

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 549**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 31/47** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 38/22** (2006.01)  
**A61K 31/4709** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2015 PCT/EP2015/051279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15110547**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2015 E 15703742 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3096772**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de carcinomas hepatocelulares**

30 Prioridad:

**22.01.2014 EP 14305085**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.04.2019**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)**  
**101, rue de Tolbiac**  
**75013 Paris, FR;**  
**ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (APHP) (25.0%);**  
**UNIVERSITÉ DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES (25.0%) y**  
**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (25.0%)**

72 Inventor/es:

**COUVINEAU, ALAIN;**  
**VOISIN, THIERRY y**  
**COUVELARD, ANNE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 709 549 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**

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de carcinomas hepatocelulares

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de carcinomas hepatocelulares.

**Antecedentes de la invención**

10 El carcinoma hepatocelular (CHC) es el quinto cáncer más común en todo el mundo y la tercera causa más común de muertes relacionadas con el cáncer. La enfermedad a menudo se diagnostica tarde en el curso de la manifestación clínica. Como resultado, solo el 10-15% de los pacientes son candidatos para cirugía curativa. Para la mayoría de los pacientes con CHC, las quimioterapias sistémicas o las terapias de soporte son las opciones de tratamiento principales. Sin embargo, la mayoría de los agentes quimioterapéuticos muestran una eficacia limitada y no han podido mejorar la supervivencia del paciente. El curso clínico adverso de la mayoría de los pacientes con CHC subraya la gran necesidad de quimioterapias más eficaces y el desarrollo de estrategias de focalización.

15 Las orexinas (hipocretinas) comprenden dos neuropéptidos producidos en el hipotálamo: la orexina A (OX-A) (un péptido de 33 aminoácidos) y la orexina B (OX-B) (un péptido de 28 aminoácidos) (Sakurai T. et al., Cell, 1998, 92, 573-585). Se encontró que las orexinas estimulan el consumo de alimentos en ratas, que sugiere un papel fisiológico para estos péptidos como mediadores en el mecanismo de retroalimentación central que regula el comportamiento alimentario. Las orexinas regulan los estados de sueño y vigilia que abren enfoques terapéuticos potencialmente  
20 novedosos para los pacientes narcolépticos o insomnes. También se ha indicado que las orexinas desempeñan un papel en la excitación, la recompensa, el aprendizaje y la memoria. Se han clonado y caracterizado dos receptores de orexina en mamíferos. Pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (receptor transmembrana de 7 dominios) (Sakurai T. et al., Cell, 1998, 92, 573-585): el receptor de orexina-1 (OX1R o HCTR1) es más selectivo para OX-A que para OX-B y el receptor de orexina-2 (OX2R o HCTR2) se une a OX-A así como a OX-B. Un estudio reciente muestra que la activación de OX1R por orexina puede promover una apoptosis in vitro e in vivo fuerte en  
25 células cancerosas de colon, incluso cuando son resistentes al fármaco más utilizado en quimioterapia de cáncer de colon (Voisin T, El Firar A, Fasseu M, Rouyer-Fessard C, Descatoire V, Walker F, Paradis V, Bedossa P, Henin D, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. Cancer Res. 2011 May 1;71(9):3341-51).

30 Sorprendentemente, todos los tumores colorrectales primarios, independientemente de su localización y de los estadios de Dukes expresaron OX1R, mientras que los colonocitos adyacentes normales así como los tejidos control normales fueron negativos. Por lo tanto, este estudio apoya que OX1R es un talón de Aquiles de los cánceres de colon (incluso con quimiorresistencia) y sugiere que los agonistas de OX1R podrían ser nuevos candidatos para la terapia de cáncer de colon.

**35 Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de carcinomas hepatocelulares. En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

**Descripción detallada de la invención**

40 La presente invención se refiere a un agonista de OX1R para uso en el tratamiento del carcinoma hepatocelular en un sujeto que lo necesite.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "OX1R" tiene su significado general en la técnica y se refiere al receptor transmembrana de 7 dominios OX1R para orexinas. Según la invención, OX1R promueve la apoptosis en la línea celular de cáncer pancreático humano a través de un mecanismo que no está relacionado con la activación de la fosfolipasa C mediada por Gq ni con el calcio celular transitorio. Las orexinas inducen la fosforilación de tirosina de  
45 2 motivos basados en tirosina en OX1R, ITIM e ITSM, que da como resultado el reclutamiento de la fosfotirosina fosfatasa SHP-2, cuya activación es responsable de la apoptosis mitocondrial (Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M. A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. FASEB J. 2008 Jun;22(6): 1993-2002.;El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. FASEB J. 2009 Dec;23(12):4069-80. doi: 10.1096/fj.09-131367. Epub 2009 Aug 6.). Una  
50 secuencia de aminoácidos ilustrativa de OX1R se muestra como SEQ ID NO:1.

Receptor de orexina 1 OX1R (SEQ ID NO:1)

l mepsatpqaq mgvppgsrep spvppdyede flrylwrtyl ypkqyewvli aayvavfvva

61 lvgntlvcla vwmhmrvtv tnyfivnlsl advlvtaiel pasllvdite swlfghalck  
121 vipylqavsv svavltlsfi aldrwyaich pllfkstarr argsilgiwa vsclaimvpqa

181 avmecessvlp elantrrlfs vderwaddl ypkihscff ivtylaplgl mamayqifr

241 klwgrqipgt tsalvnmwkr psdqldleq glsgepprg raflaevkqm rarrktakml

301 mvvllvfc ylpisvlnvl krvgmfrqa sdreavyacf tfshwlvyan saanpiiyf

361 lsgkfreqfk aafscclplg gpcgskaps prssashksl slqsresisk isehvvtsv

421 ttvlp

- 5 En consecuencia, como se utiliza en la presente memoria, el término "agonista de OX1R" se refiere a cualquier compuesto que sea capaz de unirse a OX1R y promueva la actividad de OX1R que consiste en la activación de vías de transducción de señales que involucran el reclutamiento de SHP-2 y la inducción de la apoptosis de la célula, independientemente de la liberación transitoria de calcio.

En alguna realización, el agonista de OX1R es un anticuerpo de OX1R o una porción del mismo.

- 10 Como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo" incluye tanto anticuerpos naturales como no naturales. Específicamente, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos totalmente sintéticos, anticuerpos de cadena única y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede ser humanizado mediante métodos recombinantes para reducir su  
15 inmunogenicidad en el hombre.

- En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones  
20 de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente  
25 memoria, la porción del anticuerpo comprende una porción Fab del anticuerpo. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una porción F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una porción Fc del anticuerpo. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende una  
30 porción Fv del anticuerpo. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En algunas realizaciones de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en la presente memoria, la porción del anticuerpo comprende uno o más dominios CDR del anticuerpo.

- Los anticuerpos se preparan según la metodología convencional. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar  
35 utilizando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado a intervalos adecuados (p. ej., dos veces a la semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de OX1R. Al animal se le puede administrar un "refuerzo" final de antígeno en el plazo de una semana desde el sacrificio. A menudo es deseable utilizar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen  
40 adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante de Ribi, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos immunoestimulantes que contienen CpG. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en el campo. Los animales se pueden inmunizar por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras. Un animal dado se puede inmunizar con múltiples formas del antígeno por múltiples vías. Brevemente, el OX1R recombinante se puede proporcionar mediante expresión con  
45 líneas celulares recombinantes. En particular, OX1R se puede proporcionar en forma de células humanas que expresan OX1R en su superficie. Después del régimen de inmunización, los linfocitos se aíslan del bazo, ganglio linfático u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando un agente tal como el polietilenglicol para formar un hidridoma. Después de la fusión, las células se colocan en medios permisivos para el crecimiento de hibridomas pero no para los de fusión utilizando métodos estándar, como se describe (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology,  
50 Biochemistry and Immunology, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996). Después del cultivo de los hibridomas, se analizan los sobrenadantes celulares para determinar la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo,

inmunoprecipitación y transferencia Western. Otras técnicas de cribado son bien conocidas en el campo. Las técnicas preferidas son aquellas que confirman la unión de anticuerpos a antígenos plegados de forma nativa e intactos conformacionalmente, tal como el ELISA no desnaturizante, la citometría de flujo y la inmunoprecipitación.

5 Significativamente, como es bien sabido en la técnica, solo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está involucrada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento pero no están involucradas en la unión del antígeno. Un anticuerpo a partir del cual la región pFc' se ha escindido enzimáticamente, o que se ha producido sin la región pFc', designada como un fragmento F (ab')<sub>2</sub>, retiene  
10 ambos de los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo del que la región Fc se ha escindido enzimáticamente, o que se ha producido sin la región Fc, designada como fragmento Fab, retiene uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. A continuación, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una porción de la cadena pesada del anticuerpo conocida como Fd. Los fragmentos Fd son el principal determinante de especificidad del anticuerpo (un solo fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo de forma aislada.

Dentro de la porción de unión a antígeno de un anticuerpo, como es bien conocido en la técnica, existen regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), que interactúan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones marco (FR, por sus siglas en inglés), que mantienen la estructura terciaria del paratopo (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de la cadena pesada como en la cadena ligera de las inmunoglobulinas IgG, existen cuatro regiones marco (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente las CDR3 de cadena pesada, son en gran parte responsables de la especificidad del anticuerpo.

25 Ahora está bien establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden reemplazar con regiones similares de anticuerpos específicos o heteroespecíficos mientras se mantiene la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a las regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

30 Esta invención proporciona en ciertas realizaciones composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Como se utiliza en la presente memoria, "humanizado" describe anticuerpos en donde algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se reemplazan con aminoácidos correspondientes obtenidos a partir de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las Patentes de EE.UU. n° 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205. Las patentes de EE.UU. anteriores n° 5.585.089 y 5.693.761, y el documento WO90/07861 también proponen cuatro criterios posibles que se pueden utilizar en el diseño de anticuerpos humanizados. La primera propuesta fue para un aceptor, utilizar un marco de una inmunoglobulina humana particular que sea inusualmente homóloga a la inmunoglobulina del donante para ser humanizado, o utilizar un marco de consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta fue que si un aminoácido en el marco de la inmunoglobulina humana es inusual y el aminoácido donante en esa posición es típico de las secuencias humanas, entonces se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aceptor. La tercera propuesta fue que en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 CDR en la cadena de inmunoglobulina humanizada, se puede seleccionar el aminoácido donante en lugar del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta fue utilizar el aminoácido donante que reside en las posiciones marco en las que se predice que el aminoácido tendrá un átomo de cadena lateral dentro de 3Å de las CDR en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que será capaz de interactuar con las CDR. Los métodos anteriores son meramente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la técnica podría emplear para preparar anticuerpos humanizados. Un experto en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

50 En algunas realizaciones de las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se han reemplazado con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana pero donde algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR están sin alterar. Se permiten pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos, siempre y cuando no detengan la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían las moléculas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar al anticuerpo original. Sin embargo, utilizando ciertos métodos de humanización, la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo se puede incrementar utilizando métodos de "evolución dirigida", como lo describen Wu et al., *J. Mol. Biol.* 294:151, 1999.

60 Los anticuerpos monoclonales completamente humanos también se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véase, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y las referencias citadas en los mismos. Estos animales se han modificado genéticamente de modo que hay una eliminación funcional en la producción de anticuerpos endógenos (p. ej., murinos). Los animales se modifican adicionalmente para contener todo

o una parte del locus del gen de inmunoglobulina de línea germinal humana de modo que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (p. ej., XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), se pueden preparar anticuerpos monoclonales según la tecnología de hibridoma estándar. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos (KAMA) cuando se administren a humanos.

También existen métodos in vitro para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de visualización de fagos (patentes de EE.UU. nº 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación in vitro de células B humanas (patentes de EE.UU. nº 5.229.275 y 5.567.610).

Por lo tanto, como será evidente para un experto en la técnica, la presente invención también proporciona los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos quiméricos del fragmento F(ab')<sub>2</sub> en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos quiméricos del fragmento Fab en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos quiméricos del fragmento Fd en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas. La presente invención también incluye los denominados anticuerpos de cadena única.

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpos se pueden obtener a partir de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas conocidas comúnmente, que incluyen pero no se limitan a, IgA, IgA secretora, IgE, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen pero no se limitan a IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

En otra realización, el anticuerpo según la invención es un anticuerpo de dominio sencillo. El término "anticuerpo de dominio único" (sdAb) o "VHH" se refiere al dominio variable de cadena pesada única de anticuerpos del tipo que se pueden encontrar en mamíferos camélidos que están naturalmente desprovistos de cadenas ligeras. Tales VHH también se llaman "nanobody®". Según la invención, sdAb puede ser particularmente sdAb de llama.

En algunas realizaciones de los agentes descritos en la presente memoria, el agente es un polipéptido. En una realización particular, el polipéptido es un equivalente funcional de Orexina-A u Orexina-B.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "orexina-A" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:2.

Orexina-A (SEQ ID NO:2): peplpdccrck tcscryell hgagnhaagi ltl en donde pe significa piroglutamato.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "orexina-B" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:3.

Orexina-B (SEQ ID NO:3): rsgppglqgr lqrlqasgn haagiltm.

Como se utiliza en la presente memoria, también se incluye un polipéptido que es capaz de unirse a OX1R, promoviendo así una actividad OX1R según la invención. El término "equivalente funcional" incluye fragmentos, mutantes y muteínas de Orexina-A y Orexina-B. El término "funcionalmente equivalente" incluye, por lo tanto, cualquier equivalente de orexinas (es decir, Orexina-A u Orexina-B) obtenido mediante alteración de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo, mediante una o más deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos, de modo que el análogo de la proteína retiene la capacidad para unirse a OX1R y promover una actividad de OX1R según la invención (p. ej., apoptosis de la célula cancerosa). Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar, por ejemplo, mediante mutación puntual del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, el equivalente funcional es al menos 80% homólogo (es decir, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% homólogo) a la proteína correspondiente. En algunas realizaciones, el equivalente funcional es al menos 90% homólogo (es decir, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% homólogo) según se evalúa mediante cualquier algoritmo de análisis convencional tal como por ejemplo, el software de análisis de secuencias Pileup (Program Manual for the Wisconsin Package, 1996). El término "un fragmento funcionalmente equivalente" como se utiliza en la presente memoria también puede significar cualquier fragmento o conjunto de fragmentos de Orexina que se une a OX1R y promueve la actividad de OX1R según la invención. En consecuencia, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende aminoácidos consecutivos que tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de al menos una porción de Orexina-A u Orexina-B, cuya porción se une a OX1R y promueve la actividad OX1R según la invención. Los fragmentos funcionalmente equivalentes pueden pertenecer a la misma familia de proteínas que las Orexinas humanas identificadas en la presente memoria. Por "familia de proteínas" se entiende un grupo de proteínas que comparten una función común y exhiben una homología de secuencia común. Las proteínas homólogas se pueden obtener a partir de especies no humanas. En particular, la homología entre secuencias de proteínas funcionalmente equivalentes es

al menos del 80% en toda la secuencia. Más en particular, la homología es superior a 90% en toda la secuencia. Más en particular, la homología es superior a 95% en toda la secuencia.

5 En algunas realizaciones, el último resto de la SEQ ID NO:3, es decir, el resto de metionina en la posición 28 está amidado. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "amidación" tiene su significado general en la técnica y se refiere al método que consiste en producir un resto amida.

10 Los polipéptidos de la invención se pueden producir mediante cualquier medio adecuado, como será evidente para los expertos en la técnica. Con el fin de producir cantidades suficientes de polipéptidos o equivalentes funcionales de los mismos para su uso según la presente invención, la expresión se puede lograr convenientemente cultivando bajo condiciones apropiadas células hospedadoras recombinantes que contienen el polipéptido de la invención. En particular, el polipéptido se produce por medios recombinantes, mediante expresión a partir de una molécula de ácido nucleico codificante. Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedadoras son bien conocidos. Cuando se expresa en forma recombinante, el polipéptido se genera en particular mediante la expresión de un ácido nucleico codificante en una célula hospedadora. Se puede utilizar cualquier célula hospedadora, dependiendo de los requisitos individuales de un sistema en particular. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células de plantas, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino. Células HeLa, células de riñón de crías de hámster y muchas otras. Las bacterias también son hospedadores preferidos para la producción de proteínas recombinantes, debido a la facilidad con que las bacterias se pueden manipular y crecer. Un hospedador bacteriano preferido es *E. coli*.

25 Los métodos para producir polipéptidos amidados son bien conocidos en la técnica y normalmente implican el uso de enzimas de amidación. Como se utiliza en la presente memoria, el término "enzima de amidación" se define como las enzimas que pueden convertir el grupo carboxilo de un polipéptido en un grupo amida. Las enzimas capaces de la amidación C-terminal de péptidos se conocen desde hace mucho tiempo (Eipper et al. Mol. Endocrinol. 1987 November; 1 (11): 777). Los ejemplos de enzimas de amidación incluyen peptidilglicina  $\alpha$ -monooxigenasa (EC 1.14.17.3), denominada en la presente memoria PAM, y peptidilamidoglicolato liasa (EC 4.3.2.5), denominada en la presente memoria PGL. La preparación y purificación de tales enzimas PAM es familiar para el experto y se ha descrito en detalle (M. Nogudi et al. Prot. Expr. Purif. 2003, 28: 293). Una alternativa a la amidación "in vitro" por medio de PAM surge cuando la enzima se coexpresa en la misma célula hospedadora con la proteína precursora a amidar (es decir, SEQ ID NO:3). Esto se logra mediante la introducción de una secuencia de genes que codifica una actividad PAM en la célula hospedadora bajo el control de una secuencia reguladora específica del hospedador. Esta secuencia de expresión se puede incorporar de manera estable en la secuencia de ADN cromosómica respectiva, o estar presente en un segundo plásmido paralelo al plásmido de expresión para la proteína diana (es decir, SEQ ID NO:3), o se puede integrar como segundo casete de expresión en el mismo vector, o se puede clonar en un enfoque de expresión policistrónica en fase con la secuencia del gen que codifica la proteína diana (es decir, SEQ ID NO:3) bajo el control de la misma secuencia promotora. Un método adicional para la amidación se basa en el uso de mecanismos de autoescisión específicos de proteínas (Cottingham et al. Nature Biotech. Vol. 19, 974-977, 2001). Los métodos de amidación descritos anteriormente parten de un extremo C del péptido diana que se extiende mediante al menos un aminoácido glicina o alternativamente un péptido provisional. Métodos alternativos, también se describen en el documento WO2007036299. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de orexina (es decir, la SEQ ID NO:3) se elige para permitir la amidación de dicho polipéptido de orexina y, por lo tanto, puede comprender codones adicionales que codificarán un precursor extendido con glicina. Normalmente, el precursor extendido con glicina se parece a YGXX, donde Y representa el aminoácido que debe estar amidado y X representa cualquier aminoácido de modo que la enzima de amidación (p. ej., PAM) catalice la producción del polipéptido amidado a partir de dicho precursor extendido con glicina. En algunas realizaciones, el precursor extendido con glicina es MGRR.

En algunas realizaciones el polipéptido de la invención es una inmunoadhesina.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina" que se puede unir a OX1R) con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada a OX1R (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión para OX1R. En algunas realizaciones, la adhesina comprende los polipéptidos caracterizados por la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tales como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (que incluye IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

60 La secuencia de inmunoglobulina normalmente, pero no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina (región Fc). Las inmunoadhesinas pueden poseer muchas de las valiosas propiedades químicas y biológicas de los anticuerpos humanos. Dado que las inmunoadhesinas se pueden construir a partir de una secuencia de proteína humana con una especificidad deseada unida a una región bisagra de inmunoglobulina humana apropiada y a una secuencia de dominio constante (Fc), la especificidad de unión de interés se puede lograr utilizando componentes

completamente humanos. Tales inmunoadhesinas son mínimamente inmunogénicas para el paciente y son seguras para el uso crónico o repetido.

5 En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de secuencia nativa. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc variable. En otra realización más, la región Fc es una región Fc funcional. Como se utiliza en la presente memoria, el término "región Fc" se utiliza para definir una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variables. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana generalmente se define para extenderse desde un resto aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la misma. La porción de adhesión y la porción de secuencia de inmunoglobulina de la inmunoadhesina pueden estar unidas mediante un conector mínimo. La secuencia de inmunoglobulina normalmente, pero no necesariamente, es un dominio constante de inmunoglobulina. El resto de inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención se puede obtener a partir de los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgA, IgE, IgD o IgM, pero normalmente de IgG1 o IgG3.

10 15 Los polipéptidos de la invención, fragmentos de los mismos y proteínas de fusión (p. ej., inmunoadhesina) según la invención pueden exhibir modificaciones postraduccionales, que incluyen, pero no se limitan a glicosilaciones (p. ej., glicosilaciones ligadas a N o ligadas a O), miristilaciones, palmitilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (p. ej., serina/treonina o tirosina).

20 25 En realizaciones específicas, se contempla que los polipéptidos utilizados en los métodos terapéuticos de la presente invención se pueden modificar para mejorar su eficacia terapéutica. Dicha modificación de los compuestos terapéuticos se puede utilizar para disminuir la toxicidad, aumentar el tiempo circulatorio o modificar la biodistribución. Por ejemplo, la toxicidad de compuestos terapéuticos potencialmente importantes se puede disminuir significativamente mediante la combinación con una variedad de vehículos portadores de fármacos que modifican la biodistribución. En el ejemplo que añade dipéptidos puede mejorar la penetración de un agente circulante en el ojo a través de la barrera hemato retiniana mediante el uso de transportadores endógenos.

30 Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua. Se ha demostrado que varios polímeros solubles en agua modifican la distribución biológica, mejoran el modo de captación celular, cambian la permeabilidad a través de barreras fisiológicas; y modifican la velocidad de aclaramiento del cuerpo. Para lograr un efecto de direccionamiento o de liberación sostenida, se han sintetizado polímeros solubles en agua que contienen restos de fármacos como grupos terminales, como parte de la cadena principal, o como grupos colgantes en la cadena del polímero.

35 El polietilenglicol (PEG) se ha utilizado ampliamente como portador de fármacos, dado su alto grado de biocompatibilidad y facilidad de modificación. Se ha demostrado que la unión a varios fármacos, proteínas y liposomas mejora el tiempo de residencia y disminuye la toxicidad. El PEG se puede acoplar a agentes activos a través de los grupos hidroxilo en los extremos de la cadena y mediante otros métodos químicos; sin embargo, el propio PEG se limita como mucho a dos agentes activos por molécula. En un enfoque diferente, los copolímeros de PEG y aminoácidos se exploraron como nuevos biomateriales que retendrían las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando una mayor carga de fármaco), y que podrían estar sintéticamente diseñados para adaptarse a una variedad de aplicaciones.

40 45 Los expertos en la técnica están al tanto de las técnicas de PEGilación para la modificación eficaz de fármacos. Por ejemplo, VectraMed (Plainsboro, N.J.) ha utilizado polímeros para la liberación de fármacos que consisten en polímeros alternos de PEG y monómeros trifuncionales, tal como la lisina. Las cadenas de PEG (normalmente 2000 daltons o menos) están unidas a los grupos  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -amino de la lisina a través de enlaces estables de uretano. Tales copolímeros retienen las propiedades deseables de PEG, mientras proporcionan grupos colgantes reactivos (los grupos de ácido carboxílico de la lisina) a intervalos estrictamente controlados y predeterminados a lo largo de la cadena del polímero. Los grupos colgantes reactivos se pueden utilizar para la derivatización, reticulación o conjugación con otras moléculas. Estos polímeros son útiles para producir profármacos estables de larga circulación variando el peso molecular del polímero, el peso molecular de los segmentos de PEG y el enlace escindible entre el medicamento y el polímero. El peso molecular de los segmentos de PEG afecta el espaciamiento del complejo fármaco/grupo de enlace y a la cantidad de fármaco por peso molecular del conjugado (los segmentos de PEG más pequeños proporcionan una mayor carga de fármaco). En general, aumentar el peso molecular total del conjugado de copolímero de bloque aumentará la vida media circulatoria del conjugado. Sin embargo, el conjugado debe ser fácilmente degradable o tener un peso molecular por debajo de la filtración glomerular límite umbral (p. ej., menos de 60 kDa).

50 55 Además, dado que la cadena principal del polímero es importante para mantener la semivida circulatoria y la biodistribución, se pueden utilizar conectores para mantener el agente terapéutico en forma de profármaco hasta ser liberado de la cadena principal del polímero por un desencadenante específico, normalmente la actividad enzimática en el tejido diana. Por ejemplo, este tipo de liberación de fármaco activado por tejido es particularmente útil cuando se requiere la liberación a un sitio específico de biodistribución y el agente terapéutico se libera en o cerca del sitio de la patología. Las colecciones de grupos de enlace para uso en la liberación de fármacos activados son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden basar en la cinética de enzimas, la prevalencia de enzimas activas y la

especificidad de escisión de las enzimas específicas de enfermedades seleccionadas. Tales conectores se pueden utilizar para modificar la proteína o el fragmento de la proteína descrita en la presente memoria para la administración terapéutica.

- 5 En algunas realizaciones, el agonista de OX1R es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular.

Los aptámeros son oligonucleótidos o secuencias de oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden estar aislados a través de la Evolución Sistemática de los Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX, por sus siglas en inglés) de una colección de secuencias aleatorias. La colección de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta colección, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente limitada mostrada mediante una proteína de plataforma, tal como la tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de colecciones combinatorias mediante dos métodos híbridos.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "carcinoma hepatocelular" tiene su significado general en la técnica y se refiere al cáncer desarrollado en los hepatocitos. En general, el cáncer de hígado indica carcinoma hepatocelular en general. El CHC puede ser causado por un agente infeccioso como el virus de la hepatitis B (el VHB, en lo sucesivo, denominado VHB) o virus de la hepatitis C (VHC, en lo sucesivo, denominado VHC). En algunas realizaciones, el CHC es debido a esteatohepatitis alcohólica o esteatohepatitis no alcohólica (en lo sucesivo se puede abreviar como "NASH", por sus siglas en inglés). El término también incluye micro-metástasis hepática digestiva.

En algunas realizaciones, el CHC es CHC en etapa temprana, CHC no metastásico, CHC primario, CHC avanzado, CHC localmente avanzado, CHC metastásico, CHC en remisión o CHC recurrente. En algunas realizaciones, el CHC es extirpable localizado (es decir, tumores que están confinados a una porción del hígado que permite la extirpación quirúrgica completa), inextirpable localizado (es decir, los tumores localizados pueden ser inextirpables debido a que están involucradas estructuras de vasos sanguíneos cruciales o debido a que el hígado está dañado), o inextirpable (es decir, los tumores afectan a todos los lóbulos del hígado y/o se han diseminado a otros órganos (p. ej., pulmón, ganglios linfáticos, huesos). En algunas realizaciones, el CHC es, según las clasificaciones TNM, un tumor en estadio I (un solo tumor sin invasión vascular), un tumor en estadio II (un solo tumor con invasión vascular o múltiples tumores, ninguno superior a 5 cm), un tumor en estadio III (múltiples tumores, mayores de 5 cm, o tumores que involucran la rama principal de venas portales o hepáticas), un tumor en estadio IV (tumores con invasión directa de órganos adyacentes distintos de la vesícula biliar o perforación del peritoneo visceral), tumor N1 (metástasis en los ganglios linfáticos regionales) o tumor M1 (metástasis a distancia). En algunas realizaciones, el CHC es, según los criterios de estadificación de la AJCC (American Joint Commission on Cancer), estadios de CHC T1, T2, T3 o T4.

Como se utiliza en la presente memoria, "tratamiento" o "que trata" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluye los resultados clínicos. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, disminuir la extensión de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (p. ej., prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la propagación (p. ej., metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado de la enfermedad, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de uno o más medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, aumentar la calidad de vida, y/o prolongar la supervivencia. Por "tratamiento" también se abarca una reducción de las consecuencias patológicas de CHC. Los métodos de la invención contemplan uno o más de estos aspectos del tratamiento.

En algunas realizaciones, el agonista de OX1R de la invención se administra al sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente de OX1R para tratar el carcinoma hepatocelular a una relación razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance de un buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier sujeto en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y como factores bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la experiencia de la técnica empezar con dosis del compuesto a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. En particular, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a ser tratado. Un medicamento contiene normalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, en particular de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Generalmente, una cantidad eficaz del fármaco se

suministra a un nivel de dosis de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

5 Un objeto adicional de la invención se refiere a métodos para disminuir el tamaño de un carcinoma hepatocelular establecido en un paciente que lo necesite. Los métodos comprenden una etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de OX1R, siendo la cantidad suficiente para disminuir el tamaño del tumor. Los métodos también pueden incluir una etapa de identificar a un paciente que padece o tiene un carcinoma hepatocelular, p. ej. un tumor detectable, establecido. Un tumor "establecido" es un tumor con un tamaño suficiente para ser detectado utilizando métodos de detección habituales, p. ej. normalmente, el tumor tiene un tamaño de al menos aproximadamente 0,5 cm o más en al menos una dimensión y es detectable, p. ej. mediante palpación, mediante visualización (p. ej., rayos X, tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (PET/CT, por sus siglas en inglés), visualización por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés), ultrasonidos, etc.), o mediante algún otro medio. Se pueden utilizar mediciones de 1-, 2- y/o 3- dimensiones para determinar el tamaño y/o volumen del tumor. La administración de al menos un agonista de OX1R da como resultado una disminución en el tamaño del tumor, p. ej. al menos aproximadamente 10%, y generalmente aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, comparado con el tamaño de un tumor no tratado equivalente (p. ej., control). Una disminución de 100% indica la erradicación completa del tumor detectable.

20 Un objeto adicional de la invención se refiere a métodos para prevenir o ralentizar el crecimiento del carcinoma hepatocelular en un paciente que lo necesite, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de OX1R, siendo la cantidad suficiente para prevenir o ralentizar el crecimiento de al menos un carcinoma hepatocelular. La tasa de crecimiento del tumor (aumento de tamaño) se reduce, por ejemplo, al menos en aproximadamente 10%, y generalmente en aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100%, comparado con la tasa de crecimiento de un tumor no tratado comparable (p. ej., control). Una disminución de 100% en el crecimiento del tumor significa que el tumor deja de crecer (el crecimiento del tumor se detiene), y el tumor puede incluso disminuir en tamaño (tasa de crecimiento negativa) en respuesta a la administración del agonista.

25 El agonista de OX1R de la invención se puede combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

30 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inadecuada cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o coadyuvante de formulación de cualquier tipo.

35 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma unitaria de administración, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, para animales y seres humanos. Las formas unitarias de administración adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración en aerosoles, implantes, subcutáneas, transdérmicas, tópicas, intraperitoneales, intramusculares, intravenosas, subdérmicas, transdérmicas, intratecales e intranasales y formas de administración rectal.

40 En particular, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación apta para ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permite la constitución de soluciones inyectables.

45 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

50 Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

55 El agonista de OX1R de la invención se puede formular en una composición en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácidas (formadas con los grupos amino libres de la

5 proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

10 El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifungos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

15 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

20 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación farmacéutica y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

25 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución deberá estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido primero se hará isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la técnica teniendo en cuenta la presente descripción. Por ejemplo, una dosis se podría disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadir a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectar en el sitio de infusión propuesto. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis adecuada para el sujeto individual.

30 El agonista de OX1R de la invención se puede formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis aproximadamente. También se pueden administrar dosis múltiples.

35 Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p. ej., comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

40 En algunas realizaciones, el agonista de OX1R de la invención se utiliza en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (que incluye el topotecán análogo sintético); briostatina; callistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enedina (p. ej., caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11; dinemicina, que incluye dinemicina A; bifosfonatos, tal como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos antibióticos enediínicos cromoproteicos relacionados, aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (que incluye morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y deoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina,

marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedor de ácido fólico, tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina demecolcina; diaziquona; eflornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacáridos (PSK, por sus siglas en inglés); razoxano; rizoxina; sizofurano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p. ej., paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (p. ej., CPT-1 1); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Otro objeto de la invención se refiere a un método para tratar un carcinoma hepatocelular en un sujeto de la misma que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión de OX1R en una muestra de tejido tumoral obtenida del sujeto, ii) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa i) con un valor de referencia y iii) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de OX1R cuando el nivel determinado en la etapa i) es mayor que el valor de referencia.

El nivel de expresión de OX1R se puede determinar mediante cualquier método bien conocido en la técnica. Por ejemplo, los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Normalmente, el ácido nucleico contenido en las muestras (p. ej., células o tejidos preparados del paciente) se extrae primero según los métodos estándar, por ejemplo, utilizando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas de unión a ácidos nucleicos siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta después mediante hibridación (p. ej., análisis de transferencia Northern) y/o amplificación (p. ej., RT-PCR). Preferiblemente se prefiere la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real es particularmente ventajosa. Alternativamente, se puede utilizar un método de inmunohistoquímica (IHC). IHC proporciona específicamente un método para detectar dianas en una muestra o muestra de tejido in situ. La integridad celular general de la muestra se mantiene en IHC, lo que permite la detección tanto de la presencia como de la ubicación de las dianas de interés (es decir, OX1R). Normalmente, una muestra se fija con formalina, se embebe en parafina y se corta en secciones para la tinción y su posterior inspección con microscopía óptica. Los métodos actuales de IHC utilizan un marcaje directo o un marcaje secundario basado en anticuerpos o basado en hapteno. Los ejemplos de sistemas IHC conocidos incluyen, por ejemplo, EnVision™ (DakoCytomation), Powervision® (Immunovision, Springdale, AZ), el kit NBA™ (Zymed Laboratories Inc., Sur de San Francisco, CA), HistoFine® (Nichirei Corp, Tokio, Japón). En una realización particular, una sección de tejido tumoral se puede montar en un portaobjetos u otro soporte después de la incubación con anticuerpos dirigidos contra OX1R. Después, se pueden realizar inspecciones microscópicas en la muestra montada sobre un soporte sólido adecuado. Para la producción de fotomicrografías, las secciones que comprenden muestras se pueden montar sobre un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano, para resaltar mediante tinción selectiva la presencia de las proteínas de interés.

Un "valor de referencia" puede ser un "valor umbral" o un "valor de corte". Normalmente, un "valor umbral" o "valor de corte" se puede determinar experimentalmente, empíricamente o teóricamente. Un valor umbral también se puede seleccionar arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como lo reconocería un experto en la técnica. El valor umbral se debe determinar para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función del ensayo y el balance beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falso positivo y falso negativo). Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y, por lo tanto, el valor de umbral) se pueden determinar utilizando una curva de característica de funcionamiento del receptor (ROC) basada en datos experimentales. Normalmente, el valor umbral se obtiene a partir del nivel de expresión de OX1R (o proporción, o puntuación) determinado en una muestra de tejido tumoral obtenida a partir de uno o más sujetos que tienen una cantidad suficiente de nivel de OX1R para obtener un tratamiento eficaz con el agonista de OX1R. Además, se puede utilizar la medición retrospectiva de los niveles de expresión de OX1R (o proporción, o puntuaciones) en muestras históricas de sujetos almacenadas correctamente para establecer estos valores umbral.

Un objeto adicional de la invención se refiere a un método para seleccionar un fármaco para el tratamiento de carcinoma hepatocelular que comprende las etapas de i) proporcionar una pluralidad de sustancias de ensayo ii) determinar si las sustancias de ensayo son agonistas de OX1R y iii) seleccionar positivamente las sustancias de ensayo que son agonistas de OX1R.

Normalmente, el método de selección de la invención implica proporcionar células apropiadas que expresen el receptor de orexina-1 en su superficie. Tales células incluyen células de mamíferos, levaduras, *Drosophila* o *E. coli*. En particular, se utiliza un polinucleótido que codifica el receptor de orexina-1 para transfectar células para expresar el receptor. El receptor expresado después se pone en contacto con una sustancia de ensayo y un ligando del receptor de orexina-1 (p. ej., orexinas), según sea apropiado, para observar la activación de una respuesta funcional tal como el reclutamiento de SHP-2 y la inducción de la apoptosis celular de la célula. Los ensayos funcionales se pueden realizar como se describe en El Firar A, Voisin T, Rouyer-Fessard C, Ostuni MA, Couvineau A, Laburthe M. Discovery of a functional immunoreceptor tyrosine-based switch motif in a 7-transmembrane-spanning receptor: role in the orexin receptor OX1R-driven apoptosis. FASEB J. 2009 Dec;23(12):4069-80. doi: 10.1096/fj.09-131367. Epub 2009 Aug 6. En particular, las etapas de comparación pueden implicar comparar la actividad inducida por la sustancia de ensayo y la actividad inducida por un agonista OX1R bien conocido, tal como orexina. En particular, se seleccionan positivamente sustancias capaces de tener una actividad similar o incluso mejor que un agonista de OX1R bien conocido.

Normalmente, el método de selección de la invención también puede implicar la selección de sustancias de ensayo capaces de unirse al receptor de orexina-1 presente en la superficie celular. Normalmente, la sustancia de ensayo se marca (p. ej., con un marcador radiactivo) y la unión se compara con un agonista de OX1R bien conocido tal como la orexina. La preparación se incuba con OX1R marcado y los complejos de sustancias de ensayo unidos a NGAL se aíslan y se caracterizan según los métodos de rutina conocidos en la técnica. Alternativamente, el OX1R se puede unir a un soporte sólido de modo que las moléculas de unión solubilizadas de las células se unen a la columna y después se eluyen y caracterizan según los métodos de rutina. En otra realización, un compartimento celular se puede preparar a partir de una célula que expresa una molécula que se une a NGAL tal como una molécula de una vía de señalización o reguladora modulada por NGAL. La preparación se incuba con NGAL marcado en ausencia o en presencia de un compuesto candidato. La capacidad del compuesto candidato para unirse a la molécula de unión se refleja en la disminución de la unión del ligando marcado.

Normalmente, el compuesto candidato se selecciona del grupo que consiste en pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, polipéptidos u oligonucleótidos.

Las sustancias de ensayo que se han seleccionado positivamente se pueden someter a etapas de selección adicionales con el fin de ensayar sus propiedades para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Por ejemplo, los compuestos candidatos que se han seleccionado positivamente se pueden someter a etapas de selección adicionales con el fin de ensayar más a fondo sus propiedades en modelos animales para el carcinoma hepatocelular.

Los ensayos anteriores se pueden realizar utilizando técnicas de detección de alto rendimiento para identificar sustancias de ensayo para desarrollar fármacos que puedan ser útiles para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Las técnicas de detección de alto rendimiento se pueden llevar a cabo utilizando placas de múltiples pocillos (p. ej., placas de 96, 389 o 1536 pocillos), para llevar a cabo múltiples ensayos utilizando un sistema robótico automatizado. Por lo tanto, las colecciones grandes de sustancias de ensayo se pueden ensayar de una manera altamente eficiente. Más particularmente, las células transfectadas de manera estable que crecen en pocillos de placas de microtitulación (96 pocillos o 384 pocillos) se pueden adaptar a la selección de alto rendimiento de colecciones de compuestos. Los compuestos en la colección se aplicarán a la vez de forma automatizada a los pocillos de las placas de microtitulación que contienen las células transgénicas descritas anteriormente. Una vez que se identifican las sustancias de ensayo que activan las señales apoptóticas, se pueden seleccionar positivamente para una caracterización adicional. Estos ensayos ofrecen varias ventajas. La exposición de la sustancia de ensayo a una célula completa permite la evaluación de su actividad en el contexto natural en el que puede actuar la sustancia de ensayo. Debido a que este ensayo se puede realizar fácilmente en un formato de placa de microtitulación, los ensayos descritos se pueden realizar mediante un sistema robótico automatizado, que permite ensayar grandes cantidades de muestras de ensayo dentro de un marco de tiempo razonablemente corto. Los ensayos de la invención se pueden utilizar como un cribado para evaluar la actividad de un compuesto o extracto no ensayado previamente, en cuyo caso se ensaya una concentración única y se compara con los controles. Estos ensayos también se pueden utilizar para evaluar la potencia relativa de un compuesto ensayando un intervalo de concentraciones, en un intervalo de 100  $\mu$ M a 1 nM, por ejemplo, y calculando la concentración a la cual la apoptosis es máxima.

La presente invención también se refiere a un método para visualizar el carcinoma hepatocelular y/o la metastasis hepática digestiva en un sujeto que lo necesite, que comprende las etapas de i) administrar al sujeto una cantidad de ligando OX1R marcado con una sustancia detectable y ii) detectar la presencia del ligando en el sujeto.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "ligando OX1R" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier molécula (natural o no) que tiene la capacidad de unirse a OX1R. Normalmente, los ligandos de OXR incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que son equivalentes funcionales de Orexina-A u Orexina-B, y anticuerpos de OX1R.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "marcado", con respecto al ligando OX1R, pretende abarcar el marcado directo del ligando de OX1R mediante acoplamiento (es decir, la unión física) de una sustancia detectable.

Las sustancias detectables normalmente incluyen, pero no se limitan a, agentes de visualización radiológica, agentes de visualización óptica, agentes de visualización PET, agentes de contraste MRI, agentes de contraste CT y agentes de visualización FRET.

5 La sustancia detectable puede ser un ion metálico radiactivo, es decir, un radiometal. Los radiometales adecuados pueden ser emisores de positrones tales como  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{48}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{94}\text{mTc}$  o  $^{68}\text{Ga}$ ; emisores gamma tales como  $^{99\text{m}}\text{Tc}$   $^{111}\text{In}$   $^{113\text{m}}\text{In}$  o  $^{67}\text{Ga}$  o emisores beta tales como  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{136}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  o  $^{192}\text{Ir}$ . En esta realización particular, los quelantes de poliamino policarboxilato tales como el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) también se desarrollaron para  
10 marcar radiometales. Estos quelantes permiten marcar con radioisótopos adecuados para la visualización, tales como  $^{111}\text{In}$  para tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT, por sus siglas en inglés) y  $^{68}\text{Ga}$  para tomografía por emisión de positrones (PET). Los poliamino policarboxilatos también son quelantes adecuados para los isótopos  $^{90}\text{Y}$  y  $^{177}\text{Lu}$ .

15 La sustancia detectable puede ser un ion metálico paramagnético, tales iones metálicos adecuados incluyen:  $\text{Gd(III)}$ ,  $\text{Mn(II)}$ ,  $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{Cr(III)}$ ,  $\text{Fe(III)}$ ,  $\text{Co(II)}$   $^{1}\text{Er(II)}$   $^{1}\text{Ni(II)}$ ,  $\text{Eu(III)}$  o  $\text{Dy(III)}$ .

La sustancia detectable puede ser un halógeno radiactivo gamma. El radiohalógeno se elige adecuadamente entre  $^{123}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$  o  $^{77}\text{Br}$ .

La sustancia detectable puede ser un no metal emisor de positrones radioactivo. Tales emisores de positrones adecuados incluyen:  $^{11}\text{C}$ ,  $^{23}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{F}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$  o  $^{124}\text{I}$ .

20 La sustancia detectable puede ser un núcleo activo de RMN hiperpolarizado. Tales núcleos activos de RMN pueden tener un espín nuclear distinto de cero, e incluyen  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$ . Por el término "hiperpolarizado" se entiende el aumento del grado de polarización del núcleo activo de RMN sobre su polarización de equilibrio. La abundancia natural de  $^{13}\text{C}$  (en relación a  $^{12}\text{C}$ ) es aproximadamente 1%, y los compuestos marcados con  $^{13}\text{C}$  adecuados se enriquecen adecuadamente a una abundancia de al menos 5%, preferiblemente de al menos 50%, más  
25 preferiblemente de al menos 90% antes de ser hiperpolarizados. Al menos un átomo de carbono del agente de visualización de la invención está enriquecido adecuadamente con  $^{13}\text{C}$ , que posteriormente se hiperpolariza.

La sustancia detectable puede ser un indicador adecuado para visualización óptica in vivo, el indicador es cualquier resto capaz de ser detectado directa o indirectamente en un procedimiento de visualización óptica. El indicador puede ser un dispersor de luz (p. ej., una partícula de color o sin color), un absorbedor de luz o un emisor de luz. Más preferiblemente, el indicador es un colorante tal como un cromóforo o un compuesto fluorescente. El colorante puede ser cualquier colorante que interactúe con la luz en el espectro electromagnético con longitudes de onda desde la luz ultravioleta hasta el infrarrojo cercano. Más preferiblemente, el indicador tiene propiedades fluorescentes. Los indicadores fluorofóricos y cromofóricos orgánicos típicos incluyen grupos que tienen un extenso sistema de electrones deslocalizados, p. ej. cianinas, merocianinas, indocianinas, ftalocianinas, naftalocianinas, trifenilmetinas, porfirinas, colorantes de pirilio, colorantes de tiapirilio, colorantes de escuarilio, colorantes de croconio, colorantes de azuleno, indoanilinas, colorantes de benzofenoxazinio, colorantes de benzotiafenotiazinio, antraquinonas, naftoquinonas, indatrenos, ftaloilacridonas, trisfenoquinonas, colorantes azo, colorantes de transferencia de carga intramolecular e intermolecular y complejos de colorantes, troponas, tetrazinas, complejos bis (ditioleno), complejos bis(benceno-ditiolato), colorantes yodoanilina, complejos bis(S,O-ditioleno). Las proteínas fluorescentes, tal como la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) y las modificaciones de GFP que tienen diferentes propiedades de absorción/emisión también son útiles. Los complejos de ciertos metales de tierras raras (por ejemplo, europio, samario, terbio o disprosio) se utilizan en ciertos contextos, al igual que los nanocristales fluorescentes (puntos cuánticos).

35 Ejemplos particulares de cromóforos que se pueden utilizar incluyen: fluoresceína, sulforodamina 101 (rojo Texas), rodamina B, rodamina 6G, rodamina 19, verde de indocianina, Cy2, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy7, azul Marino, azul Pacífico, verde Oregon 88, verde Oregon 514, tetrametilrodamina y fluor Alexa 350, fluor Alexa 430, fluor Alexa 532, fluor Alexa 546, fluor Alexa 555, fluor Alexa 568, fluor Alexa 594, fluor Alexa 633, fluor Alexa 647, fluor Alexa 660, fluor Alexa 680, fluor Alexa 700 y fluor Alexa 750.

45 Los colorantes que tienen máximos de absorción en la región visible o infrarroja cercana (NIR), entre 400 nm y 3  $\mu\text{m}$ , particularmente entre 600 y 1300 nm son particularmente preferidos. Las modalidades de visualización óptica y las técnicas de medición incluyen, pero no se limitan a: visualización por luminiscencia; endoscopia; endoscopia de fluorescencia; tomografía de coherencia óptica, visualización por transmitancia; visualización por transmitancia resuelta en el tiempo; visualización confocal; microscopia no lineal; visualización fotoacústica; visualización acústica-óptica; espectroscopia; espectroscopia de reflectancia; interferometría; interferometría de coherencia; tomografía óptica difusa y tomografía óptica difusa mediada por fluorescencia (onda continua, sistemas de dominio de tiempo y de dominio de frecuencia), y medición de dispersión de luz, absorción, polarización, luminiscencia, vida útil de fluorescencia, rendimiento cuántico y extinción.

55 Las sustancias detectables preferidas son aquellas que se pueden detectar externamente de una manera no invasiva después de la administración in vivo. Los restos visualizables más preferidos son los radiactivos, especialmente los iones metálicos radiactivos, los halógenos radiactivos emisores gamma y los no metales radiactivos emisores de

positrones, particularmente aquellos adecuados para visualización utilizando tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o tomografía por emisión de positrones (PET).

5 Las técnicas para conjugar moléculas detectables a polipéptidos y, en particular, anticuerpos, son bien conocidas en la técnica (véase, p. ej., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," en Controlled Drug Delivery (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58. Véase también, p.ej., la publicación PCT n° WO 89/12624.). Normalmente, la molécula de ácido nucleico se une covalentemente a lisinas o cisteínas en el anticuerpo, a través de la funcionalidad éster de N-hidroxisuccinimida o maleimida, respectivamente. Se ha dado a conocer los métodos de conjugación utilizando cisteínas modificadas genéticamente o la incorporación de aminoácidos no naturales para mejorar la homogeneidad del conjugado (Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., et al. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 16101-16106.; Junutula, J.R., Flagella, K.M., Graham, R.A., Parsons, K.L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D.L., Li, G., et al. (2010). Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. Clin. Cancer Res. 16, 4769-4778.). Junutula et al. (2008) desarrollaron una conjugación específica de sitio basada en cisteína llamada "THIOMABS" (TDC) que se reivindica que muestra un índice terapéutico mejorado en comparación con los métodos de conjugación convencionales. La conjugación con aminoácidos no naturales que se han incorporado al anticuerpo también se está explorando para ADC; sin embargo, la generalidad de este enfoque aún no se ha establecido (Axup et al., 2012). En particular, el experto en la técnica también puede prever un polipéptido que contiene Fc modificado genéticamente con una etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo (p. ej., etiquetas de péptidos que contienen Gin o etiquetas Q) o una glutamina endógena que se hace reactiva mediante modificación genética de polipéptidos (p. ej., mediante la eliminación, inserción, sustitución o mutación de aminoácidos en el polipéptido). Después, una transglutaminasa, se puede entrecruzar covalentemente con un agente donador de amina (p. ej., una molécula pequeña que comprende o se une a una amina reactiva) para formar una población estable y homogénea de un conjugado polipeptídico que contiene Fc modificado genéticamente con el agente donador de aminas estando conjugado específicamente en el sitio al polipéptido que contiene Fc a través de la etiqueta que contiene glutamina donadora de acilo o la glutamina endógena accesible/expuesta/reactiva (el documento WO 2012059882).

35 La cantidad del ligando marcado utilizado en el método de visualización descrito en la presente memoria dependerá de una variedad de factores, que incluye la identidad del ligando diana, la identidad de la sustancia detectable, los medios disponibles para detectar el agente de visualización, los medios utilizados para administrar el ligando al sujeto, y el peso del sujeto. En general, los ligandos se administrarán a un sujeto en un método de visualización en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 50 mg. Los ejemplos particulares incluyen aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10 mg, y desde aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg. En ejemplos no limitantes, aproximadamente 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg o 10 mg de un ligando de la invención puede ser una cantidad adecuada de ligando para administrarse a un sujeto para uso en los métodos de visualización descritos en la presente memoria.

45 Normalmente, el ligando se administra al sujeto por vía parenteral, p. ej., por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intratecal. Sin embargo, el experto en la materia entenderá que, en algunos casos, la administración puede ser oral, sublingual, intranasal, intraocular, rectal, transdérmica, mucosa, pulmonar o tópica.

50 Además de detectar los ligandos, el experto en la materia entenderá que la cantidad de señal detectada se puede comparar con otros valores, como los valores de control de un sujeto que se sabe que no tiene carcinoma hepatocelular y/o micrometástasis hepáticas digestivas, o con valores obtenidos en una fecha anterior del mismo sujeto. En algunas realizaciones, el método comprende además medir la cantidad del ligando en el sujeto, y opcionalmente comparar adicionalmente la cantidad medida con un valor control o con un valor obtenido en un tiempo anterior en el mismo sujeto.

55 Los medios adecuados para detectar un ligando de la invención que comprende un agente de visualización radiológica incluyen, pero no se limitan a sistemas de visualización radiológica, visualización MRI, SPECT-CT y PET. Los medios adecuados para detectar un ligando que comprende un agente de visualización óptica incluyen, pero no se limitan a citometría de flujo, microscopía confocal, clasificadores de células activadas por fluorescencia y sistemas de visualización por fluorescencia como Lumina II.

Una vez que se detectan el carcinoma hepatocelular y/o la micrometástasis hepática digestiva, el sujeto se puede tratar con un agonista de OX1R según la invención.

60 La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

## Figuras

Figura 1. Panel A: el inhibidor NSC-87877 de la proteína tirosina fosfatasa SHP bloquea el crecimiento inhibitorio de SK-HEP-1 inducido por orexina. Las células SK-HEP-1 se estimularon con (negro) o sin (blanco) orexina-A 1  $\mu$ M durante 48 h en ausencia (sin) o presencia de NSC-87877 (50  $\mu$ M). Al final del tratamiento, las células adherentes se tripsinizaron y las células que excluían el azul de tripano se contaron para medir el crecimiento de las células SK-HEP-1. Panel B: Efecto de la inoculación de orexina-A en el crecimiento de tumores desarrollados mediante xenoinjerto de células SK-HEP-1 cancerosas CHC humanas en ratones desnudos. Las células SK-HEP-1 se inocularon en el flanco de ratones desnudos en el día 0. Los ratones se inyectaron 2 veces a la semana por vía intraperitoneal con 100  $\mu$ l de soluciones de orexina-A (0,23  $\mu$ mol/kg) a partir del día 0 (círculo blanco) o el día 22 (triángulo) o con 100 ml de PBS (círculo negro) para los controles.

## Ejemplo

Las orexinas son péptidos hipotalámicos involucrados en el control sueño/vigilia. Hemos demostrado que las orexinas promueven la apoptosis robusta en células de cáncer colorrectal (Voisin T, El Firar A, Fasseu M, Rouyer-Fessard C, Descatoire V, Walker F, Paradis V, Bedossa P, Henin D, Lehy T, Laburthe M. (2011) Aberrant expression of OX1 receptors for orexins in colon cancers and liver metastases: an openable gate to apoptosis. *Cancer Res.* 71:3341-51.). La muerte celular está mediada por el receptor de orexina 1 (OX1R) a través de un mecanismo original que implica la presencia de dos ITIM (motivo inhibidor del inmunoreceptor de tirosina) en la secuencia de OX1R y el reclutamiento y activación de la tirosina fosfatasa SHP-2 (Voisin T, El Firar A, Rouyer-Fessard C, Gratio V, Laburthe M. (2008) A hallmark of immunoreceptor, the tyrosine-based inhibitory motif ITIM, is present in the G protein-coupled receptor OX1R for orexins and drives apoptosis: a novel mechanism. *FASEB J.* 22:1993-2002.). El OX1R, un GPCR de clase A, se expresa de forma aberrante en tumores colorrectales primarios, adenocarcinoma pancreático y metástasis hepáticas. El CHC es una neoplasia maligna primaria del hígado y representa la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo. El pilar del tratamiento es la extirpación y la quimioterapia, pero muchos tumores son inextirpables en la presentación. Hemos demostrado la expresión de OX1R mediante inmunohistoquímica en CHC utilizando una micromatriz de tejido (TMA, por sus siglas en inglés) que sugiere la expresión ectópica de OX1R. Los objetivos de este estudio fueron: 1/ investigar la presencia de OX1R en líneas celulares de CHC humanas y analizar los efectos de la orexina-A en relación con la apoptosis; 2/ desarrollar un modelo de xenoinjerto heterotópico in vivo a partir de las líneas celulares que expresan OX1R, para el estudio del crecimiento tumoral en respuesta a Orexina-A. La expresión de OX1R se estudió en ARNm (RT-PCR), proteínas (inmunocitoquímica) y niveles funcionales en 4 líneas celulares de CHC (Hep G2, SK-HEP-1, HuH-7 y Hep 3B). Sólo la línea celular SK-HEP-1 expresa OX1R. El tratamiento con Orexina-A promovió una inhibición del crecimiento celular del 62% promoviendo una apoptosis mitocondrial (Figura 1, panel A). Utilizando el inhibidor NSC-87877 de SHP, demostramos la capacidad del inhibidor para revertir la apoptosis inducida por orexina en células SK-HEP-1 (Figura 1, panel A). La inyección de Orexina-A en ratones desnudos xenoinjertados con células SK-HEP-1, ha disminuido el 80% de la progresión tumoral en los casos tratados (Figura 1, panel B). La inducción de apoptosis se observó en tumores tratados con Orexina-A (caspasa-3 activada).

Este trabajo ha demostrado los efectos antitumorales y proapoptóticos de las orexinas en el CHC. En este contexto, los receptores de orexina representan un nuevo objetivo prometedor en el tratamiento antineoplásico del carcinoma hepatocelular y/o del diagnóstico preclínico.

## Referencias bibliográficas

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Lista de secuencias

5 <110> Inserm  
 5 <120> Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de carcinomas hepatocelulares  
 <130> BI013264 COUVINEAU / MC  
 10 <160> 3  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 15 <210> 1  
 <211> 425  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 1

Met Glu Pro Ser Ala Thr Pro Gly Ala Gln Met Gly Val Pro Pro Gly  
 1 5 10 15

Ser Arg Glu Pro Ser Pro Val Pro Pro Asp Tyr Glu Asp Glu Phe Leu  
 20 25 30

Arg Tyr Leu Trp Arg Asp Tyr Leu Tyr Pro Lys Gln Tyr Glu Trp Val  
 35 40 45

Leu Ile Ala Ala Tyr Val Ala Val Phe Val Val Ala Leu Val Gly Asn  
 50 55 60

Thr Leu Val Cys Leu Ala Val Trp Arg Asn His His Met Arg Thr Val  
 65 70 75 80

Thr Asn Tyr Phe Ile Val Asn Leu Ser Leu Ala Asp Val Leu Val Thr  
 85 90 95

Ala Ile Cys Leu Pro Ala Ser Leu Leu Val Asp Ile Thr Glu Ser Trp  
 100 105 110

Leu Phe Gly His Ala Leu Cys Lys Val Ile Pro Tyr Leu Gln Ala Val  
 115 120 125

Ser Val Ser Val Ala Val Leu Thr Leu Ser Phe Ile Ala Leu Asp Arg  
 130 135 140

Trp Tyr Ala Ile Cys His Pro Leu Leu Phe Lys Ser Thr Ala Arg Arg  
 145 150 155 160

Ala Arg Gly Ser Ile Leu Gly Ile Trp Ala Val Ser Leu Ala Ile Met  
 165 170 175

ES 2 709 549 T3

Val Pro Gln Ala Ala Val Met Glu Cys Ser Ser Val Leu Pro Glu Leu  
180 185 190

Ala Asn Arg Thr Arg Leu Phe Ser Val Cys Asp Glu Arg Trp Ala Asp  
195 200 205

Asp Leu Tyr Pro Lys Ile Tyr His Ser Cys Phe Phe Ile Val Thr Tyr  
210 215 220

Leu Ala Pro Leu Gly Leu Met Ala Met Ala Tyr Phe Gln Ile Phe Arg  
225 230 235 240

Lys Leu Trp Gly Arg Gln Ile Pro Gly Thr Thr Ser Ala Leu Val Arg  
245 250 255

Asn Trp Lys Arg Pro Ser Asp Gln Leu Gly Asp Leu Glu Gln Gly Leu  
260 265 270

Ser Gly Glu Pro Gln Pro Arg Gly Arg Ala Phe Leu Ala Glu Val Lys  
275 280 285

Gln Met Arg Ala Arg Arg Lys Thr Ala Lys Met Leu Met Val Val Leu  
290 295 300

Leu Val Phe Ala Leu Cys Tyr Leu Pro Ile Ser Val Leu Asn Val Leu  
305 310 315 320

Lys Arg Val Phe Gly Met Phe Arg Gln Ala Ser Asp Arg Glu Ala Val  
325 330 335

Tyr Ala Cys Phe Thr Phe Ser His Trp Leu Val Tyr Ala Asn Ser Ala  
340 345 350

Ala Asn Pro Ile Ile Tyr Asn Phe Leu Ser Gly Lys Phe Arg Glu Gln  
355 360 365

Phe Lys Ala Ala Phe Ser Cys Cys Leu Pro Gly Leu Gly Pro Cys Gly  
370 375 380

Ser Leu Lys Ala Pro Ser Pro Arg Ser Ser Ala Ser His Lys Ser Leu  
385 390 395 400

Ser Leu Gln Ser Arg Cys Ser Ile Ser Lys Ile Ser Glu His Val Val  
405 410 415

Leu Thr Ser Val Thr Thr Val Leu Pro  
420 425

<210> 2  
<211> 33  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
10 <221> característica miscelánea  
<222> (1)..(1)  
<223> X es piruvoglutamato

ES 2 709 549 T3

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (1)..(1)

5 <223> X es piroglutamato

<400> 2

Xaa Pro Leu Pro Asp Cys Cys Arg Gln Lys Thr Cys Ser Cys Arg Leu  
1 5 10 15

Tyr Glu Leu Leu His Gly Ala Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr  
20 25 30

Leu

10

<210> 3

<211> 27

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Arg Gly Pro Pro Gly Leu Gln Gly Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Ala  
1 5 10 15

Ser Gly Asn His Ala Ala Gly Ile Leu Thr Met  
20 25

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un agonista de OX1R para uso en el tratamiento del carcinoma hepatocelular en un sujeto que lo necesite.
2. El agonista de OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de OX1R es un anticuerpo, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo monoclonal humano completo.
- 10 3. El agonista de OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de OX1R es un polipéptido.
4. El agonista de OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de OX1R es un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad con la SEQ ID NO:2 ó 3.
- 15 5. El agonista de OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde el agonista de OX1R es una inmunoadhesina.
6. El agonista de OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde el OX1R es un aptámero.
- 20 7. El agonista OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde el carcinoma hepatocelular se selecciona del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular en estadio temprano, carcinoma hepatocelular no metastático, carcinoma hepatocelular primario, carcinoma hepatocelular avanzado, carcinoma hepatocelular localmente avanzado, carcinoma hepatocelular metastático, carcinoma hepatocelular en remisión, o carcinoma hepatocelular recurrente.
- 25 8. El agonista de OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde el carcinoma hepatocelular es extirpable localizado, inextirpable localizado o inextirpable.
9. El agonista de OX1R para uso según la reivindicación 1, en donde también se administra al sujeto un agente quimioterapéutico.
- 30 10. Un agonista de OX1R para uso en un método para tratar un carcinoma hepatocelular en un sujeto que lo necesite, en donde dicho método comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de expresión de OX1R en una muestra de tejido tumoral obtenida del sujeto, ii) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa i) con un valor de referencia y iii) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de OX1R cuando el nivel determinado en la etapa i) es mayor que el valor de referencia.
- 35 11. Un agonista de OX1R para uso en un método para visualizar el carcinoma hepatocelular y/o la micrometastasis hepática digestiva en un sujeto que lo necesite, en donde dicho método comprende las etapas de i) administrar al sujeto una cantidad del ligando de OX1R marcado con una sustancia detectable y ii) detectar la presencia del ligando de OX1R marcado con una sustancia detectable en el sujeto.
- 40 12. Un agonista de OX1R para uso en un método para disminuir el tamaño de un carcinoma hepatocelular establecido en un paciente que lo necesite, dicho método comprende una etapa de administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de OX1R, siendo la cantidad suficiente para disminuir el tamaño del tumor.
- 45 13. Un agonista de OX1R para uso en un método para prevenir o ralentizar el crecimiento del carcinoma hepatocelular en un paciente que lo necesite, dicho método comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del agonista de OX1R, siendo la cantidad suficiente para prevenir o ralentizar el crecimiento de al menos un carcinoma hepatocelular.

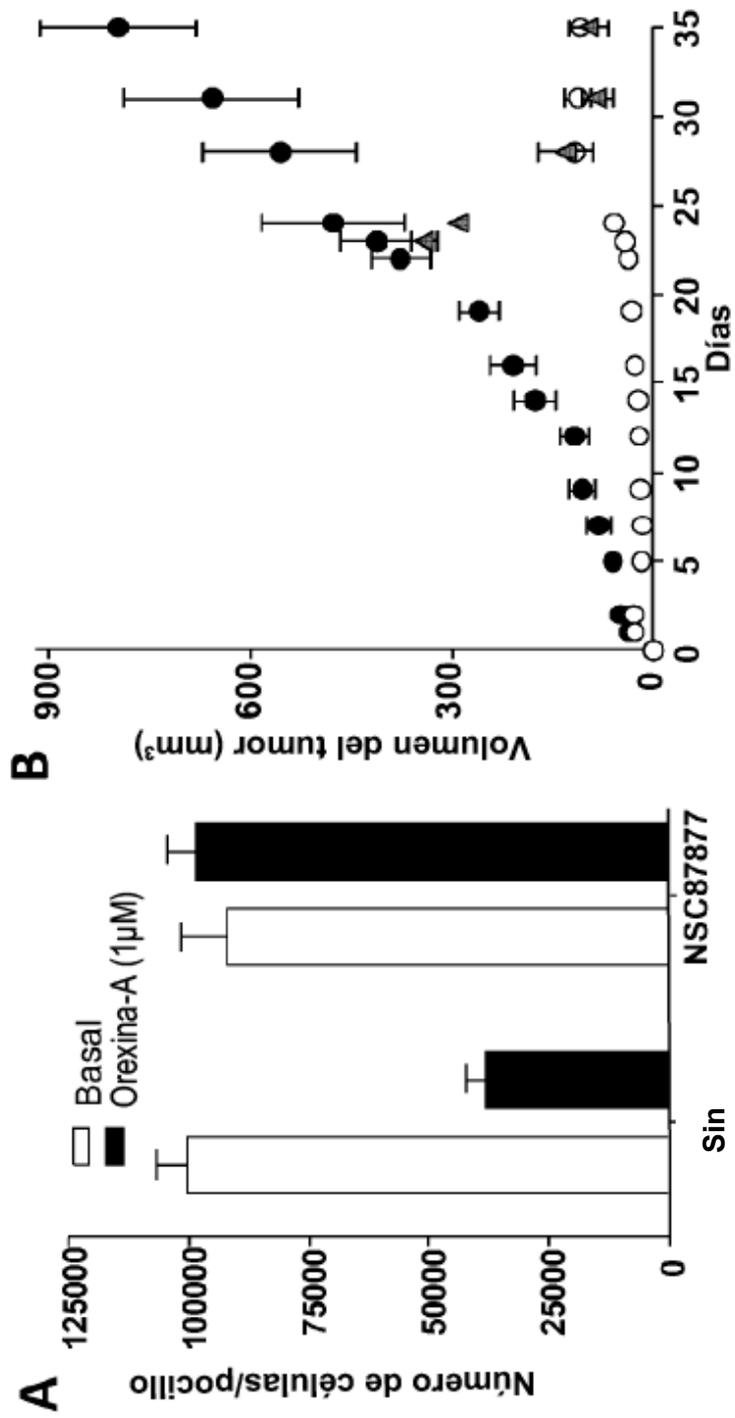


Figura 1