-20.
- 60 28. Zaruba MM, Huber BC, Brunner S, Deindl E, David R, Fischer R, Assmann G, Herbach N, Grundmann S, Wanke R, Mueller-Hoecker J, Franz WM. 2008. Parathyroid hormone treatment after myocardial infarction promotes cardiac repair by enhanced neovascularization and cell survival. *Cardiovasc Res.* 77(4): 722-31.
- 65 29. Schlüter KD, Schreckenber R, Wenzel S. 2008. Stem cell mobilization versus stem cell homing: potential role for parathyroid hormone? *Cardiovasc Res.* 77(4): 612-3.
30. Ishikawa et al., U.S. published patent application 20040053368.
31. Goldberg et al., International patent application WO 2005/082941.
32. Ishikawa T, Eguchi M, Wada M, Iwami Y, Tono K, Iwaguro H, Masuda H, Tamaki T, Asahara T. 2006. Establishment of a Functionally Active Collagen-Binding Vascular Endothelial Growth Factor Fusion Protein In Situ. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*
33. Ishikawa T, Terai H, Yamamoto T, Harada K, Kitajima T. 2003. Delivery of a growth factor fusion protein having collagen-binding activity to wound tissues. *Artif Organs.* 27(2): 147-54.
34. Crine et al., solicitud de patente estadounidense publicada No. 20060014687.
- Listado de secuencias
- <110> The Board of Trustees of the University of Arkansas Techno Net work Shi koku, Co., Ltd. Ochsner Clinic Foundation Matsushita, Osamu Gensure, Robert C. Sakon, Joshua
- <120> Proteína de fusión de un dominio de enlazamiento a colágeno y la hormona paratiroides

ES 2 675 174 T3

<130> 110-020-PCT

<150> US 60/ 922.433

5 <151> 2007-04-09

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.3

10

<210> 1

<211> 158

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Proteína de fusión que contiene un segmento de hormona paratiroidea y un dominio de enlace a colágeno

<400> 1

20

Ser Val Ser Glu Ile Gn Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gn Asp Val His  
20 25 30

Asn Gly Ile Asn Ser Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro  
35 40 45

Asn Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro  
50 55 60

Val Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gn Asp Tyr Phe Tyr Phe  
65 70 75 80

Asp Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly  
85 90 95

Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val  
100 105 110

Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gn Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala  
115 120 125

Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser  
130 135 140

Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
145 150 155

<210> 2

<211> 251

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Proteína de fusión que contiene un fragmento de hormona paratiroidea y un dominio de enlace a colágeno y un dominio de enfermedad de riñón poliquística de Col H.

30

ES 2 675 174 T3

<400> 2

Ser Val Ser Glu Ile Gn Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gn Asp Val His  
 20 25 30

Asn Gly Ile Pro Glu Ile Lys Asp Leu Ser Glu Asn Lys Leu Pro Val  
 35 40 45

Ile Tyr Met His Val Pro Lys Ser Gly Ala Leu Asn Gn Lys Val Val  
 50 55 60

Phe Tyr Gly Lys Gly Thr Tyr Asp Pro Asp Gly Ser Ile Ala Gly Tyr  
 65 70 75 80

Gn Trp Asp Phe Gly Asp Gly Ser Asp Phe Ser Ser Glu Gn Asn Pro  
 85 90 95

Ser His Val Tyr Thr Lys Lys Gly Gu Tyr Thr Val Thr Leu Arg Val  
 100 105 110

Met Asp Ser Ser Gly Gn Met Ser Gu Lys Thr Met Lys Ile Lys Ile  
 115 120 125

Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Gu Lys Gu Pro Asn Asn Ser  
 130 135 140

Lys Gu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val Ser Gly  
 145 150 155 160

Thr Ile Gu Asn Thr Ser Asp Gn Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Val Ile  
 165 170 175

Thr Pro Gly Gu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr Gly Gly  
 180 185 190

Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Gu Asn Asn Asn Ala Val Ser Tyr Ala  
 195 200 205

Thr Asp Asp Gly Gn Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp Lys Pro  
 210 215 220

Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr Met Pro  
 225 230 235 240

Tyr Arg Ile Asn Ile Gu Gly Ser Val Gly Arg  
 245 250

5

<210> 3

<211> 5464

<212> ADN

10 <213> Artificial

ES 2 675 174 T3

<220>

<223> Vector de expresión

5 <400> 3

```

agct t at cga ct gcacggt g caccaat gct t ct ggcgt ca ggcagccat c ggaagct gt g      60
gt at ggct gt gcaggt cgt a aat cact gca t aat t cgt gt cgct caaggc gcact cccgt      120
t ct ggat aat gt t t t t t gcg ccgacat cat aacggt t ct g gcaaat at t c t gaaat gagc      180
t gt t gacaat t aat cat cgg ct cgt at aat gt gt ggaat t gt gagcggat aacaat t t ca      240
cacaggaaac agt at t cat g t cccct at ac t aggt t at t g gaaaat t aag ggcct t gt gc      300
aaccact cg act t ct t t t g gaat at ct t g aagaaaaa a t gaagagcat t t gt at gagc      360
gcgat gaagg t gat aaat gg cgaaacaaaa agt t t gaat t ggg t t t ggag t t t cccaat c      420
t t cct t at t a t at t gat ggt gat gt t aaat t aacacagt c t at ggccat c at acgt t at a      480
t agct gacaa gcacaacat g t t ggg t ggt t gt ccaaaga gcgt gcagag at t t caat gc      540
t t gaaggagc ggt t t t ggat at t agat acg gt gt t t cgag aat t gcat at agt aaagact      600
t t gaaact ct caaagt t gat t t t ct t agca agct acct ga aat gct gaaa at gt t cgaag      660
at cgt t t at g t cat aaaaca t at t t aaat g gt gat cat gt aacctat cct gact t cat gt      720
t gt at gagc t ct t gat gt t gt t t t at aca t ggaccaat gt gcct ggat gcgt t ccaa      780
aat t agt t t g t t t t aaaaaa cgt at t gaag ct at cccaca aat t gat aag t act t gaaat      840
ccagcaagt a t at agcat gg cct t t gcagg gct ggcaagc cacgt t t ggt ggt ggcgacc      900
at cct ccaaa at cggat ct g at cgaaggt c gt t ct gt gag t gaaat acag ct t at gcat a      960
acct gggaaa acat ct gaac t cgat ggaga gagt agaat g gct gcgt aag aagct gcagg      1020
at gt gcacaa t ggaat t aat t ccccggt at at ccaat agg cact gaaaaa gaaccaaat a      1080
acagt aaaga aact gcaagt ggt ccaat ag t accaggt at acct gt t agt ggaacct ag      1140
aaaat acaag t gat caagat t at t t ct at t t t gat gt t at aacaccagga gaagt aaaaa      1200
t agat at aaa t aaat t aggg t acggaggag ct act t ggg t agt at at gat gaaaat aat a      1260
at gcagt at c t t at gccact gat gat gggc aaaaat t t aag t ggaaagt t t aaggcagat a      1320
aaccaggt ag at at t acat c cat ct t t aca t gt t t aat gg t agt t at at g ccat at agaa      1380
t t aat at aga aggt t cagt a ggaagat aat at t t t at t ag t t gaggt aac t cact cgaa      1440
t t ggt cgact cgagcggccg cat cgt gact gact gacgat ct gcct cgcg cgt t t cggt g      1500
at gacggt ga aaacct ct ga cacat gcagc t cccggagac ggt cacagct t gt ct gt aag      1560

```

ES 2 675 174 T3

cggat gccgg gagcagacaa gcccg t cagg gcgcgt cagc ggg t gt t ggc ggg t gt cggg 1620  
 gcgcagccat gacccag t ca cgt agcgat a gcggagt gt a t aat t ct t ga agacgaaagg 1680  
 gcct cgt gat acgcct at t t t at aggt t a at gt cat gat aat aat ggt t t ct t agacgt 1740  
 caggt ggcac t t t t cgggga aat gt gcgcg gaaccct at t t gt t t at t t t ct aaat ac 1800  
 at t caaat at gt at ccgt c at gagacaat aaccct gat a aat gct t caa t aat at t gaa 1860  
 aaaggaagag t at gagi at t caacat t t cc gt gt cgccct t at t ccct t t t t gcggcat 1920  
 t t t gcct t cc t gt t t t gct caccagaaa cgct ggt gaa agt aaaagat gct gaagat c 1980  
 agt t ggg t gc acgagt ggg t t acat cgaac t ggat ct caa cagcgg t aag at cct t gaga 2040  
 gt t t t cggcc cgaagaacgt t t t ccaat ga t gagcact t t t aaagt t ct g ct at gt ggcg 2100  
 cgg t at t at c ccgt gt t gac gccgggcaag agcaact cgg t cgccgcat a cact at t ct c 2160  
 agaat gact t ggt t gagi ac t caccag t ca cagaaaagca t ct t acggat ggc t gacag 2220  
 t aagagaat t at gcagt gct gccat aacca t gagi gat aa cact gcggcc aact t act t c 2280  
 t gacaacgat cggaggaccg aaggagct aa ccgct t t t t t gcacaacat g ggggat cat g 2340  
 t aact cgct t gat cgt t gg gaaccggagc t gaat gaagc cat accaaac gacgagcgt g 2400  
 acaccagat gcct gcagca at ggcaacaa cgt t gcgcaa act at t aact ggcgaact ac 2460  
 t t act ct agc t t ccggcaa caat t aat ag act ggat gga ggcggat aaa gt t gcaggac 2520  
 cact t ct gcg ct cggccct t ccggct ggct ggt t t at t gc t gat aaat ct ggagccgg t g 2580  
 agcgt ggg t c t cgcggt at c at t gcagcac t ggggccaga t ggt aagccc t ccg t at cg 2640  
 t agt t at ct a cagcagggg agt caggcaa ct at ggat ga acgaaat aga cagat cgct g 2700  
 agat aggt gc ct cact gat t aagcat t ggt aact gt caga ccaagt t t ac t cat at at ac 2760  
 t t t agat t ga t t t aaaact t cat t t t t aat t t aaaaggat ct aggt gaag at cct t t t t g 2820  
 at aat ct cat gacaaaaat c cct t aacgt g agt t t t cgt t ccact gagcg t cagaccccg 2880  
 t agaaaagat caaaggat ct t ct t gagat c ct t t t t t ct gcgcgt aat c t gct gct t gc 2940  
 aaacaaaaaa accaccgt a ccagcgg t gg t t t gt t t gcc ggat caagag ct accaact c 3000  
 t t t t t ccgaa ggt aact ggc t t cagcagag cgcagat acc aaat act gt c ct t ct agt gt 3060  
 agccgt agt t aggccaccac t t caagaact ct gt agcacc gcct acat ac ct cgct ct gc 3120  
 t aat cct gt t accagt ggct gct gccagt g gcgat aagt c gt gt ct t acc ggg t ggact 3180  
 caagacgat a gt t accggat aaggcgcagc ggt cgggct g aacgggggg t t cgt gcacac 3240  
 agcccagct t ggagcgaacg acct acaccg aact gagat a cct acagcgt gagct at gag 3300  
 aaagcgccac gct t cccgaa gggagaaaagg cggacaggt a t ccggt aagc ggcaggg t cg 3360  
 gaacaggaga gcgcacgagg gagct t ccag ggggaaacgc ct ggt at ct t t at agt cct g 3420  
 t cgggt t t cg ccacct ct ga ct t gagcgt c gat t t t t gt g at gct cgt ca ggggggcgga 3480  
 gcct at ggaa aaacgccagc aacgcggcct t t t t acggt t cct ggcct t t t gct ggcct t 3540  
 t t gct cacat gt t ct t t cct gcgt t at ccc ct gat t ct gt ggat aaccgt at t accgcct 3600

ES 2 675 174 T3

t t g a g t g a g c t g a t a c c g c t c g c c g c a g c c g a a c g a c c g a g c g c a g c g a g t c a g t g a g c g 3660  
 a g g a a g c g g a a g a g c g c c t g a t g c g g t a t t t t c t c c t t a c g c a t c t g t g c g g t a t t t c a c 3720  
 a c c g c a t a a a t t c c g a c a c c a t c g a a t g g t g c a a a a c c t t t c g c g g t a t g g c a t g a t a g c 3780  
 g c c c g g a a g a g a g t c a a t t c a g g g t g g t g a a t g t g a a a c c a g t a a c g t t a t a c g a t g t g c 3840  
 c a g a g t a t g c c g g t g t c t c t t a t c a g a c c g t t t c c c g c g t g g t g a a c c a g g c c a g c c a c g 3900  
 t t t c t g c g a a a a c g c g g g a a a a g t g g a a g c g g c g a t g g c g g a g c t g a a t t a c a t t c c c a 3960  
 a c c g c g t g g c a c a a c a a c t g g c g g g c a a a c a g t c g t t g c t g a t t g g c g t t g c c a c c t c c a 4020  
 g t c t g g c c c t g c a c g c g c c g t c g c a a a t t g t c g c g g c g a t t a a a t c t c g c g c c g a t c a a c 4080  
 t g g g t g c c a g c g t g g t g g t g t c g a t g g t a g a a c g a a g c g g c g t c g a a g c c t g t a a a g c g g 4140  
 c g g t g c a c a a t c t t c t c g c g c a a c g c g t c a g t g g g c t g a t c a t t a a c t a t c c g c t g g a t g 4200  
 a c c a g g a t g c c a t t g c t g t g g a a g c t g c c t g c a c t a a t g t t c c g g c g t t a t t t c t t g a t g 4260  
 t c t c t g a c c a g a c a c c c a t c a a c a g t a t t a t t t t c t c c c a t g a a g a c g g t a c g c g a c t g g 4320  
 g c g t g g a g c a t c t g g t c g c a t t g g g t c a c c a g c a a a t c g c g c t g t t a g c g g g c c a t t a a 4380  
 g t t c t g t c t c g g c g c t c t g c g t c t g g c t g g c t g g c a t a a a t a t c t c a c t c g c a a t c a a a 4440  
 t t c a g c c g a t a g c g g a a c g g g a a g g c g a c t g g a g t g c c a t g t c c g g t t t t c a c a a a c c a 4500  
 t g c a a a t g c t g a a t g a g g g c a t c g t t c c c a c t g c g a t g c t g g t t g c c a a c g a t c a g a t g g 4560  
 c g c t g g g c g c a a t g c g c g c c a t t a c c g a g t c c g g g c t g c g c g t t g g t g c g g a t a t c t c g g 4620  
 t a g t g g g a t a c g a c g a t a c c g a a g a c a g c t c a t g t t a t a t c c c g c c g t t a a c c a c c a t c a 4680  
 a a c a g g a t t t t c g c c t g c t g g g g c a a a c c a g c g t g g a c c g c t t g c t g c a a c t c t c t c a g g 4740  
 g c c a g g c g g t g a a g g g c a a t c a g c t g t t g c c c g t c t c a c t g g t g a a a a g a a a a a c c a c c c 4800  
 t g g c g c c c a a t a c g c a a a c c g c c t c t c c c c g c g c g t t g g c c g a t t c a t t a a t g a g c t g g 4860  
 c a c g a c a g g t t t c c c g a c t g g a a a g c g g g c a g t g a g c g c a a c g c a a t t a a t g t g a g t t a g 4920  
 c t c a c t c a t t a g g c a c c c c a g g c t t t a c a c t t t a t g c t t c c g g c t c g t a t g t t g t g g a 4980  
 a t t g t g a g c g g a t a a c a a t t t c a c a c a g g a a a c a g c t a t g a c c a t g a t t a c g g a t t c a c t 5040  
 g g c c g t c g t t t t a c a a c g t c g t g a c t g g g a a a a c c c t g g c g t t a c c c a a c t t a a t c g c c t 5100  
 t g c a g c a c a t c c c c c t t t c g c c a g c t g g c g t a a t a g c g a a g a g g c c c g c a c c g a t c g c c c 5160  
 t t c c c a a c a g t t g c g c a g c c t g a a t g g c g a a t g g c g c t t t g c c t g g t t t c c g g c a c c a g a 5220  
 a g c g g t g c c g g a a a g c t g g c t g g a g t g c g a t c t t c c t g a g g c c g a t a c t g t c g t c g t c c c 5280  
 c t c a a a c t g g c a g a t g c a c g g t t a c g a t g c g c c a t c t a c a c c a a c g t a a c c t a t c c c a t 5340  
 t a c g g t c a a t c c g c c g t t t g t t c c c a c g g a g a a t c c g a c g g g t t g t t a c t c g c t c a c a t t 5400  
 t a a t g t t g a t g a a a g c t g g c t a c a g g a a g g c c a g a c g c g a a t t a t t t t t g a t g g c g t t g g 5460  
 a a t t 5464

<210> 4

<211> 383

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión GST-PTH-CBD

10

<400> 4

ES 2 675 174 T3

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro  
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Gu Tyr Leu Gu Gu Lys Tyr Gu Gu His Leu  
20 25 30

Tyr Gu Arg Asp Gu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Gu Leu  
35 40 45

Gly Leu Gu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys  
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn  
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Gu Arg Ala Gu Ile Ser Met Leu Gu  
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser  
100 105 110

Lys Asp Phe Gu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Gu  
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Gu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn  
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp  
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu  
165 170 175

Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Gu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr  
180 185 190

Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala  
195 200 205

Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Ile Gu Gly  
210 215 220

Arg Ser Val Ser Gu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu  
225 230 235 240

Asn Ser Met Gu Arg Val Gu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val  
245 250 255

ES 2 675 174 T3

His Asn Gly Ile Asn Ser Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Gu Lys Gu  
 260 265 270  
 Pro Asn Asn Ser Lys Gu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile  
 275 280 285  
 Pro Val Ser Gly Thr Ile Gu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr  
 290 295 300  
 Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Gu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu  
 305 310 315  
 Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Gu Asn Asn Asn Ala  
 325 330 335  
 Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys  
 340 345  
 Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly  
 355 360 365  
 Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Gu Gly Ser Val Gly Arg  
 370 375 380

<210> 5

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de reconocimiento del factor Xa

10

<400> 5

Ile Gu Gly Arg  
1

15

<210> 6

<211> 1021

<212> PRT

<213> Clostridium histolítico

20

<400> 6

Met Lys Arg Lys Cys Leu Ser Lys Arg Leu Met Leu Ala Ile Thr Met  
1 5 10 15

Ala Thr Ile Phe Thr Val Asn Ser Thr Leu Pro Ile Tyr Ala Ala Val  
20 25 30

Asp Lys Asn Asn Ala Thr Ala Ala Val Gln Asn Gu Ser Lys Arg Tyr  
35 40 45

Thr Val Ser Tyr Leu Lys Thr Leu Asn Tyr Tyr Asp Leu Val Asp Leu  
50 55 60

ES 2 675 174 T3

Leu Val Lys Thr G u Ile G u Asn Leu Pro Asp Leu Phe G n Tyr Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Asp Ala Lys G u Phe Tyr G y Asn Lys Thr Arg Met Ser Phe Ile  
 85 90 95  
 Met Asp G u Ile G y Arg Arg Ala Pro G n Tyr Thr G u Ile Asp His  
 100 105 110  
 Lys G y Ile Pro Thr Leu Val G u Val Val Arg Ala G y Phe Tyr Leu  
 115 120 125  
 G y Phe His Asn Lys G u Leu Asn G u Ile Asn Lys Arg Ser Phe Lys  
 130 135 140  
 G u Arg Val Ile Pro Ser Ile Leu Ala Ile G n Lys Asn Pro Asn Phe  
 145 150 155 160  
 Lys Leu G y Thr G u Val G n Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr G y Leu  
 165 170 175  
 Leu Ala G y Asn G u Thr Ala Pro Pro G u Val Val Asn Asn Phe Thr  
 180 185 190  
 Pro Ile Leu G n Asp Cys Ile Lys Asn Ile Asp Arg Tyr Ala Leu Asp  
 195 200 205  
 Asp Leu Lys Ser Lys Ala Leu Phe Asn Val Leu Ala Ala Pro Thr Tyr  
 210 215 220  
 Asp Ile Thr G u Tyr Leu Arg Ala Thr Lys G u Lys Pro G u Asn Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Trp Tyr G y Lys Ile Asp G y Phe Ile Asn G u Leu Lys Lys Leu  
 245 250 255  
 Ala Leu Tyr G y Lys Ile Asn Asp Asn Asn Ser Trp Ile Ile Asp Asn  
 260 265 270  
 G y Ile Tyr His Ile Ala Pro Leu G y Lys Leu His Ser Asn Asn Lys  
 275 280 285  
 Ile G y Ile G u Thr Leu Thr G u Val Met Lys Val Tyr Pro Tyr Leu  
 290 295 300  
 Ser Met G n His Leu G n Ser Ala Asp G n Ile Lys Arg His Tyr Asp  
 305 310 315 320  
 Ser Lys Asp Ala G u G y Asn Lys Ile Pro Leu Asp Lys Phe Lys Lys  
 325 330 335

ES 2 675 174 T3

G u G y Lys G u Lys Tyr Oys Pro Lys Thr Tyr Thr Phe Asp Asp G y  
 340 345 350

Lys Val Ile Ile Lys Ala G y Ala Arg Val G u G u G u Lys Val Lys  
 355 360 365

Arg Leu Tyr Trp Ala Ser Lys G u Val Asn Ser G n Phe Phe Arg Val  
 370 375 380

Tyr G y Ile Asp Lys Pro Leu G u G u G y Asn Pro Asp Asp Ile Leu  
 385 390 400

Thr Met Val Ile Tyr Asn Ser Pro G u G u Tyr Lys Leu Asn Ser Val  
 405 410 415

Leu Tyr G y Tyr Asp Thr Asn Asn G y G y Met Tyr Ile G u Pro G u  
 420 425 430

G y Thr Phe Phe Thr Tyr G u Arg G u Ala G n G u Ser Thr Tyr Thr  
 435 440 445

Leu G u G u Leu Phe Arg His G u Tyr Thr His Tyr Leu G n G y Arg  
 450 455 460

Tyr Ala Val Pro G y G n Trp G y Arg Thr Lys Leu Tyr Asp Asn Asp  
 465 470 475 480

Arg Leu Thr Trp Tyr G u G u G y G y Ala G u Leu Phe Ala G y Ser  
 485 490 495

Thr Arg Thr Ser G y Ile Leu Pro Arg Lys Ser Ile Val Ser Asn Ile  
 500 505 510

His Asn Thr Thr Arg Asn Asn Arg Tyr Lys Leu Ser Asp Thr Val His  
 515 520 525

Ser Lys Tyr G y Ala Ser Phe G u Phe Tyr Asn Tyr Ala Oys Met Phe  
 530 535 540

Met Asp Tyr Met Tyr Asn Lys Asp Met G y Ile Leu Asn Lys Leu Asn  
 545 550 555 560

Asp Leu Ala Lys Asn Asn Asp Val Asp G y Tyr Asp Asn Tyr Ile Arg  
 565 570 575

Asp Leu Ser Ser Asn Tyr Ala Leu Asn Asp Lys Tyr G n Asp His Met  
 580 585 590

G n G u Arg Ile Asp Asn Tyr G u Asn Leu Thr Val Pro Phe Val Ala  
 595 600 605

Asp Asp Tyr Leu Val Arg His Ala Tyr Lys Asn Pro Asn G u Ile Tyr

ES 2 675 174 T3

610					615					620					
Ser 625	G u	I l e	Ser	G u	Val 630	Al a	Lys	Leu	Lys	Asp 635	Al a	Lys	Ser	G u	Val 640
Lys	Lys	Ser	G n	Tyr 645	Phe	Ser	Thr	Phe	Thr 650	Leu	Arg	G y	Ser	Tyr 655	Thr
G y	G y	Al a	Ser 660	Lys	G y	Lys	Leu	G u 665	Asp	G n	Lys	Al a	Met 670	Asn	Lys
Phe	I l e	Asp 675	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys 680	Leu	Asp	Thr	Tyr	Ser 685	Tr p	Ser	G y
Tyr	Lys 690	Thr	Leu	Thr	Al a	Tyr 695	Phe	Thr	Asn	Tyr	Lys 700	Val	Asp	Ser	Ser
Asn 705	Arg	Val	Thr	Tyr	Asp 710	Val	Val	Phe	Hi s	G y 715	Tyr	Leu	Pro	Asn	G u 720
G y	Asp	Ser	Lys	Asn 725	Ser	Leu	Pro	Tyr	G y 730	Lys	I l e	Asn	G y	Thr 735	Tyr
Lys	G y	Thr	G u 740	Lys	G u	Lys	I l e	Lys 745	Phe	Ser	Ser	G u	G y 750	Ser	Phe
Asp	Pro	Asp 755	G y	Lys	I l e	Val	Ser 760	Tyr	G u	Tr p	Asp	Phe 765	G y	Asp	G y
Asn 770	Lys	Ser	Asn	G u	G u	Asn 775	Pro	G u	Hi s	Ser	Tyr 780	Asp	Lys	Val	G y
Thr 785	Tyr	Thr	Val	Lys	Leu 790	Lys	Val	Thr	Asp	Asp 795	Lys	G y	G u	Ser	Ser 800
Val	Ser	Thr	Thr	Thr 805	Al a	G u	I l e	Lys	Asp 810	Leu	Ser	G u	Asn	Lys 815	Leu
Pro	Val	I l e	Tyr 820	Met	Hi s	Val	Pro	Lys 825	Ser	G y	Al a	Leu	Asn 830	G n	Lys
Val	Val	Phe 835	Tyr	G y	Lys	G y	Thr 840	Tyr	Asp	Pro	Asp	G y 845	Ser	I l e	Al a
G y	Tyr 850	G n	Tr p	Asp	Phe	G y 855	Asp	G y	Ser	Asp	Phe 860	Ser	Ser	G u	G n
Asn 865	Pro	Ser	Hi s	Val	Tyr 870	Thr	Lys	Lys	G y	G u 875	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu 880
Arg	Val	Met	Asp	Ser 885	Ser	G y	G n	Met	Ser 890	G u	Lys	Thr	Met	Lys 895	I l e

ES 2 675 174 T3

Lys Ile Thr Asp Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Glu Lys Glu Pro Asn  
 900 905 910

Asn Ser Lys Glu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly Ile Pro Val  
 915 920 925

Ser Gly Thr Ile Glu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp  
 930 935 940

Val Ile Thr Pro Gly Glu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys Leu Gly Tyr  
 945 950 955 960

Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Glu Asn Asn Asn Ala Val Ser  
 965 970 975

Tyr Ala Thr Asp Asp Gly Gln Asn Leu Ser Gly Lys Phe Lys Ala Asp  
 980 985 990

Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn Gly Ser Tyr  
 995 1000 1005

Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Glu Gly Ser Val Gly Arg  
 1010 1015 1020

<210> 7  
 <211> 84  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn  
 1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His  
 20 25 30

Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Leu Ala Pro Arg Asp Ala Gly Ser  
 35 40 45

Gln Arg Pro Arg Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Ser His Glu  
 50 55 60

Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asn Val Leu Thr Lys  
 65 70 75 80

10

Ala Lys Ser Gln

<210> 8  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 8

ES 2 675 174 T3

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

<210> 9

<211> 160

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> proteína de fusión Gly- Ser-PTH(1- 33)-CBD

10

<400> 9

Gly Ser Ser Val Ser Gu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His  
 1 5 10 15  
 Leu Asn Ser Met Gu Arg Val Gu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp  
 20 25 30  
 Val His Asn Gly Ile Asn Ser Pro Val Tyr Pro Ile Gly Thr Gu Lys  
 35 40 45  
 Gu Pro Asn Asn Ser Lys Gu Thr Ala Ser Gly Pro Ile Val Pro Gly  
 50 55 60  
 Ile Pro Val Ser Gly Thr Ile Gu Asn Thr Ser Asp Gln Asp Tyr Phe  
 65 70 75 80

ES 2 675 174 T3

Tyr Phe Asp Val Ile Thr Pro Gly Gu Val Lys Ile Asp Ile Asn Lys  
 85 90 95  
 Leu Gly Tyr Gly Gly Ala Thr Trp Val Val Tyr Asp Gu Asn Asn Asn  
 100 105 110  
 Ala Val Ser Tyr Ala Thr Asp Asp Gly G n Asn Leu Ser Gly Lys Phe  
 115 120 125  
 Lys Ala Asp Lys Pro Gly Arg Tyr Tyr Ile His Leu Tyr Met Phe Asn  
 130 135 140  
 Gly Ser Tyr Met Pro Tyr Arg Ile Asn Ile Gu Gly Ser Val Gly Arg  
 145 150 155 160

<210> 10

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> proteína de fusión PTH(7-33)-CBD

10

<400> 10

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

ES 2 675 174 T3

<210> 11  
<211> 35  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> PTH(1-33) con extensión terminal de GI-aminoácido Ser

10

<400> 11

Gly Ser Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His  
1 5 10 15

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp  
20 25 30

Val His Asn  
35

<210> 12  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

15

<220>  
<223> Secuencia de escisión de trombina

20

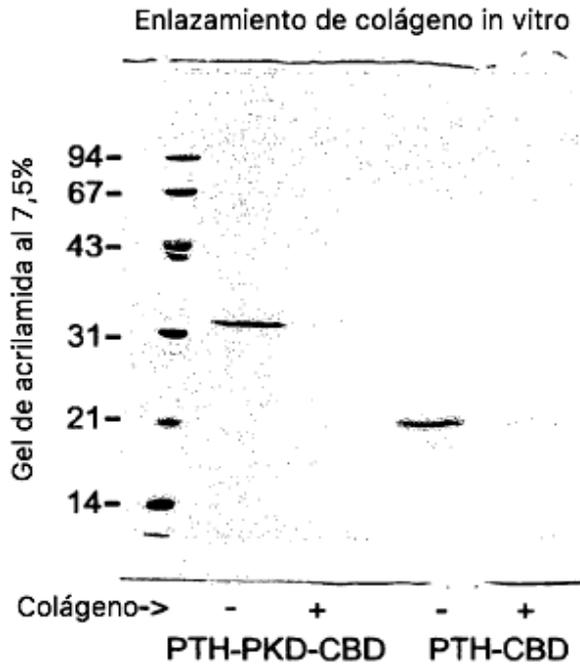
<400> 12

Leu Val Pro Arg Gly Ser  
1 5

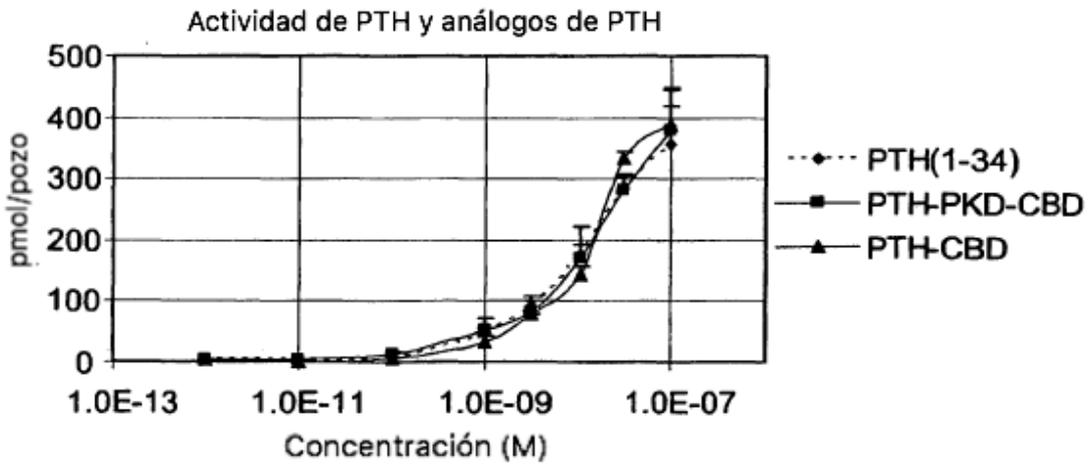
25

## REIVINDICACIONES

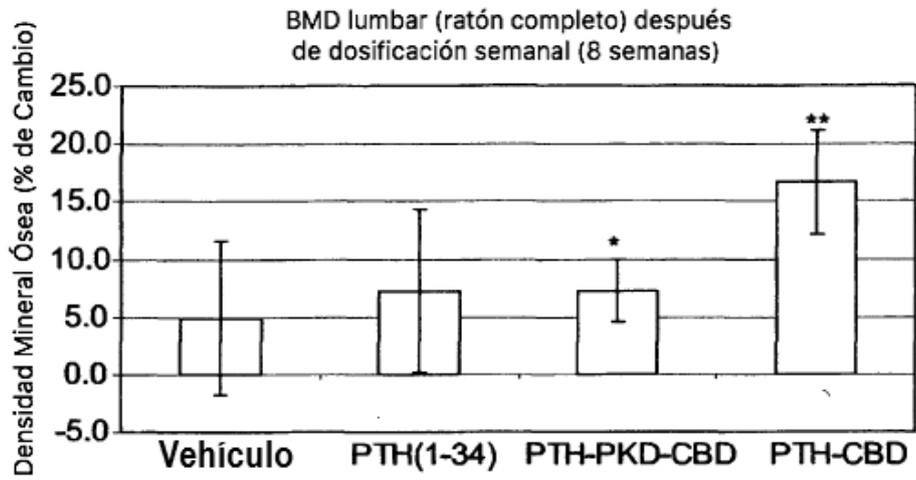
1. Una composición que comprende:
- 5 un segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno bacterial ColH o ColG enlazado a un modulador del receptor de PTH/PTHrP;
- en donde el modulador del receptor de PTH/PTHrP es un agonista del receptor de PTH/PTHrP y comprende una  
 10 secuencia seleccionada del grupo que consiste en residuos 1-33 de la SEQ ID NO: 1, PTH (SEQ ID NO: 7), residuos 1-14 de la SEQ ID NO: 1, residuos 1-34 de la SEQ ID NO: 7; y SEQ ID NO: 8 o
- en donde el modulador del receptor de PTH/PTHrP es un antagonista del receptor de PTH/PTHrP y comprende una  
 15 secuencia seleccionada del grupo que consiste en residuos 7-34 de la SEQ ID NO: 7, residuos 7-14 de la SEQ ID NO: 7; residuos 7-33 de SEQ ID NO: 7, residuos 7-34 de SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 11.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno comprende  
 20 residuos 38-158 de SEQ ID NO: 1, o es al menos 90% idéntico a los residuos 38-158 de SEQ ID NO: 1.
3. La composición de una cualquiera de la reivindicación 1 o 2, en donde el segmento de polipéptido que se enlaza a  
 25 colágeno y el agonista o antagonista del receptor de PTH/PTHrP se entrelazan químicamente entre sí o son porciones de polipéptido de una proteína de fusión.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición comprende además  
 30 residuos 807-900 de la SEQ ID NO: 6 enlazada covalentemente al N-terminal del segmento de polipéptido que se enlaza a colágeno.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el N-terminal del segmento de polipéptido  
 que se enlaza a colágeno se enlaza directamente o a través de un segmento de polipéptido enlazador al C-terminal del  
 35 polipéptido agonista o antagonista del receptor de PTH/PTHrP.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende la SEQ ID NO: 10.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición comprende la SEQ ID NO: 9.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en un tratamiento médico, en donde el  
 40 modulador del receptor de PTH/PTHrP es un agonista,
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento seleccionado  
 del grupo que consiste en: promover el crecimiento óseo, el crecimiento de tejido alrededor de un implante, la  
 45 reconstitución inmune para un mamífero que recibe una administración de células madre de médula ósea, movilización de células madre de médula ósea, o para el tratamiento de infarto de miocardio, alopecia inducida por quimioterapia, o pérdida genética de pelo;
- en donde el modulador del receptor de PTH/PTHrP es un agonista.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso en un tratamiento médico, en donde el  
 50 modulador del receptor PTH/PTHrP es un antagonista.
11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de  
 osteodistrofia renal, para reducir la incidencia de metástasis ósea de cáncer, para retardar el crecimiento de cáncer  
 metastático en hueso, o para tratar alopecia inducida por quimioterapia o la pérdida genética de pelo;
- en donde el modulador del receptor de PTH/PTHrP es un antagonista.
12. Una composición farmacéutica que comprende una composición como se describe en cualquiera de las  
 55 reivindicaciones 1 a 7 formulada para administración local y opcionalmente formulado para inyección.
13. Un implante ortopédico que comprende una composición que comprende un segmento de polipéptido que se enlaza  
 60 a colágeno enlazado a un agonista del receptor de PTH/PTHrP de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
14. Uso de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para promover el crecimiento del pelo, en donde  
 el uso no es un método de tratamiento.



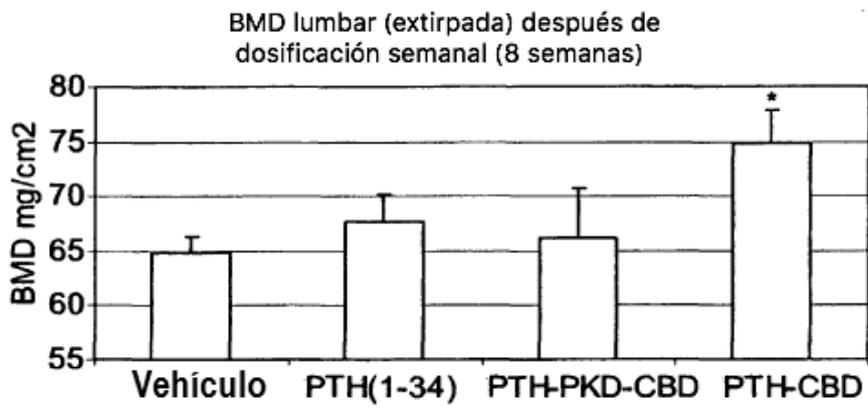
**Fig. 1**



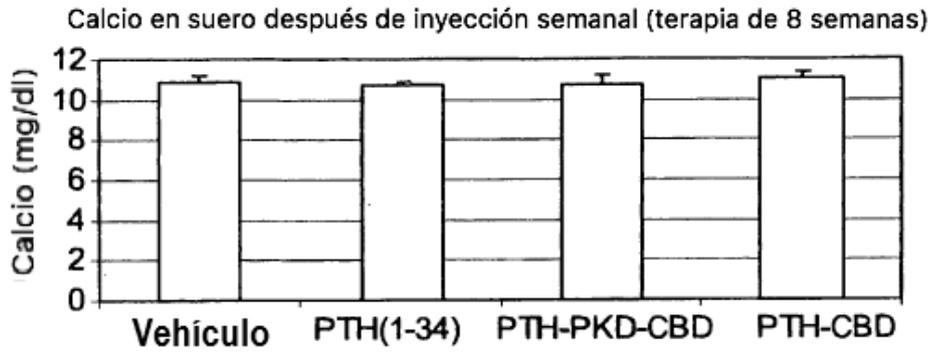
**Fig. 2**



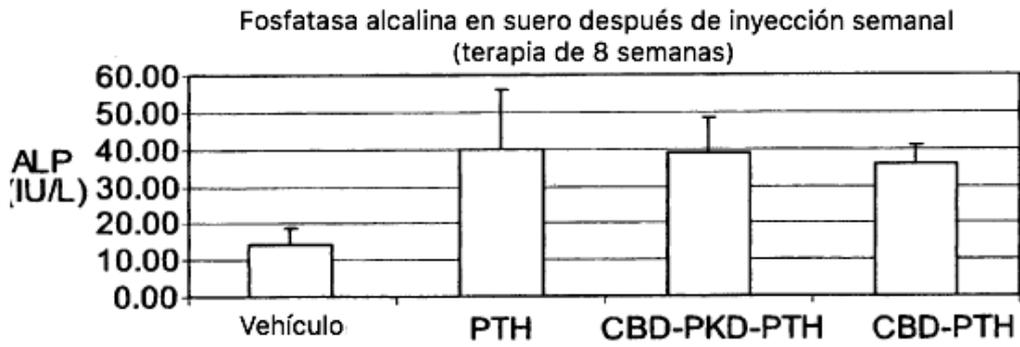
**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

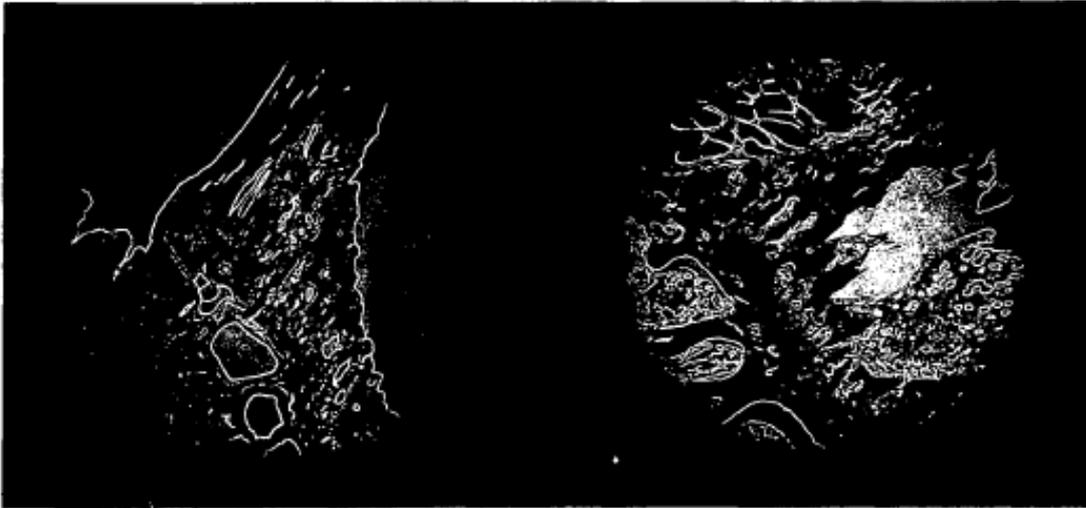


**Fig. 6**

Tibia Proximal, Tinción H&E (8 semanas)

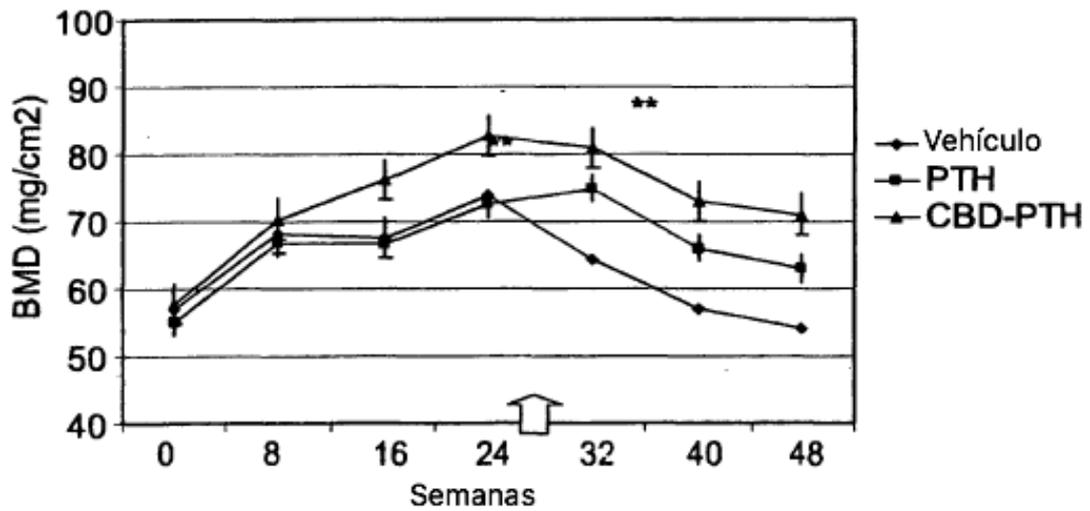
Vehículo

PTH-CBD

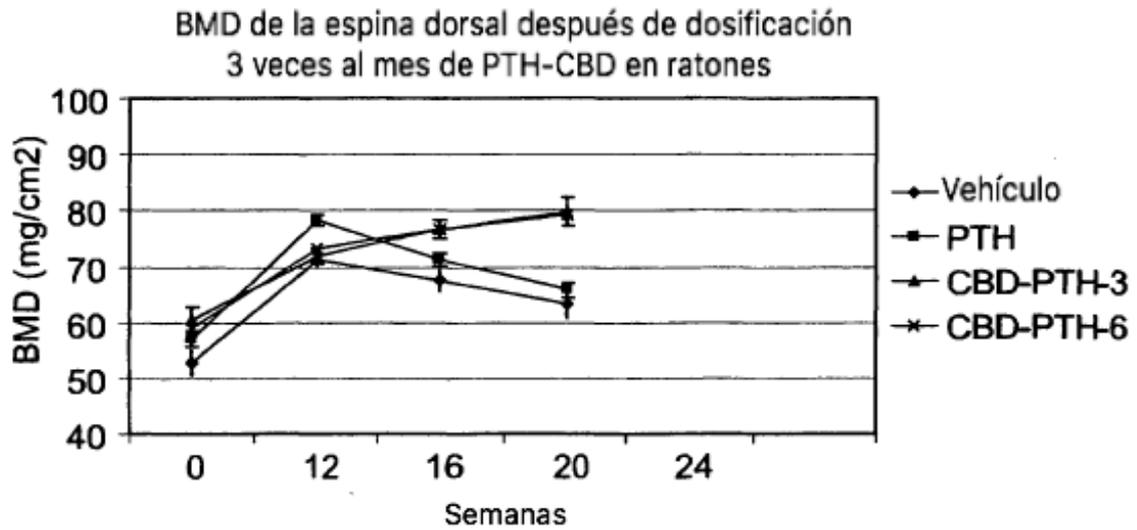


**Fig. 7**

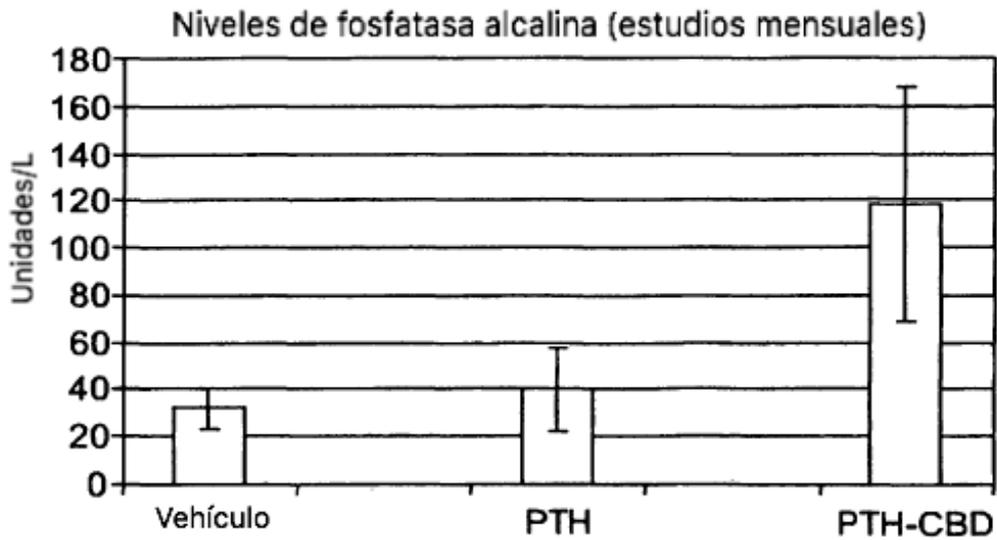
BMD de espina dorsal después de dosificación mensual en ratones



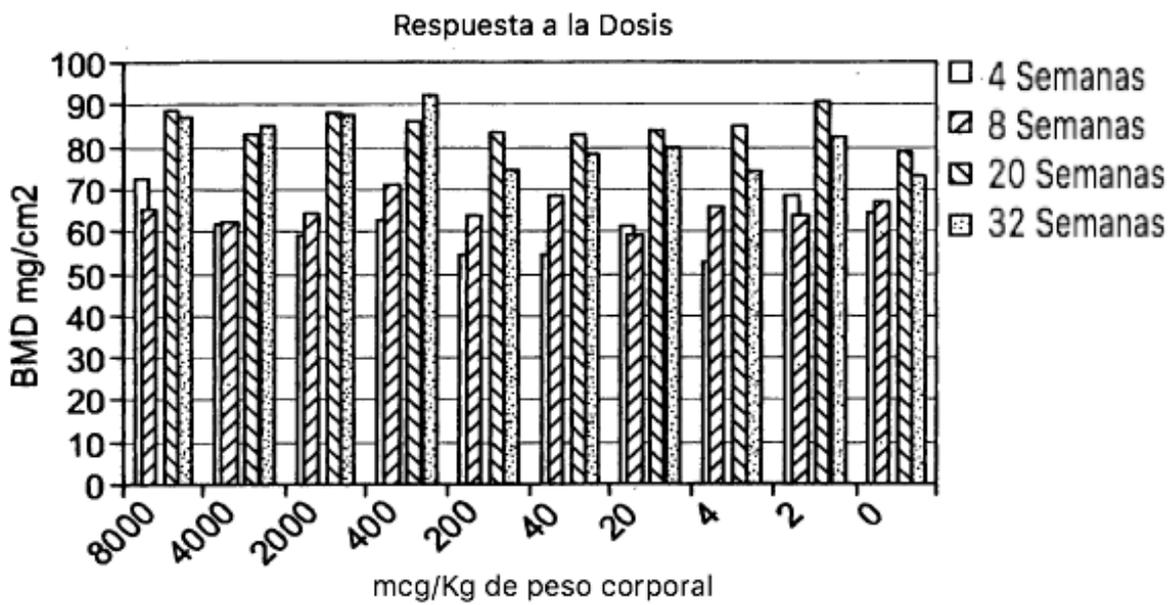
**Fig. 8**



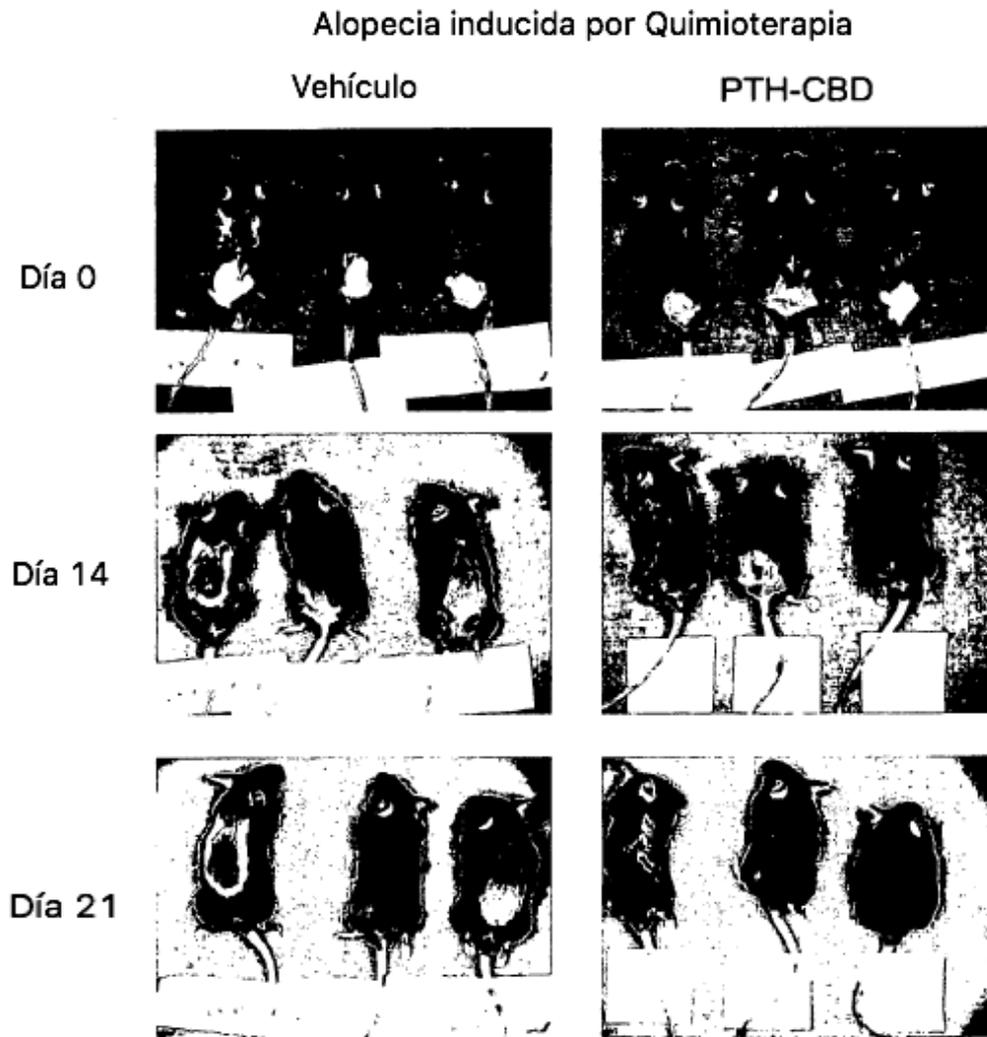
**Fig. 9**



**Fig. 10**



**Fig. 11**



**Fig. 12**