

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 068**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012 PCT/EP2012/053142**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12113900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012 E 12705682 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2678353**

54 Título: **Derivados de IGFBP-3 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

24.02.2011 EP 11305197

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

17.05.2019

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GODEAU, JEAN-FRANÇOIS y
LE BOUC, YVES**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 713 068 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

Derivados de IGFBP-3 y usos de los mismos

5 **Solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Europea N.º EP 11 305 197.3 presentada el 24 de febrero de 2011.

10 **Estado de la técnica**

El sistema IGF (factor de crecimiento insulínico) consiste en un conjunto bien caracterizado de polipéptidos que las células utilizan para comunicarse con su entorno fisiológico. Este sistema comprende dos receptores de superficie celular (IGF1R e IGF2R), dos ligandos peptídicos (IGF-I e IGF-II), una familia de seis proteínas de unión a IGF de alta afinidad (IGFBP-1 a 6), así como enzimas de degradación de IGFBP asociadas, denominadas colectivamente proteasas. La vía de señalización de IGF no solo es un participante importante en el crecimiento estatural de los mamíferos, sino que también está implicado en la proliferación y la supervivencia celular. A pesar de que la hormona del crecimiento (GH) es el principal regulador de la producción de IGF-I en muchos tejidos, los IGF se producen de manera casi ubicua y circulan a altas concentraciones en el suero unido principalmente a las IGFBP. Para que los IGF ejerzan sus efectos a través de la asociación con IGF1R, su receptor de la superficie celular de la tirosina cinasa, primero deben disociarse de los complejos formados con la IGFBP cuyas afinidades por IGF-I e IGF-II son a veces mayores que las de IGF1R. Por lo tanto, la interacción receptor-ligando es altamente dependiente de los niveles de IGF "libres" que están fuertemente regulados por las IGFBP presentes en el suero y otros fluidos biológicos. Por lo tanto, la interacción de los IGF con los IGFBP puede prevenir los efectos adversos de los IGF, tal como la proliferación celular descontrolada o la hipoglucemia. Por el contrario, la alteración del complejo IGF/IGFBP es un requisito previo probable para que los IGF ejerzan sus efectos mitogénicos y metabólicos a través del receptor de IGF.

La vía de señalización de IGF desregulada ha emergido como un participante principal en la patogenia de numerosos tumores malignos, así como en su resistencia a los agentes quimioterapéuticos (Samani et al., *Endocr. Rev.*, 2006, 24: 24). El aumento de la actividad en esta vía promueve la proliferación celular a través de la activación de la vía Ras/MAPK/ERK, y contrarresta las señales pro-apoptóticas a través de la activación de la vía de señalización de PI3-cinasa. Por estas razones, el direccionamiento de la vía de señalización de IGF para reducir su actividad se ha convertido en un desafío importante de la investigación médica actual (Yuen y Macaulay, *Expert. Opin. Ther. Targets*, 2008, 12: 589-603).

Además, la modificación del suministro de IGF a ciertos tejidos podría ayudar a controlar el transcurso de una amplia diversidad de enfermedades humanas, incluido el enanismo debido a la deficiencia de IGF, diabetes tipo I y tipo II, pero también enfermedades degenerativas, tal como distrofia muscular miotónica (Heatwole et al., *Arch. Neurol.*, 2011, 68: 37-44), neurodegeneración por esclerosis lateral amiotrófica (Goberdhan et al., *Differentiation*, 2003, 71: 375-397) y retinopatías vasculo-proliferativas tales como las que complican la diabetes, la prematuridad y el envejecimiento e incluso arteriosclerosis. Además, un aumento agudo en el IGF biodisponible puede ser beneficioso para los pacientes que padecen quemaduras, isquemia cerebral o cardíaca, síndromes de desgaste y pérdidas de densidad mineral ósea (Clemmons, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, 6: 821-833).

Las concentraciones de IGF-I e IGF-II en la sangre están, al menos en parte, determinadas indirectamente por los niveles de IGFBP. La proteína 3 de unión al factor de crecimiento insulínico (IGFBP-3) es la IGFBP más abundante en la sangre y tiene la afinidad más alta por el IGF-I y el IGF-II y, por lo tanto, es el principal depósito de IGF en el torrente sanguíneo (Jones y Clemmons, *Endocr. Rev.*, 1995, 16: 3-34). Además de su papel en el secuestro y transporte de IGF, IGFBP-3 puede tener sus propios efectos biológicos. En línea con sus cinco congéneres de IGFBP, IGFBP-3 consiste en tres dominios de tamaño aproximadamente igual, de los cuales solo los dominios N-terminal y C-terminal participan en la unión al IGF (Sitar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103: 13028-13033). El dominio intermedio, que está poco estructurado, es el objetivo de las escisiones proteolíticas cruciales para algunas de sus funciones (Fowlkes et al., *Endocrinology*, 2004, 145: 620-626). Las proteasas degradantes de IGFBP inducen la liberación de IGF, a partir de complejos IGF/IGFBP-3, lo que hace que el IGF esté disponible para la acción biológica. Además, ciertas proteasas libres de IGFBP también pueden ser activadas por las proteasas, dando como resultado una afinidad reducida para los IGF.

Se han utilizado varios enfoques para dirigirse a la vía de señalización de IGF incluyendo (1) la reducción de los niveles de IGF-1 o la bioactividad utilizando anticuerpos específicos de ligando (Goya et al., *Cancer Res.*, 2004, 64: 6252-6258) o antagonistas de la hormona del crecimiento (GH) (Divisova et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 2006, 98: 315-327) y (2) la inhibición de la función del receptor de IGF utilizando (a) anticuerpos específicos del receptor, tales como los anticuerpos anti-IGFIR desarrollados por Pfizer (CP-751871 - Lacy et al., *J. Clin. Oncol.*, 2008, 26: 3196-3203; Haluska et al., *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13: 5834-5840; De Bono et al., *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13: 3611-3616), Amgen (AMG479 - Tolcher et al., *J. Clin. Oncol.*, 2007, 25: 3002; Sarantopoulos et al., *J. Clin. Oncol.*, 2008, 26: 3583), Sanofi-Aventis (AVE1642 - Tolcher et al., *J. Clin. Oncol.*, 2008, 25: 3582), Imclone (A12 - Higano et al., *J. Clin. Oncol.*, 2007, 25: 3505), Merck (MK0646 - Hidalgo et al., *J. Clin. Oncol.*, 2008, 26: 3520; Atzori et al., *J. Clin. Oncol.*, 2008, 26:

3519) y Roche (R1507 - Rodon et al., J. Clin. Oncol., 2007, 26: 3590) o (b) los inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña (Haluska et al., Cancer Res., 2006, 66: 362-371; Ji et al., Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 2158-2167; Zimmermann et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 18: 4075-4080; Mulvihill et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2008, 16: 1359-1375; Hofmann et al., Drug Discov. Today, 2005, 10:1041-1047; Vasilcanu et al., Oncogene, 2008, 27: 1629-1638).

La administración de IGF-I recombinante (llamada mecasermina, nombre comercial: Increlex™ de Tercica, Inc.), cuando está indicada, se ve obstaculizada por efectos secundarios no deseados tal como hipoglucemia, la corta semivida de IGF-I libre y al mismo tiempo una reducida eficacia debido a las IGFBP endógenas. En un intento por aumentar la semivida mientras se reducen estos efectos secundarios del IGF-1 humano recombinante (rhIGF-1), se ha desarrollado un enfoque que consiste en la administración de un complejo compuesto de cantidades equimolares de rhIGF-1 e IGFBP-3 humana recombinante (rhIGFBP-3) (rinfabato de mecasermina, nombre comercial: SomatoKine™ o Iplex™ de Inmed Corp.). La eficacia del complejo rhIGF-1/rhIGFBP-3 se ha probado en sujetos con resistencia a la insulina grave (Regan et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., May 2010, 95: 2113-2122), síndrome de insensibilidad a la hormona del crecimiento (Kemp et al., Endocr. & Metabol., 2006, 15: 409-415; Tonella et al., Horm. Res. Paediatr., Feb. 2010, 73: 140-147), diabetes tipo 1 (Clemmons et al., J. Clin. Endocrin. Metab., 2000, 85: 1518-1524), diabetes tipo 2 (Clemmons et al., J. Clin. Endocrin. Metab., 2005, 90: 6561-6568), osteoporosis (Boonen et al., Endocrinol. Metab., 2002, 87: 1593-1599), quemaduras (Jeschke et al., Mol. Med., 2002, 8: 238-246), distrofia miotónica tipo 1 (Heatwole et al., Arch. Neurol., Sept. 2010), así como en niños de bajo peso al nacer (Iniguez et al., Clin. Endocrinol., 2006, 65: 687-392).

Estos estudios son alentadores porque demuestran la utilidad de este enfoque para administrar IGF-I con fines terapéuticos.

El documento WO 2004/007543 describe IGFBP-2 modificadas, que son resistentes a la escisión proteolítica y que no se unen a la matriz extracelular (ECM) pero conservan su afinidad por los IGF. Estas IGFBP-2 modificadas se describen como útiles en el tratamiento del cáncer.

La secuencia básica en IGFBP-3, aminoácidos 228-232 (KGRKR) cuando se reemplaza por MDGEA, da como resultado variantes de IGFBP-3 con unión reducida a IGF-I y afinidad reducida por ALS (Baxter, et al, Progress in Growth Factor Res., 1995, 6:215-222).

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a derivados de IGFBP-3 que son útiles en una diversidad de aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico.

En particular, en un aspecto, la presente invención proporciona derivados de IGFBP-3 que son resistentes a la escisión proteolítica y que muestran afinidades de unión por IGF-I, IGF-II, heparina y ALS (subunidad ácido-lábil) que son idénticas o sustancialmente similar a las afinidades de unión correspondientes de IGFBP-3 de tipo silvestre.

Más específicamente, la presente invención proporciona un derivado polipeptídico de IGFBP-3 que comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, en el que:

- (i) el dominio N-terminal comprende la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, o de un fragmento biológicamente activo de la misma que conserva la capacidad del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y la subunidad ácido-lábil (ALS);
- (ii) el dominio intermedio comprende la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de la IGFBP-3 humana de tipo salvaje, en el que 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 residuos de aminoácidos contiguos de dicha secuencia de aminoácidos se reemplazan con un el enlazador que es resistente a la escisión proteolítica por proteasas que escinden la IGFBP-3 humana de tipo silvestre y que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4; y
- (iii) el dominio C-terminal comprende la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, o de un fragmento biológicamente activo de la misma que conserva la capacidad del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y ALS.

En determinadas realizaciones, el dominio intermedio de la IGFBP-3 de tipo silvestre consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:2.

En otras realizaciones, el dominio intermedio de la IGFBP-3 de tipo silvestre consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en el que 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 se reemplazan con un el enlazador que es resistente a la escisión proteolítica por proteasas que escinden la IGFBP-3 humana de tipo silvestre y que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

En determinadas realizaciones, (i) la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de la IGFBP-3 de tipo silvestre es la expuesta en la SEQ ID NO: 1; y (ii) la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 de tipo

silvestre es la expuesta en la SEQ ID NO: 3.

En determinadas realizaciones, (i) el dominio N-terminal del derivado polipeptídico de IGFBP-3 consiste en la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 1; y (ii) el dominio C-terminal del derivado polipeptídico de IGFBP-3 consiste en la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona derivados de IGFBP-3 que son resistentes a la escisión proteolítica, que muestran afinidades de unión por IGF-I, IGF-II y heparina que son idénticas o sustancialmente similares a las afinidades de unión respectivas de IGFBP-3 de tipo silvestre, pero que no se unen a ALS. Más específicamente, tal derivado de IGFBP-3 es como se define en el presente documento, excepto que el dominio C-terminal comprende la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 3, en la que los residuos de aminoácidos 43 a 47 en la SEQ ID NO: 3 se reemplazan con AGGSG (SEQ ID NO: 5).

En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona derivados de IGFBP-3 que tienen una afinidad aumentada por IGF y una semivida en plasma prolongada. Más específicamente, tal derivado de IGFBP-3 es como se define en el presente documento y comprende además, fusionada al mismo, la secuencia de aminoácidos del fragmento Fc de inmunoglobulina IgG1.

En otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona derivados de IGFBP-3 que comprenden además la secuencia de aminoácidos de IGF-I. Más específicamente, en tal derivado de IGFBP-3, el IGF-I forma un complejo con el derivado polipeptídico de IGFBP-3. En determinadas realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos de IGF-I es la secuencia de aminoácidos de IGF-I humano.

En aún otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona derivados de IGFBP-3 que son susceptibles de biotilación por la enzima BirA. Más específicamente, tal derivado de IGFBP-3 es como se define en el presente documento y además comprende un sustrato de la enzima BirA unido covalentemente al extremo terminal del dominio C-terminal del derivado polipeptídico de IGFBP-3. En determinadas realizaciones, el sustrato de la enzima BirA tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6. En determinadas realizaciones, el derivado de IGFBP-3 comprende biotina adicional unida covalentemente al sustrato de la enzima BirA.

Todavía en otro aspecto relacionado, la presente invención proporciona derivados de IGFBP-3 que son proteínas indicadoras estables dotadas de alta afinidad tanto por IGF-I como por IGF-II. Más específicamente, tal derivado de IGFBP-3 es como se define en el presente documento y comprende además, fusionada al mismo, la secuencia de aminoácidos de SeAP (fosfatasa alcalina secretada).

Los derivados polipeptídicos de IGFBP-3 de la presente invención pueden ser útiles en una diversidad de tratamientos terapéuticos. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los derivados de IGFBP-3 descritos en el presente documento, excepto los asociados con la secuencia de aminoácidos de IGF-1, se proporcionan para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado de cánceres y retinopatías proliferativas. En otras realizaciones, los derivados de IGFBP-3 asociados con la secuencia de aminoácidos de IGF-I se proporcionan para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en resistencia a la hormona de crecimiento, deficiencia de IGF-I, quemaduras graves, desgaste por VIH, fibrosis quística, enfermedad celíaca, anorexia nerviosa, enfermedad de desgaste muscular, distrofia miotónica, esclerosis lateral amiotrófica, osteoporosis, resistencia grave a la insulina, diabetes de tipo I, diabetes tipo II, isquemia cerebral, e isquemia cardíaca.

El presente documento también describe un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto, comprendiendo el método una etapa de administrar una cantidad eficaz de un derivado de IGFBP-3 al sujeto. La administración de un derivado de IGFBP-3 a un sujeto puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo, por ejemplo, las vías parenteral, aerosol, oral, intraocular y tópica. El derivado de IGFBP-3 se puede administrar solo o en combinación con cualquier agente o procedimiento terapéutico adicional. El trastorno a tratar se selecciona del grupo que consiste en cánceres y retinopatías proliferativas, o del grupo que consiste en resistencia a la hormona del crecimiento, deficiencia de IGF-I, quemaduras graves, desgaste por VIH, fibrosis quística, enfermedad celíaca, anorexia nerviosa, enfermedad de desgaste muscular, distrofia miotónica, esclerosis lateral amiotrófica, osteoporosis, resistencia grave a la insulina, diabetes de tipo I, diabetes tipo II, isquemia cerebral, afecciones neurodegenerativas (tal como enfermedad de Alzheimer), isquemia cardíaca, retinopatía del prematuro, e injertos.

Los derivados de IGFBP-3 pueden administrarse *per se* o como composiciones farmacéuticas. Por consiguiente, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un derivado de IGFBP-3 de la invención y al menos un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. La composición farmacéutica puede adaptarse para la administración en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. La composición farmacéutica puede comprender además al menos un agente terapéutico adicional.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la concentración de pro-IGF-II en una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto la muestra biológica con un derivado polipeptídico de IGFBP-3 que comprende, fusionada al mismo, la secuencia de aminoácidos de SeAP, para permitir la formación de un complejo entre el derivado de IGFBP-3 y cualquier pro-IGF-II presente en la muestra biológica, en donde pro-IGF-II es una forma parcialmente procesada de IGF-II; y

5 determinar la concentración de pro-IGF-II en la muestra biológica midiendo la actividad alcalina de SeAP en el complejo.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un kit que comprende un derivado polipeptídico de IGFBP-3 que comprende, fusionada al mismo, la secuencia de aminoácidos de SeAP y al menos un reactivo para medir la actividad alcalina.

Estos y otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferidas.

15 Descripción de las figuras

La **Figura 1** muestra un mapa de restricción del plásmido pDB3s-H6-IGFBP-3 (panel superior) posteriormente utilizado como plantilla para generar, mediante mutagénesis de sitio dirigido el plásmido mutante (pDB3s-H6-IGFBP-3) que codifica H6-mini-IGFBP-3 (panel inferior). El último plásmido codifica la proteína mini-IGFBP-3 descrita en la Figura 2.

La **Figura 2(A)** es una representación esquemática de IGFBP-3 recombinante de tipo silvestre (H6-IGFBP-3) y mutada (mini-IGFBP-3). La **Figura 2(B)** muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de muteína H6-IGFBP-3 y mini-IGFBP-3. El dominio N-terminal se presenta en color azul, el dominio intermedio en color gris, y el dominio C-terminal en color naranja. La secuencia de purificación de hexa-histidina se presenta en color verde y los sitios potenciales de N-glicosilación están simbolizados por indicadores.

La **Figura 3** es un gráfico que muestra la cinética de asociación y disociación del complejo mini-IGFBP-3/IGF-II analizado por resonancia de plasmón superficial (véase el Ejemplo 2 para obtener detalles experimentales).

La **Figura 4** presenta geles que muestran la susceptibilidad de IGFBP-3 de tipo silvestre (izquierda) y de mini-IGFBP-3 (derecha) a la degradación proteolítica por trombina (véase el Ejemplo 2 para obtener detalles experimentales).

La **Figura 5** muestra un mapa de restricción del vector de transferencia pRH-3s-avitag obtenido por mutagénesis de sitio dirigido y en el que la secuencia de codificación de mini-IGFBP-3 se ha insertado para producir secuencialmente el vector pRH-3s-H6-mini-IGFBP-3, el virus recombinante AcMNPV-mini-IGFBP-3 y la proteína recombinante mini-IGFBP-3-avitag.

La **Figura 6** muestra los resultados de un análisis electroforético de mini-IGFBP-3-Avitag recombinante después de la biotilación enzimática dirigida. Panel izquierdo: H6-IGFBP-3 (**A**) recombinante purificado, mini-IGFBP-3 (**B**) y mini-IGFBP-3-Avitag (**C**) se analizaron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Panel derecho: Se sometió mini-IGFBP-3-Avitag purificado a biotilación con biotina y la enzima BirA, y se cargó una alícuota del producto de reacción en un análisis por SDS-PAGE (**E**) lado a lado con un anticuerpo monoclonal (7E8) biotilado químicamente previamente (**D**). Véase el Ejemplo 3 para obtener detalles experimentales.

La **Figura 7(A)** muestra el análisis electroforético de diferentes extractos de proteínas de (a) sobrenadante de cultivo de células Sf-9 infectadas por un virus que produce de mini-IGFBP-3 parental, (b) sobrenadante de cultivo de células Sf-9 infectadas por un virus que produce mini-IGFBP-3-avitag, y (c) mini-IGFBP-3-avitag purificado. La **Figura 7(B)** muestra el análisis electroforético de los extractos de proteínas después de la biotilación de BirA dirigida, la separación por SDS-PAGE, la transferencia en una membrana de PVDF, la incubación con estreptavidina-AP y la actividad de APasa mediante la adición de NBT/BCIP. Los carriles c, d y e corresponden a los carriles biotilados a, b y c, respectivamente. En la **Figura 7(C)**, después de una diálisis extensa contra PBS, el medio de cultivo en bruto que contenía mini-IGFBP-3-avitag-biotina (carril e) se inyectó en un chip de estreptavidina. Después del lavado con NaCl 1 M, se inyectaron secuencialmente una solución que contenía el anticuerpo monoclonal anti-IGFBP-3 6E8 y una solución que contenía IGF-II.

La **Figura 8(A)** muestra el mapa de restricción del vector de transferencia pMJ-SeAP-mini-IGFBP-3 construido para producir la proteína de fusión indicadora SeAP-mini-IGFBP-3. La **Figura 8(B)** es una representación esquemática del ensayo "sandwich" de fase sólida desarrollado para determinar las concentraciones de pro-IGF-II en plasma humano. La **Figura 8(C)** es un gráfico que muestra los niveles de pro-IGF-II determinados usando el ensayo "sandwich" en el plasma de adultos sanos, pacientes con hipoglucemia de tumor de células de los islotes (NICTH) y pacientes con NICTH después de la eliminación del tumor. Véase el Ejemplo 4 para obtener detalles experimentales.

65

La **Figura 9(A)** muestra el mapa de restricción del vector de transferencia pYM-mini-IGFBP-3 construido para producir la proteína de fusión mini-IGFBP-3-FcIgG1. La **Figura 9(B)** es una representación esquemática de la inmunoadhesina resultante.

5 La **Figura 10(A)** es un gráfico que muestra la afinidad de unión relativa de mini-IGFBP-3 y mini-IGFBP-3-Fc hacia IGF-II. El ensayo en fase sólida utilizado midió la capacidad de aumentar las concentraciones de IGF-II libre para desplazar la unión del trazador de IGF-II biotinilado a mini-IGFBP-3 y mini-IGFBP-3-Fc inmovilizado en un soporte (véase el Ejemplo 5 para obtener detalles experimentales). La **Figura 10(B)** es un gráfico que muestra los efectos de mini-IGFBP-3-Fc sobre la proliferación y supervivencia de tres líneas de células tumorales humanas cultivadas en presencia de FCS al 10%: Hep3B, HuH7 y INA-6. Los efectos de mini-IGFBP-3-Fc se comparan con los efectos de la picropodofilina (ppp), un compuesto que se sabe que interfiere con la vía de señalización del IGF-R (véase el Ejemplo 5 para obtener detalles experimentales).

15 La **Figura 11(A)** muestra los efectos inhibidores de mini-IGFBP-3-Fc sobre la fosforilación de AKT en células de mieloma INA-6. Estos efectos se comparan con los de ppp (véase el Ejemplo 5 para obtener detalles experimentales). La **Figura 11(B)** es un gráfico que muestra los efectos de mini-IGFBP-3-Fc sobre la fosforilación de AKT en las células MiaPaCa-2 (arriba a la izquierda), las células HT-29 (arriba a la derecha), y las células A549 (abajo a la izquierda) y de mini-IGFBP-3-Fc en la fosforilación de AKT en células A549 (abajo a la derecha) después de diferentes tiempos de incubación, como se indica (véase el Ejemplo 5 para obtener detalles experimentales).

20 La **Figura 12** muestra la descomposición de las concentraciones de derivados de mini-IGFBP-3 en plasma de ratón. Se inyectaron por vía intravenosa 250 µg de la proteína indicada a grupos (n = 3) de ratones en el momento cero. Las muestras de sangre se extrajeron en los puntos de tiempo indicados, se centrifugaron y se mantuvieron congeladas. Las concentraciones de proteínas inyectadas se determinaron mediante un ELISA de tipo sandwich interno utilizando anticuerpos monoclonales específicos de IGFBP-3 antihumanos.

25 La **Figura 13** muestra los efectos *in vivo* sobre los parámetros de señalización clave del tumor de un tratamiento de 12 horas con mini-IGFBP-3 o mini-IGFBP-3-Fc administrado a ratones portadores de xenoinjertos de tumor colorrectal humano HT-29. (Véase el Ejemplo 6 para obtener detalles experimentales).

30

Definiciones

A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean varios términos que se definen en los párrafos siguientes.

35 Como se usa en el presente documento, el término "**sujeto**" se refiere a un ser humano u otro mamífero (por ejemplo, primate, ratón, rata, conejo y similares). En muchas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En dichas realizaciones, a menudo se denomina al sujeto como un "**individuo**" o un "**paciente**". Los términos "individuo" y "paciente" no indican ninguna edad en particular.

40 El término "**tratamiento**" se usa en el presente documento para caracterizar un método o proceso que tiene como objetivo (1) retrasar o prevenir la aparición de una enfermedad o afección; (2) ralentizar o detener el avance, el empeoramiento o el deterioro de los síntomas de la enfermedad o afección; (3) lograr una mejoría de los síntomas de la enfermedad o afección; o (4) curar la enfermedad o afección. Se puede administrar un tratamiento antes de la aparición de la enfermedad o afección, para una acción profiláctica o preventiva. Como alternativa o de manera adicional, se puede administrar un tratamiento después del inicio de la enfermedad o afección, para una acción terapéutica.

45 Una "**composición farmacéutica**" se define en el presente documento como comprendiendo una cantidad eficaz de al menos un derivado polipeptídico de IGFBP-3 descrito en el presente documento, y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Como se usa en el presente documento, el término "**cantidad eficaz**" se refiere a cualquier cantidad de un compuesto, agente, anticuerpo o composición que sea suficiente para cumplir con su propósito o propósitos deseados, por ejemplo, una respuesta biológica o medicinal deseada en una célula, tejido, sistema o sujeto.

55 El término "**Vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable**" se refiere a un medio portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del principio o principios activos y que no es excesivamente tóxico para el huésped en la concentración a la que se administra. El término incluye disolventes, dispersión, medios, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, y agentes retardantes de la adsorción, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W. Martin, 18ª Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA).

60 El término "**aislado**", como se usa en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido, significa una proteína o polipéptido, que en virtud de su origen o manipulación se separa de al menos algunos de los componentes con los que está naturalmente asociado o con los que está asociado cuando se obtiene inicialmente. Por "aislado", se entiende como alternativa o además que la proteína o polipéptido de interés se produce o sintetiza de la mano del

65

hombre.

Los términos "**proteína**", "**polipéptido**", y "**péptido**" se usan en el presente documento de manera intercambiable, y se refieren a secuencias de aminoácidos de una diversidad de longitudes, ya sea en sus formas neutras (no cargadas) o como sales, y no modificadas o modificadas por glucosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación. La secuencia de aminoácidos puede ser una proteína nativa de longitud completa. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos puede ser un fragmento más pequeño de la proteína de longitud completa. En otras realizaciones más, la secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como unidades de glucosilo, lípidos o iones inorgánicos tales como fosfatos, así como modificaciones relacionadas con las conversiones químicas de las cadenas tales como oxidación de grupos sulfhidrilo. Por lo tanto, el término "proteína" (o sus términos equivalentes) pretende incluir la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, o un fragmento de la misma, sujeto a aquellas modificaciones que no cambien significativamente sus propiedades específicas. En particular, el término "proteína" incluye isoformas de proteínas, es decir, las variantes que están codificadas por el mismo gen, pero que difieren en su pl o PM, o ambos. Dichas isoformas pueden diferir en su secuencia de aminoácidos (por ejemplo, como resultado de la variación alélica, el corte y empalme alternativo o la proteólisis limitada) o, como alternativa, pueden surgir de una modificación postraduccional diferencial (por ejemplo, glucosilación, acilación, fosforilación).

El término "**análogo**", como se usa en el presente documento en referencia a una proteína o porción de proteína, se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a la de la proteína o porción de proteína pero no necesariamente comprende una secuencia de aminoácidos que es similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o porción de proteína o una estructura que es similar o idéntica a la de la proteína o porción de proteína. Preferiblemente, en el contexto de la presente invención, un análogo de proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 30 %, más preferiblemente, al menos un 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o porción de proteína.

El término "**fragmento de proteína**" se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos consecutivos (preferiblemente, al menos aproximadamente: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 o más restos de aminoácidos) de la secuencia de aminoácidos de una proteína. El fragmento de una proteína puede o no poseer una actividad funcional de la proteína.

El término "**biológicamente activo**", como se usa en el presente documento para caracterizar una variante, análogo o fragmento de una proteína o porción de proteína, se refiere a una molécula que comparte suficiente identidad de secuencia de aminoácidos u homología con la proteína o porción de proteína para presentar propiedades similares o idénticas a la proteína o porción de proteína. Por ejemplo, en muchas realizaciones de la presente invención, un fragmento biológicamente activo del dominio N-terminal de IGFBP-3 es un fragmento que conserva la capacidad del dominio N-terminal de IGFBP-3 para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y ALS. De forma similar, un fragmento biológicamente activo del dominio C-terminal de IGFBP-3 es un fragmento que conserva la capacidad del dominio C-terminal de IGFBP-3 para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y ALS.

El término "**homólogo**" (u "**homología**"), como se usa en el presente documento, es sinónimo del término "**identidad**" y se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptido o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o el mismo resto de aminoácido, las moléculas respectivas son entonces homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias corresponde al número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas y multiplicadas por 100. En general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima homología. Las secuencias de aminoácidos homólogas comparten secuencias de aminoácidos idénticas o similares. Los residuos similares son sustituciones conservativas, o "mutaciones puntuales permitidas" de los residuos de aminoácidos correspondientes en una secuencia de referencia. "Sustituciones conservativas" de un residuo en una secuencia de referencia son sustituciones que son físicamente o funcionalmente similares al correspondiente resto de referencia, por ejemplo, que tienen un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, incluida la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas particularmente preferentes son aquellas que satisfacen los criterios definidos para una "mutación puntual aceptada" como se describe por Dayhoff et al. ("Atlas of Protein Sequence and Structure", 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Suppl. 3, 22:354-352).

Los términos "**aproximadamente**" y "**en torno a**", como se usa en el presente documento con referencia a un número, generalmente incluyen números que pertenecen a un intervalo del 10 % en cualquier dirección del número (mayor o menor que el número) a menos que se indique otra cosa o de otro modo sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona derivados polipeptídicos de IGFBP-3 que son resistentes a la escisión proteolítica. Estos derivados de IGFBP-3 pueden encontrar aplicación en una amplia diversidad de aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico.

I - Derivados polipeptídicos de IGFBP-3

Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 descrito en el presente documento generalmente comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, en el que: (a) el dominio N-terminal comprende, o consiste como alternativa en, la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de IGFBP-3 de tipo silvestre, de una variante biológicamente activa del mismo o de un fragmento biológicamente activo del mismo; (b) el dominio intermedio comprende un enlazador resistente a la escisión proteolítica; y (c) el dominio C-terminal comprende, o como alternativa consiste en, la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de IGFBP-3 de tipo silvestre, de una variante biológicamente activa del mismo o de un fragmento biológicamente activo del mismo.

El término "**tipo silvestre**", como se usa en el presente documento para caracterizar IGFBP-3 o una porción de IGFBP-3, tiene su significado en la técnica y se refiere a la secuencia de origen natural (o nativa) de IGFBP-3 o la porción de IGFBP-3. Preferiblemente, la IGFBP-3 de tipo silvestre es la IGFBP-3 humana de tipo silvestre.

IGFBP-3 humana

Como se ha mencionado anteriormente, los IGF están presentes en todo el cuerpo humano casi en asociación con seis proteínas de unión de alta afinidad específicas (IGFBP-1 a 6), que son determinantes críticos de la disponibilidad y acciones de IGF. Más del 90 % del IGF-1 en plasma está unido a IGFBP-3, el más abundante de las seis IGFBP identificadas. Además de actuar como la principal proteína portadora circulante, la IGFBP-3 se produce en muchos tejidos donde tiene múltiples efectos en las funciones celulares, tanto a través de su capacidad para modular las acciones de IGF como también debido a las acciones intrínsecas directas.

En los seres humanos, IGFBP-3 está codificado por el gen *IGFBP3*. Se han caracterizado variantes transcripcionales alternativas que codifican diferentes isoformas. Se conocen dos transcripciones alternativas con los números de acceso NP_000589.2 y NP_001013416.1.

Por lo tanto, el dominio N-terminal de un derivado de IGFBP-3 descrito en el presente documento, puede comprender, o como alternativa, puede consistir en, la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, es decir, la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de cualquier IGFBP-3 de origen natural en seres humanos. El dominio N-terminal de un derivado de IGFBP-3 descrito en el presente documento, puede comprender como alternativa, o consistir en, la secuencia de aminoácidos de un fragmento biológicamente activo del dominio N-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, es decir, la secuencia de aminoácidos de un fragmento del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre que conserva la capacidad del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y ALS (subunidad ácido-lábil). El dominio N-terminal de un derivado de IGFBP-3 descrito en el presente documento, puede comprender como alternativa, o consistir en, la secuencia de aminoácidos de una variante biológicamente activa del dominio N-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, es decir, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que difiere de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre por deleciones, sustituciones, adiciones y/o alteraciones, pero cuya similitud de secuencia general con la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es de tal forma que presenta al menos una afinidad de unión idéntica o similar, si no superior, por IGF-I, IGF-II, heparina y ALS que el dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es la expuesta en la SEQ ID NO: 1.

De forma similar, el dominio C-terminal de un derivado de IGFBP-3 descrito en el presente documento, puede comprender, o como alternativa, puede consistir en, la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, es decir, la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de cualquier IGFBP-3 de origen natural en seres humanos. El dominio C-terminal de un derivado de IGFBP-3 descrito en el presente documento, puede comprender como alternativa, o consistir en, la secuencia de aminoácidos de un fragmento biológicamente activo del dominio C-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, es decir, la secuencia de aminoácidos de un fragmento del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre que conserva la capacidad del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y ALS. El extremo C-terminal de un derivado de IGFBP-3 descrito en el presente documento, puede comprender como alternativa, o consistir en, la secuencia de aminoácidos de una variante biológicamente activa del dominio C-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, es decir, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que difiere de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre por deleciones, sustituciones, adiciones y/o alteraciones, pero cuya similitud de secuencia general con la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es de tal forma que presenta al menos una afinidad de unión idéntica o similar, si no superior, por IGF-I, IGF-II, heparina y ALS que la IGFBP-3 humana de tipo silvestre. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es la expuesta en la SEQ ID NO: 3.

Enlazador resistente a la escisión proteolítica

Los derivados de IGFBP-3 descritos en el presente documento se caracterizan por una resistencia a la escisión proteolítica. Como se ha mencionado anteriormente, el dominio intermedio de IGFBP-3 de tipo silvestre está poco estructurado y es el objetivo de la escisión proteolítica. Se ha demostrado que varias proteasas escinden IGFBP-3, incluyendo plasmina, trombina, calicreína, antígeno específico de próstata, metaloproteasas de matriz, y catepsina.

La proteólisis de IGFBP-3 disminuye su afinidad por IGF, lo que aumenta la proporción global de IGF libre a IGF unido total.

Por el contrario, los derivados de IGFBP-3 descritos en el presente documento se diseñaron para ser resistentes a la escisión proteolítica. El término "**resistente a la escisión proteolítica**", cuando se usa en el presente documento en referencia a un derivado de IGFBP-3 (o a un enlazador) significa que el derivado de IGFBP-3 (o el enlazador) no experimenta una degradación enzimática significativa (es decir, detectable) *in vitro* y/o *in vivo* cuando está en presencia de proteasas que escinden IGFBP-3 de tipo silvestre. Un experto en la técnica sabrá cómo probar y evaluar la susceptibilidad de un polipéptido a la escisión proteolítica.

La resistencia a la acción degradante de las proteasas presentadas por un derivado de IGFBP-3 descrita en el presente documento es resultado del hecho de que su dominio intermedio está diseñado para ser resistente a la escisión proteolítica. El dominio intermedio puede consistir en un enlazador que es resistente a la escisión proteolítica, o puede comprender un enlazador que es resistente a la escisión proteolítica. Por ejemplo, el dominio intermedio de un derivado de IGFBP-3 descrito aquí puede comprender, o como alternativa puede consistir en, la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de IGFBP-3 de tipo silvestre, en donde una porción de dicha secuencia de aminoácidos se reemplaza con un enlazador resistente a la escisión proteolítica. En realizaciones en las que la IGFBP-3 de tipo silvestre es IGFBP-3 humana de tipo silvestre, la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de la IGFBP-3 de tipo silvestre puede ser la expuesta en la SEQ ID NO: 2.

En general, la porción de la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de IGFBP-3 de tipo silvestre que se reemplaza con un enlazador resistente a la escisión proteolítica es de tal forma que el dominio intermedio resultante del derivado de IGFBP-3 es resistente a la escisión proteolítica. Por lo tanto, preferiblemente, la porción de la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de la IGFBP-3 de tipo silvestre que se reemplaza con un enlazador resistente a la escisión proteolítica es una porción sustancial de la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de la IGFBP-3 de tipo silvestre. Como se usa en el presente documento, el término "porción sustancial de la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de IGFBP-3 de tipo silvestre" se refiere al menos al 85 % de todo el dominio intermedio de IGFBP-3 de tipo silvestre, o al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 % o más del 90 % de todo el dominio intermedio de la IGFBP-3 de tipo silvestre. Como alternativa o de manera adicional, el término "porción sustancial de la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de IGFBP-3 de tipo silvestre" se refiere a 85 residuos de aminoácidos contiguos del dominio intermedio de IGFBP-3 o más de 85 residuos de aminoácidos contiguos del dominio intermedio de IGFBP-3, tal como, por ejemplo, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 residuos de aminoácidos contiguos del dominio intermedio de IGFBP-3.

El enlazador resistente a la escisión proteolítica puede ser cualquier polipéptido que no experimente ninguna degradación enzimática significativa *in vitro* y/o *in vivo* cuando está en presencia de proteasas que escinden IGFBP-3 de tipo silvestre. Preferiblemente, el enlazador tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4 o la secuencia de cualquier variante de la SEQ ID NO: 4 que sea resistente a la escisión proteolítica.

El enlazador puede comprender un elemento de proteólisis condicional, es decir, una entidad que experimenta proteólisis solo en condiciones específicas. Las estrategias y sistemas para producir una proteína o un polipéptido sujeto a proteólisis condicional se conocen en la técnica.

Derivados de mini IGFBP-3

Los derivados de IGFBP-3, como se han descrito anteriormente, comparten al menos dos propiedades principales: (1) son resistentes a la escisión proteolítica, y (2) muestran afinidades de unión por IGF-I, IGF-II, heparina y ALS que son idénticas a, sustancialmente similares o incluso superiores a las afinidades de unión correspondientes de la IGFBP-3 de tipo silvestre. Los presentes inventores han llamado a estos derivados de IGFBP-3, "mini-IGFBP-3".

Usando mini-IGFBP-3 como plataforma o piedra angular de su proyecto, los inventores han diseñado y desarrollado otros derivados de IGFBP-3 con diferentes propiedades y posibles aplicaciones.

Derivados de mini-IGFBP-3 ALS

Por lo tanto, en un aspecto, se describen en el presente documento los derivados de IGFBP-3 que (1) son resistentes a la escisión proteolítica, (2) muestran afinidades de unión por IGF-I, IGF-II y heparina que son idénticas, sustancialmente similares o incluso superiores a las afinidades de unión correspondientes de la IGFBP-3 de tipo silvestre, pero (3) que no se unen (o no se unen sustancialmente, a ALS. Estos derivados de IGFBP-3 se denominan en el presente documento derivados de "mini-IGFBP-3 ALS".

Tal derivado mini-IGFBP-3 ALS comprende generalmente un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, en el que: (a) el dominio N-terminal comprende, o consiste como alternativa en, la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de IGFBP-3 de tipo silvestre, de una variante biológicamente activa del mismo o de un fragmento biológicamente activo del mismo; (b) el dominio intermedio comprende un enlazador resistente a la escisión proteolítica; y (c) el dominio C-terminal comprende, o como alternativa consiste en, la secuencia de

aminoácidos del dominio C-terminal de IGFBP-3 de tipo silvestre, de una variante biológicamente activa del mismo o de un fragmento biológicamente activo del mismo, en donde la porción del dominio C-terminal que se une a ALS se reemplaza con AGGSG (SEQ ID NO: 5) o cualquier variante de la SEQ ID NO: 5 que no se une a ALS.

- 5 En los casos en los que la IGFBP-3 de tipo silvestre es IGFBP-3 humana de tipo silvestre y la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es como se indica en la SEQ ID NO: 3, los residuos de aminoácidos de 43 a 47 en la SEQ ID NO: 3 se reemplazan con AGGSG (SEQ ID NO: 5) o cualquier variante de la misma que no se une a ALS.

10 **Derivados de mini-IGFBP-3-Fc**

También se describen en el presente documento los derivados de IGFBP-3 que (1) son resistentes a la escisión proteolítica, (2) muestran afinidades de unión por IGF-I y/o IGF-II que son superiores a las afinidades correspondientes de IGFBP-3 de tipo silvestre, y (3) tienen una semivida en plasma que es más larga que la semivida en plasma de IGFBP de tipo silvestre y/o de otros derivados mini-IGFBP-3. Estos derivados de IGFBP-3 se denominan derivados "mini-IGFBP-3-Fc".

De hecho, un derivado mini-IGFBP-3-Fc descrito en el presente documento comprende el fragmento Fc de inmunoglobulina IgG1 fusionado al mismo, además de un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal como se define en el presente documento. El término "**fragmento Fc de inmunoglobulina IgG1**" tiene en el presente documento su significado comprendido en la técnica y se refiere a la región cristalizante del fragmento de un anticuerpo de la clase IgG1 de proteínas de globulina que son las más abundantes en el suero humano. Preferiblemente, el fragmento Fc de inmunoglobulina IgG1 se fusiona al extremo terminal del dominio C-terminal del derivado de IGFBP-3-Fc. Cada "brazo" del fragmento Fc de IgG1 (es decir, cada uno de los dos polipéptidos idénticos que constituyen el fragmento Fc) se fusiona al extremo terminal del dominio C-terminal de un derivado mini-IGFBP-3. Por consiguiente, también se describe en el presente documento una proteína de fusión que comprende el fragmento Fc de inmunoglobulina IgG1 fusionado a dos derivados mini-IGFBP-3-Fc. Los inventores han encontrado que una proteína de fusión de este tipo (véase la sección de Ejemplos) tiene una CI_{50} de afinidad aparente que es siete veces más alta que la de los derivados de IGFBP-3 que no están fusionados con el fragmento Fc de IgG1.

Como entenderá un experto en la técnica, la parte mini-IGFBP-3 de una proteína de fusión "mini-IGFBP-3-Fc" puede o no modificarse para que no presente una unión (o sea insignificante) a ALS, como se ha descrito anteriormente.

35 **Complejos mini-IGFBP-3/IGF-I**

También se describen en el presente documento complejos IGFBP-3/IGF-I que son resistentes a la escisión proteolítica.

Tal complejo IGFBP-3/IGF-I generalmente comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, como se define en el presente documento, y además comprende la secuencia de aminoácidos de IGF-I, en donde el IGF-I forma complejo con el derivado polipeptídico de IGFBP-3. Como se usa en el presente documento, el término "IGF-I" tiene su significado comprendido en la técnica y se refiere a una proteína pequeña (~7.500 kDa) denominada factor de crecimiento insulínico 1 que, en seres humanos, está codificada por el gen *IGF1* (Números de acceso NP_0011004753, NP_001104754 y NP_000609).

El IGF-I consiste en una sola cadena de aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares. Originalmente se sintetiza como un péptido pro-IGF-I biológicamente inactivo, que posteriormente experimenta una escisión endoproteolítica regulada en la forma madura. La secuencia de aminoácidos de IGF-I comprende preferiblemente (o consiste como alternativa en) la secuencia de aminoácidos de IGF-I humano de tipo silvestre (es decir, de cualquier IGF-I de origen natural en seres humanos), o un fragmento biológicamente activo del mismo o una variante biológicamente activa del mismo. Los fragmentos y variantes biológicamente activos adecuados de IGF-I humano de tipo silvestre incluyen aquellos fragmentos y variantes que conservan las propiedades biológicas de IGF-I humano de tipo silvestre (en particular la unión a IGFBP-3 y a IGF-1R).

55 En un complejo IGFBP-3/IGF-I, el derivado de IGFBP-3 y el IGF-I están asociados por uniones no covalentes. Las interacciones no covalentes incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, fuerzas de van der Waals, e interacciones hidrófobas. En general, en un complejo IGFBP-3/IGF-I, el derivado de IGFBP-3 y el IGF-I están asociados de una manera que es idéntica o similar a la de un complejo de IGFBP-3/IGF-I de origen natural (dentro del cuerpo).

60 El enlazador de un complejo mini-IGFBP-3:IGF-I descrito en el presente documento puede comprender un elemento de proteólisis condicional, como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, el elemento de proteólisis condicional puede diseñarse para permitir la administración dirigida de IGF-I.

65 **Derivados de mini-IGFBP-3-Avitag**

También se describen en el presente documento los derivados de IGFBP-3 que (1) son resistentes a la escisión

proteolítica, (2) muestran afinidades de unión por IGF-I, IGF-II, heparina y ALS que son idénticas a, sustancialmente similares o incluso más altas que las afinidades de unión correspondientes de IGFBP-3 de tipo silvestre, y (3) que son susceptibles de biotinilación por la enzima BirA. Estos derivados de IGFBP-3 se denominan derivados de "mini-IGFBP-3-avitag".

5 Tal derivado mini-IGFBP-3-avitag generalmente comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, como se define en el presente documento, y además comprende un sustrato de enzima BirA unido covalentemente al extremo terminal del dominio C-terminal del derivado de IGFBP-3. Como se usa en el presente documento, la **"enzima BirA"** tiene su significado en la técnica y se refiere a la enzima biotina ligasa de E. Coli que
10 tiene la capacidad de biotinilar proteínas en un residuo específico en una secuencia de reconocimiento (o sustrato de la enzima BirA) (O'callaghan et al., Anal. Biochem., 1999, 266: 9-15). Como se usa en el presente documento, el término **"sustrato de la enzima BirA"** se refiere e incluye cualquier secuencia de aminoácidos diana reconocida por la enzima BirA y a la que la enzima BirA puede unir una biotina. Una diversidad de sustratos de la enzima BirA se conocen en la técnica, incluyendo los descritos, por ejemplo, en las Pat. de Estados Unidos N.º 5.723.584, Pat. de
15 Estados Unidos N.º 5.487.993, documentos EP 0 550 693 y WO 95/04069, que son adecuados para su uso en el presente documento. Sin embargo, preferiblemente, el sustrato de la enzima BirA tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.

20 También se describe un derivado mini-IGFBP-3-avitag que generalmente comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, como se define en el presente documento, y que además comprende un sustrato de enzima BirA unido covalentemente al extremo terminal del dominio C-terminal del derivado de IGFBP-3 y una molécula de biotina unida covalentemente al sustrato de la enzima BirA. Estos derivados de IGFBP-3 se denominan en el presente documento derivados de "mini-IGFBP-3-avitag-biotina".

25 Como entenderá un experto en la técnica, la parte mini-IGFBP-3 de un derivado mini-IGFBP-3-avitag o de un derivado mini-IGFBP-3-avitag-biotina puede o no modificarse para presentar ninguna unión (o una insignificante) a ALS, como se ha descrito anteriormente.

Derivados de SeAP-mini-IGFBP-3

30 También se describen derivados de IGFBP-3 que (1) son resistentes a la escisión proteolítica, (2) muestran afinidades de unión por IGF-I, IGF-II, heparina y ALS que son idénticas a, sustancialmente similares o incluso superiores a las afinidades de unión correspondientes de IGFBP-3 de tipo silvestre, y (3) que se pueden detectar al estar marcadas con una proteína indicadora. Por ejemplo, la proteína indicadora puede ser luciferasa, β -galactosidasa, fosfatasa
35 alcalina y similares. Cuando la proteína indicadora es fosfatasa alcalina, estos derivados de IGFBP-3 se denominan derivados de "SeAP-mini-IGFBP-3".

Tal derivado SeAP-mini-IGFBP-3 generalmente comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio, y un dominio C-terminal, como se define en el presente documento, y además comprende, fusionada al extremo terminal
40 del dominio N-terminal, la secuencia de aminoácidos de SeAP (fosfatasa alcalina secretada). Como entenderá un experto en la técnica, la parte mini-IGFBP-3 de un derivado SeAP-mini-IGFBP-3 puede o no modificarse para presentar o no una unión (o una insignificante) a ALS, como se ha descrito anteriormente.

45 Los términos **"SeAP"** y **"fosfatasa alcalina secretada"** se usan en el presente documento de forma intercambiable. Se refieren a una enzima, codificada por el gen SEAP (Número de acceso de GenBank NP_001623), y esa es una forma truncada de la fosfatasa alcalina placentaria humana (PLAP). La SEAP tiene las propiedades inusuales de ser extremadamente estable al calor y resistente al inhibidor de la fosfatasa L-homoarginina (Micanovic y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU, 1990, 87: 157-161).

Preparación de los derivados de IGFBP-3

50 Los derivados de IGFBP-3 descritos en el presente documento pueden prepararse usando cualquiera de una variedad de métodos adecuados conocidos en la técnica, incluyendo mutagénesis de sitio dirigido y técnicas recombinantes tales como las empleadas por los presentes inventores (véase la sección de Ejemplos).

II - Usos de los derivados polipeptídicos de IGFBP-3

60 Los derivados polipeptídicos de IGFBP-3 descritos en el presente documento pueden usarse en una diversidad de aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico. Tienen la ventaja de derivarse de una proteína de origen humano, que ya está aprobada por la FDA para algunas indicaciones terapéuticas y que se ha demostrado que no está asociada con ningún efecto secundario importante.

1 - Aplicaciones terapéuticas

65 A. Indicaciones

Los derivados polipeptídicos de IGFBP-3 descritos en el presente documento pueden ser útiles como agentes que secuestran IGF (IGF-I y/o IGF-II) y, por lo tanto, reducen su biodisponibilidad. Como tales, pueden constituir una alternativa a los anticuerpos monoclonales anti-IGF1-R existentes e inhibidores de la tirosina cinasa como adyuvantes en la quimioterapia o radioterapia de neoplasias humanas (Klinakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, 106: 2359-2364; Pollack et al., Nat. Rev. Cancer, 2004, 4: 505-518; Ryan y Goss; Oncologist, 2008, 13: 16-24; Sachdev y Yee, Mol. Cancer Ther., 2007, 6: 1-12; Samani et al., Endocr. Rev. 2006). Algunos derivados polipeptídicos de IGFBP-3 descritos en el presente documento, tal como mini-IGFBP-3-Fc, son capaces de secuestrar tanto IGF-I como IGF-II presentes en el torrente sanguíneo, mientras que otros, tal como mini-IGFBP-3 ALS, son capaces de reducir los IGF tisulares biodisponibles. Esta última característica podría dirigirse aún más al propio tejido tumoral agregando un residuo de biotina al derivado de IGFBP-3 (mini-IGFBP-3-ALS-avitag-biotina). En ambas estrategias, la administración de un derivado polipeptídico de IGFBP-3 descrito en el presente documento da como resultado la regulación descendente de la ruta de señalización de IGF. Este enfoque parece particularmente relevante y prometedor en el caso de pacientes con tumores metastásicos, donde la circulación de IGFBP-3 intacta está fuertemente deprimida (Fowlkes et al., Endocr., 2004, 145: 620-626; Miyamoto et al., Cancer Res., 2004, 64: 665-371; Nakamura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, 333: 1011-1016). La administración de derivados polipeptídicos de IGFBP-3 resistentes a la proteasa producirá una privación sostenida de IGF perjudicial para el tumor que debería potenciar los efectos de otros agentes quimioterapéuticos para reducir la carga tumoral.

El secuestro de IGF por un derivado polipeptídico de IGFBP-3 descrito en el presente documento también puede ser beneficioso en el tratamiento de ciertos trastornos oftálmicos. Los ejemplos de trastornos oftálmicos asociados con un exceso de IGF-I que pueden tratarse incluyen, pero sin limitación, retinopatías proliferativas, tal como degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética, en las que se ha demostrado que el IGF-I es responsable de la sobreproducción patógena de VEGF (Chang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, 104: 10595-10600; Grant et al., Expert Opin. Invest. Drugs, 2004, 13: 1275-1293). Otros ejemplos incluyen heridas de la retina, cataratas secundarias, heridas epiteliales de la córnea y síndrome de Sjogren. En dichas aplicaciones, un derivado polipeptídico de IGFBP-3 descrito en el presente documento puede administrarse, por ejemplo, mediante inyección intraocular o por aplicación a la córnea (por ejemplo, a través de gotas para los ojos o una cápsula de liberación programada colocada en el fondo de saco).

Un derivado de IGFBP-3 descrito en el presente documento también se puede usar como un vector para suministrar IGF-1 cuando se indica la administración sistemática de IGF-1. Dichas indicaciones incluyen, pero sin limitación, resistencia a la hormona del crecimiento, deficiencia de IGF-I, quemaduras graves, desgaste por VIH, fibrosis quística, enfermedad celíaca, anorexia nerviosa, enfermedad de desgaste muscular, distrofia miotónica, esclerosis lateral amiotrófica, osteoporosis, resistencia grave a la insulina (Clemmons, Nat. Rev. Drug Discov., 2007, 6: 821-833), diabetes tipo I, diabetes tipo II, isquemia cerebral, isquemia cardíaca, e injertos.

Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento pueden realizarse usando un derivado polipeptídico de IGFBP-3 o una composición farmacéutica del mismo. Estos métodos generalmente comprenden la administración de una cantidad eficaz de al menos un derivado polipeptídico de IGFBP-3 (como se ha definido anteriormente), o una composición farmacéutica del mismo, a un sujeto que lo necesite. La administración puede realizarse utilizando cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la técnica. En particular, un derivado polipeptídico de IGFBP-3 o una composición del mismo, puede administrarse por cualquiera de varias rutas incluyendo, pero sin limitación, la ruta en aerosol, parenteral, oral o tópica.

En general, un derivado de IGFBP-3 o una composición del mismo, se administrará en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad que sea suficiente para cumplir su propósito previsto. La cantidad exacta de derivado de IGFBP-3 o composición farmacéutica a administrar variará entre los sujetos, dependiendo de la edad, sexo, peso y el estado general de salud del sujeto que se va a tratar, la respuesta biológica o médica deseada y similares. Una cantidad eficaz es aquella que permite una regulación descendente eficiente de la vía de señalización de IGF, el secuestro eficiente de IGF-I y/o IGF-II presente en el torrente sanguíneo, y/o la reducción eficiente de IGF de tejido biodisponible. Una cantidad efectiva también puede ser una que permita un suministro eficiente de IGF-1. En general, una cantidad eficaz de un derivado de IGFBP-3 o de una composición farmacéutica del mismo, es una que da como resultado el tratamiento del trastorno para el que se administra, por ejemplo, ralentizar o detener el avance, gravedad o deterioro de los síntomas del trastorno y/o la mejora de los síntomas del trastorno y/o curar el trastorno. Los efectos de un tratamiento descrito en el presente documento pueden controlarse utilizando cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica para el diagnóstico de la enfermedad que se está tratando.

Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 o una composición del mismo puede administrarse en solitario de acuerdo con un método de tratamiento descrito en el presente documento. Como alternativa, un derivado polipeptídico de IGFBP-3 o una composición del mismo, se administra en combinación con al menos un agente terapéutico o procedimiento terapéutico adicional. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 o la composición puede administrarse antes de la administración del agente terapéutico o del procedimiento terapéutico, simultáneamente con el agente o procedimiento terapéutico, y/o después de la administración del agente o procedimiento terapéutico.

Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con un derivado polipeptídico de IGFBP-3 o composición pueden seleccionarse de una gran diversidad de compuestos biológicamente activos que se sabe que

tienen un efecto beneficioso en el tratamiento de la enfermedad para la cual se administra del derivado de IGFBP-3 (por ejemplo, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos y combinaciones de los mismos). Los procedimientos terapéuticos que pueden realizarse en combinación con la administración de un derivado polipeptídico de IGFBP-3 o composición incluyen, pero sin limitación, cirugía, radioterapia y similares.

Los ejemplos más específicos de contextos patológicos en los que un derivado polipeptídico de IGFBP-3 o composición pueden administrarse beneficiosamente en solitario o junto con otras terapias incluyen cáncer de pulmón de células no pequeñas y formas de la enfermedad que han desarrollado resistencia a terapias dirigidas a EGFR (Gefitinib, Erlotinib), carcinoma hepatocelular (sorafenib) y formas que han desarrollado resistencia a dicho agente, cáncer de mama amplificado con HER2 asociado a terapias dirigidas contra HER2 (Trastuzumab) y formas que han desarrollado resistencia a este agente, cáncer de mama positivo a receptores de estrógeno (ER+) junto con terapias hormonales y particularmente un subconjunto de cánceres de mama positivos a receptores de estrógeno (ER+) con niveles bajos de ER que no responden a la terapia hormonal (luminal B), algunos cánceres de mama triple negativo, cánceres de mama que desarrollan resistencia a las terapias dirigidas al receptor de estrógeno (Fulvestant), tumores estromales gastrointestinales, que son insensibles o resistentes a las terapias dirigidas a PDGFR (Imatinib), resistencia a las terapias dirigidas al receptor de andrógenos en el cáncer de próstata, resistencia a terapias dirigidas a BRAFV600E de melanoma y cáncer de colon, terapia del sarcoma de Ewing productor de IGF-I y otros sarcomas, terapia de mieloma múltiple (particularmente de mielomas productores de IGF-I) junto con otras terapias, carcinomas hepatocelulares terapéuticos (particularmente de tumores productores de IGF-II), terapia de adenocarcinoma de colon (particularmente tumor productor de IGF-II), terapia de cánceres de ovario (particularmente cáncer de ovario epitelial y tumores productores de IGF-II), terapia del carcinoma adrenocortical, terapia de algunos cánceres de páncreas, y como adyuvante de la terapia hormonal de cánceres de mama y próstata, terapia de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, terapia de tumores pediátricos tal como tumor de Wilm, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, pero también terapia de glioblastoma adulto, terapia de tumores productores de IGF-II, tal como hipoglucemia tumoral de células no islotes (NICTH), terapia de osteosarcoma, terapia del mesotelioma.

B. Administración

Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 (opcionalmente después de la formulación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados), en una dosificación deseada, puede administrarse a un sujeto que lo necesite por cualquier vía adecuada. Se conocen diversos sistemas de administración y se pueden usar para administrar los derivados de IGFBP-3 descritos en el presente documento, incluyendo comprimidos, cápsulas, soluciones inyectables, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, etc. Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, vía dérmica, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intralesional, intravenosa, subcutánea, intranasal, pulmonar, epidural, ocular, y oral. Un derivado de IGFBP-3 o composición puede administrarse por cualquier vía conveniente u otra vía adecuada, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por adsorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, oral, mucosa, mucosa rectal e intestinal, etc.). La administración puede ser sistémica o local. La administración parenteral puede dirigirse a un tejido determinado del paciente, tal como por cateterización. Como apreciarán los expertos en la técnica, cuando se administra un derivado de IGFBP-3 junto con un agente terapéutico adicional, el derivado de IGFBP-3 y el agente terapéutico se pueden administrar por la misma vía (por ejemplo, por vía oral) o por diferentes vías (por ejemplo, por vía oral e intravenosa).

C. Dosificación

La administración de un derivado de IGFBP-3 (o una composición del mismo) descrita en el presente documento se realizará en una dosis tal que la cantidad administrada sea eficaz para el propósito previsto. La vía de administración, la formulación y la dosis administrada dependerán del efecto terapéutico deseado, la gravedad del trastorno que se esté tratando, la presencia de cualquier infección, la edad, sexo, peso y estado de salud general del paciente, así como la potencia, biodisponibilidad y semivida *in vivo* del derivado de IGFBP-3 utilizado, el uso (o no) de terapias concomitantes y otros factores clínicos. Estos factores son fácilmente determinables por el médico a cargo en el transcurso de la terapia. Como alternativa o de manera adicional, la dosis a administrar puede determinarse a partir de estudios que utilizan modelos animales. El ajuste de la dosis para lograr una eficacia máxima basada en estos u otros métodos se conoce bien en la técnica y está dentro de las capacidades de los médicos capacitados. A medida que los estudios se realizan utilizando los derivados de IGFBP-3 descritos en el presente documento, surgirá más información sobre los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento.

Un tratamiento descrito en el presente documento puede consistir en una dosis única o dosis múltiples. Por lo tanto, la administración de un derivado de IGFBP-3, o la composición del mismo, puede ser constante durante un cierto periodo de tiempo o periódica y en intervalos específicos, por ejemplo, por hora, diariamente, semanal (o en algún otro intervalo de días múltiples); mensual, anual (por ejemplo, en un formulario de liberación de tiempo). Como alternativa, la administración puede tener lugar varias veces durante un periodo de tiempo dado, por ejemplo, dos o más veces por semana, dos o más veces al mes, y similares. La administración puede ser una administración continua durante un periodo de tiempo, por ejemplo, administración intravenosa.

2 - Aplicaciones de diagnóstico

Algunos de los derivados polipeptídicos de IGFBP-3 descritos en el presente documento pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. En particular, se describe en el presente documento un método para determinar la concentración de pro-IGF-II en una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de: (1) poner en contacto la muestra biológica con un derivado polipeptídico de IGFBP-3 que comprende, fusionada al mismo, la secuencia de aminoácidos de SeAP, para permitir la formación de un complejo entre el derivado de IGFBP-3 y cualquier pro-IGF-II presente en la muestra biológica, en donde pro-IGF-II es una forma parcialmente procesada de IGF-II; y (2) determinar la concentración de pro-IGF-II en la muestra biológica midiendo la actividad alcalina de SeAP en el complejo.

Como se usa en el presente documento, el término "**pro-IGF-II**" tiene su significado en la técnica y se refiere a una forma parcialmente procesada de IGF-II, ya que se sintetiza originalmente antes de someterse a una escisión endoproteolítica regulada en la forma madura (IGF-II).

El término "**muestra biológica**" se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Una muestra biológica se obtiene generalmente de un sujeto. Una muestra puede ser de cualquier tejido biológico o fluido que pueda contener pro-IGF-II. En los seres humanos, se han detectado pro-formas de IGF-II en el suero, así como en los fluidos cerebrospinales y amnióticos. Frecuentemente, una muestra biológica será una "muestra clínica", es decir, una muestra derivada de un paciente, es decir, un sujeto diagnosticado con una enfermedad o que se sospecha que tiene una enfermedad.

La etapa de determinar la concentración de pro-IGF-II en la muestra biológica midiendo la actividad alcalina de SeAP en el complejo puede realizarse utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluso a través del uso de fosfato de p-nitrofenilo como se describe en la sección de Ejemplos.

III - Composiciones farmacéuticas

Como se ha mencionado anteriormente, los derivados polipeptídicos de IGFBP-3 descritos en el presente documento pueden administrarse *per se* o como una composición farmacéutica. Por consiguiente, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de al menos un derivado polipeptídico de IGFBP-3 y al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender además uno o más agentes biológicamente activos adicionales.

Los derivados polipeptídicos de IGFBP-3 y las composiciones farmacéuticas de los mismos pueden administrarse en cualquier cantidad y usando cualquier vía de administración eficaz para lograr el efecto profiláctico y/o terapéutico deseado. La formulación farmacéutica óptima puede variar dependiendo de la vía de administración y la dosis deseada. Dichas formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo*, y la velocidad de depuración *in vivo* del principio activo administrado.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden formularse en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de un derivado polipeptídico de IGFBP-3 para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que la dosis diaria total de las composiciones será decidida por el médico a cargo dentro del alcance de un buen criterio médico.

A. Formulación

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente atóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 2,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución de cloruro sódico isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles en forma de solución o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico también se pueden usar en la preparación de formulaciones inyectables. Los vehículos líquidos estériles son útiles en composiciones en forma líquida estéril para administración parenteral.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso. Las composiciones farmacéuticas líquidas que son soluciones o suspensiones estériles pueden administrarse, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. La inyección puede ser por inyección simple o por infusión gradual. Cuando sea necesario o se desee, la composición puede incluir un anestésico local para aliviar el dolor en el lugar de la inyección.

Para prolongar el efecto de un principio activo, a menudo es deseable disminuir la absorción del ingrediente de una

inyección subcutánea o intramuscular. La demora en la absorción de un principio activo administrado por vía parenteral se puede lograr disolviendo o suspendiendo el ingrediente en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices micro-encapsuladas del principio activo en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación entre el principio activo y el polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del ingrediente. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se pueden preparar atrapando el principio activo en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones farmacéuticamente aceptables, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires y composiciones presurizadas. Además del derivado polipeptídico de IGFBP-3, la forma de dosificación líquida puede contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otro disolvente, agentes solubilizantes y emulsionantes tal como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, semillas de algodón, nuez molida, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes de suspensión, conservantes, edulcorantes, saporíferos, y agentes perfumantes, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, estabilizantes o osmo-reguladores. Los ejemplos de vehículos líquidos adecuados para administración oral incluyen agua (que puede contener aditivos como los anteriores, por ejemplo, derivados de celulosa, tales como la solución de carboximetilcelulosa sódica), alcoholes (incluidos alcoholes monohídricos y alcoholes polihídricos tales como glicoles) y sus derivados, y aceites (por ejemplo, aceite de coco fraccionado y aceite de maní). Para composiciones presurizadas, el vehículo líquido puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable.

Las formas farmacéuticas sólidas para administración oral incluyen, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, un derivado polipeptídico de IGFBP-3 puede mezclarse con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y uno o más de: (a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitos, y ácido silícico; (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia; (c) humectantes tales como glicerol; (d) agentes desintegrantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (e) agentes retardantes de solución tales como parafina; aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; (g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita; y (i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. Otros excipientes adecuados para formulaciones sólidas incluyen agentes modificadores de superficie tales como agentes modificadores de superficie no iónicos y aniónicos. Los ejemplos representativos de agentes modificadores de superficie incluyen, pero sin limitación, poloxámero 188, cloruro de benzalconio, estearato de calcio, alcohol cetosteárico, cera emulsionante de cetomacrogol, ésteres de sorbitán, dióxido de silicio coloidal, fosfatos, dodecilsulfato de sodio, silicato de aluminio y magnesio, y trietanolamina. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma farmacéutica puede comprender agentes tamponantes.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas rellenas de gelatina blanda y dura usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas sólidas de dosificación de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición de tal forma que libera el principio o los principios activos única o preferiblemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones incluidas que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Puede ser deseable administrar una composición descrita en el presente documento localmente en un área que necesita tratamiento. Esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica, mediante inyección, mediante un catéter, por medio de supositorios, por medio de un parche o stent para la piel u otro implante.

Para la administración tópica, la composición se formula preferiblemente como un gel, una pomada, una loción o una crema que puede incluir vehículos tales como agua, glicerol, alcohol, propilenglicol, alcoholes grasos, triglicéridos, ésteres de ácidos grasos, o aceite mineral. Otros vehículos tópicos incluyen petróleo líquido, palmitato de isopropilo, polietilenglicol, etanol (95 %), polioxietilmonolaurato (5 %) en agua, o laurilsulfato de sodio (5 %) en agua. Se pueden añadir otros materiales, tales como antioxidantes, humectantes, estabilizadores de viscosidad y agentes similares, según sea necesario.

Además, en determinados casos, se espera que las composiciones se puedan disponer dentro de dispositivos transdérmicos colocados sobre, en, o debajo de la piel. Dichos dispositivos incluyen parches, implantes e inyecciones que liberan el principio activo mediante mecanismos de liberación pasivos o activos. Las administraciones

transdérmicas incluyen toda la administración a través de la superficie del cuerpo y los revestimientos internos del pasaje corporal, incluidos los tejidos epiteliales y mucosos. Dichas administraciones se pueden realizar utilizando las presentes composiciones en lociones, cremas, espumas, parches, suspensiones, soluciones y supositorios (rectales y vaginales).

5 La administración transdérmica se puede realizar mediante el uso de un parche transdérmico que contiene un principio activo (es decir, el derivado polipeptídico de IGFBP-3) y un vehículo que no es tóxico para la piel y permite la administración del ingrediente para la absorción sistémica en el torrente sanguíneo a través de la piel. El vehículo puede adoptar cualquier número de formas tales como cremas y ungüentos, pastas, geles y dispositivos oclusivos. 10 Las cremas y los ungüentos pueden ser líquidos viscosos o emulsiones semisólidas de tipo aceite en agua o agua en aceite. Las pastas compuestas de polvos absorbentes dispersados en petróleo o petróleo hidrófilo que contienen el principio activo pueden ser adecuadas. Se puede usar una diversidad de dispositivos oclusivos para liberar el principio activo en el torrente sanguíneo, tal como una membrana semipermeable que cubre un depósito que contiene el principio activo con o sin un vehículo, o una matriz que contiene el principio activo.

15 Las formulaciones de supositorios pueden hacerse de materiales tradicionales, incluyendo manteca de cacao, con o sin la adición de ceras para alterar el punto de fusión del supositorio, y glicerina. También se pueden usar bases de supositorio solubles en agua, tales como polietilenglicoles de diversos pesos moleculares.

20 Los materiales y métodos para producir diversas formulaciones son conocidos en la técnica y pueden adaptarse para poner en práctica la presente invención. Se pueden encontrar formulaciones adecuadas para la administración de anticuerpos, por ejemplo, en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", E.W. Martin, 18ª Ed., 1990, Mack Publishing Co.: Easton, PA.

25 **B. Agentes biológicamente activos adicionales**

Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 descrito en el presente documento puede ser el único principio activo en una composición farmacéutica descrita en el presente documento. Como alternativa, la composición farmacéutica comprende además uno o más agentes biológicamente activos. Los ejemplos de agentes biológicamente activos adecuados incluyen, pero sin limitación, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunomoduladores, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antibióticos, antioxidantes, agentes antisépticos y combinaciones de los mismos. 30

En dichas composiciones farmacéuticas, el derivado polipeptídico de IGFBP-3 y el al menos un agente terapéutico adicional se pueden combinar en una o más preparaciones para la administración simultánea, separada o secuencial del derivado polipeptídico de IGFBP-3 y el agente o agentes terapéuticos. Más específicamente, una composición descrita en el presente documento puede formularse de tal manera que el derivado polipeptídico de IGFBP-3 y el agente o agentes terapéuticos puedan administrarse juntos o independientemente uno del otro. Por ejemplo, un derivado polipeptídico de IGFBP-3 y un agente terapéutico se pueden formular juntos en una sola composición. Como alternativa, pueden mantenerse (por ejemplo, en diferentes composiciones y/o recipientes) y administrarse por separado. 35 40

C. Paquetes y kits farmacéuticos

45 En el presente documento también se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes (por ejemplo, viales, ampollas, tubos de ensayo, matraces o botellas) que contienen uno o más ingredientes de una composición farmacéutica, lo que permite la administración de un derivado polipeptídico de IGFBP-3. También se describe en el presente documento un kit que comprende uno o más recipientes que contienen uno o más ingredientes que permiten la determinación de la concentración de pro-IGF-II en una muestra biológica. Tal kit generalmente comprenderá un derivado polipeptídico de IGFBP-3 como se describe en el presente documento que comprende, 50 fusionada al mismo, la secuencia de aminoácidos de SeAP y al menos un reactivo para medir la actividad alcalina de SeAP.

Los diferentes ingredientes de un paquete o kit farmacéutico pueden suministrarse en forma sólida (por ejemplo, liofilizada) o líquida. Cada ingrediente será generalmente adecuado como alícuotas en su recipiente respectivo o se proporcionará en forma concentrada. Los paquetes o kits descritos en el presente documento pueden incluir medios para la reconstitución de ingredientes liofilizados. Los recipientes individuales de los kits se mantendrán preferiblemente en confinamiento cercano para la venta comercial.

60 Un paquete o kit puede incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales. Opcionalmente asociado con el recipiente o recipientes puede haber un aviso o un prospecto en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana. El aviso del prospecto puede contener instrucciones para el uso de una composición farmacéutica de acuerdo con los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. 65

Un identificador, por ejemplo, un código de barras, radiofrecuencia, etiquetas de ID, etc., puede estar presente en o sobre el kit. El identificador se puede usar, por ejemplo, para identificar de forma particular el kit con fines de control de calidad, control de inventario, seguimiento del movimiento entre estaciones de trabajo, etc.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferentes para hacer y practicar la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Además, a menos que la descripción en un ejemplo se presente en tiempo pasado, el texto, como el resto de la memoria descriptiva, no pretende sugerir que los experimentos se realizaron realmente o que los datos se obtienen realmente.

Ejemplo 1: Preparación de derivados polipeptídicos de IGFBP-3

15 Construcción de vectores de transferencia

Los siguientes vectores de transferencia se usaron en el presente estudio: pDB-3s-H6, pMJ-SeAP y pYM-Fc-IgG1. pDB-3s-H6 es un vector de transferencia de baculovirus para la expresión de proteínas secretoras que se construyó en el laboratorio de los inventores como se ha descrito anteriormente (Netchine et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 2009, 94: 3913-3921). De forma similar, los vectores pMJ-SeAP y pYM-Fc-IgG1 utilizados para producir proteínas de fusión secretadas con fosfatasa alcalina (SeAP) o con el fragmento Fc de IgG1 humana también se construyeron en el laboratorio de los inventores y se han descrito previamente (Bara et al., Int. J. Cancer, 1998, 75: 767-773; Mahiou et al., Biochem. J., 1998, 330: 1051-1058).

25 Todos los vectores de transferencia recombinante se construyeron después de la generación de fragmentos de PCR usando cebadores que comprenden espaciadores y sitios de restricción de endonucleasas apropiados. Para minimizar la formación de estructuras secundarias, estas reacciones se realizaron en dimetilsulfóxido al 10% como se ha descrito anteriormente (Chakrabarti y Schutt, Nucleic Acids Res., 2001, 29: 2377-2381) usando un termociclador Perkin Elmer Life Sciences (Norwalk, CT) en las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 minutos, seguida de ciclos de 30 40 segundos a 94 °C, 60 °C y 72 °C.

En primer lugar, se construyó un vector de transferencia que albergaba la secuencia de codificación completa de IGFBP-3 humana en pDB-3s-H6 aguas abajo de una extensión N-terminal de hexahistidina (Figura 1). La reacción de PCR utilizada: 5' - ATC GAA ggc cgt ggg ggc cAG GGC GCG AGC TCG GGG GGC TTG GG-3' and 5'-Cct cga gTT ATC AGC TGC CCT TGC TCT GCA TGC TGT AGC AGT GCA CGT CCT C-3' (en la que los codones de parada están subrayados) como cebadores sentido y antisentido, respectivamente; y un plásmido que albergaba el ADNc de IGFBP-3 como plantilla. Los sitios de restricción Sfil y XhoI añadidos en los cebadores anteriores se presentan en minúsculas. El producto de PCR de 815 pb se digirió con endonucleasas de restricción Sfil y XhoI y se ligó en el vector de transferencia pDB-3s-H6 previamente digerido con las mismas enzimas. El producto de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* electrocompetentes. Se seleccionó un plásmido recombinante, denominado pDB-3s-H6-IGFBP-3, después de la secuenciación nucleotídica y se cotransfectó junto con ADN baculoviral en células Sf9 para producir el virus recombinante correspondiente que codificaba la proteína recombinante H6-IGFBP-3.

45 Mutagénesis de sitio dirigido

La mutagénesis de sitio dirigido se realizó utilizando un oligonucleótido mutagénico y una plantilla de ADN de cadena sencilla esencialmente como se ha descrito anteriormente (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82: 488-492) usando el kit de mutagénesis "MutaGene® Phagemid *in vitro* versión 2" (BioRad). En resumen, los vectores de transferencia pMJ-H6-IGFBP-3 y pDB-3s-H6-IGFBP-3, cada uno con un origen de replicación M13, se utilizaron para transformar la cepa mutante CJ236 (ung-dut-). Se seleccionó un clon fagémido para producir partículas virales después de la infección con el fago auxiliar M13KO7. Después de la extracción, el ADN monocatenario correspondiente sirvió como plantilla en una reacción de polimerización que comprendía un oligonucleótido mutagénico 5'-fosforilado, ADN polimerasa T7 y ADN ligasa T4 como se describe por Kunkel.

55 El producto monocatenario se usó para transformar una cepa de *E. coli* electrocompetente en competente para un *ung dut*. Los clones transformantes se cribaron para detectar la presencia de la mutación mediante mapeo de restricción y secuenciación nucleotídica. Este enfoque se usó para acortar el dominio intermedio de IGFBP-3 humana mediante la hibridación de una plantilla de ADN de IGFBP-3 monocatenario en el siguiente oligonucleótido mutagénico: 5'-GGG ACC ATA TTC TGT CTC acc acc aga ccc gcc aga ccc gcc aga ccc gcc aga ccc gcc acc GCT GAC GGC ACT AGC GTT GAC-3'. En la muteína resultante, los 85 aminoácidos (Residuo 95 a Residuo 179) presentes en el dominio central de IGFBP-3 de tipo silvestre, se han reemplazado por un espaciador de 15 aminoácidos, cuya secuencia es: NH₂-GGGSGGSGGSGGSGG-COOH. El plásmido mutado obtenido (pDB-mini-IGFBP-3) sirvió para generar un baculovirus recombinante que codificaba esta muteína de IGFBP-3, denominada "mini-IGFBP-3", que carece de la mayor parte del dominio central nativo.

65 Una vez que se obtuvo esta secuencia original, se sintetizó una nueva plantilla de ADN monocatenario y se usó para

generar nuevos mini-IGFBP-3 mutados mediante mutagénesis de sitio dirigido.

Uno de estos mutantes se creó eliminando la secuencia implicada en la unión de ALS para producir mini-IGFBP-3 ALS. Para conseguir este objetivo, los aminoácidos básicos KGRKR en el dominio C-terminal de IGFBP se reemplazaron por la secuencia AGGSG utilizando una plantilla monocatenaria derivada de pBP-mini-IGFBP-3 con: CCACACACCAGCAGAAGCCGCCGCTGCCGCCCGCGGAAGGGCGACACTGC, un oligonucleótido mutagénico.

Se usó la misma plantilla para añadir en el extremo C-terminal de mini-IGFBP-3, el péptido GLNDIFEAQKIEWHE (Beckett et al., Protein Sci., 1999, 8: 921-929), un sustrato para la enzima BirA (Schatz, Biotechnology, 1993, 11: 1138-1143) junto con el siguiente oligonucleótido mutagénico: CCCCTCGAGTCATTATTCGTGCCATTCAATTTTTGGGCTTCAAAAATGTC GTTCAGGCCGCTGCCCTTGCTCTGC. La proteína obtenida, -mini-IGFBP-3-avitag, puede biotinilarse enzimáticamente.

15 Producción de proteínas de fusión

Para obtener la proteína indicadora mini-IGFBP-3, la secuencia codificante de mini-IGFBP-3 se fusionó al extremo 3' de la fosfatasa alcalina secretada (SeAP) por escisión de mini-IGFBP-3 del vector pDB 3s-H6-mini-IGFBP-3 obtenido después de su doble digestión con las endonucleasas de restricción *Sfi*1 y *Xho*1 y la posterior ligación del fragmento resultante en el vector pMJ-SeAP previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido recombinante resultante se utilizó para generar un baculovirus recombinante que codificaba la proteína de fusión indicadora llamada "SeAP-mini-IGFBP-3".

Para obtener la proteína de fusión "mini-IGFBP-3 inmunoadhesina", la unión de mini-IGFBP-3 al fragmento Fc de IgG1 humana, los amplicones mini-IGFBP-3 que comprenden los sitios de restricción apropiados se generaron por PCR y se ligaron al vector pYM-FcgG1 correctamente digerido. El plásmido recombinante resultante se utilizó para generar un baculovirus recombinante que codificaba la proteína de fusión de inmunoadhesina llamada "IGFBP-3-Fc".

30 Purificación de proteínas recombinantes

Se recogió el medio de cultivo de células de insecto infectadas con cualquiera de los virus recombinantes descritos anteriormente y la proteína recombinante se purificó por IMAC esencialmente como se ha descrito anteriormente (Mahiou et al., 1998 - véase anteriormente). Dado que las proteínas recombinantes requerían una etapa de purificación adicional mediante cromatografía de intercambio iónico: la IGFBP-3-Fc inmunoadhesina se purificó adicionalmente mediante cromatografía de afinidad de proteína-A-Sepharose (Mahiou et al., 1998 - véase anteriormente).

Ejemplo 2: Propiedades de Mini-IGFBP-3

La Figura 2 muestra una representación esquemática de IGFBP-3 de tipo silvestre (H6-IGFBP-3) y de IGFBP-3 recombinante mutada (mini-IGFBP-3), que ilustra el hecho de que ésta última deriva de H6-IGFBP-3 de tipo silvestre por reemplazo de la mayor parte de su dominio intermedio por el enlazador flexible de 15 aminoácidos indicado logrado por mutagénesis de sitio dirigido. También se presentan en la Figura 2 las secuencias de aminoácidos de H6-IGFBP-3 y mini-IGFBP-3.

Propiedades de unión. La cinética de asociación y disociación de mini-IGFBP-3 e IGF-II se estudió mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore). Mini-IGFBP-3 se acopló covalentemente a una superficie CM-5 a través de carbodiimida. Después de la saturación con una solución 1 M de etanolamina, se inyectó una solución de IGF-II en PBS en la superficie, y se reemplazó por un tampón después de 80 segundos. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.

La afinidad de la IGFBP-3 de tipo silvestre (wt) y de la IGFBP-3 mutada (mini-IGFBP-3) por IGF-I e IGF II se determinó utilizando ¹²⁵I-IGF-1 como trazador radioactivo. Se utilizaron diversas concentraciones de IGF-I e IGF-II como competidores y las constantes de afinidad se determinaron mediante análisis de Scatchard. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 1. IGFBP-3 de tipo silvestre (wt) y de IGFBP-3 mutada (mini-IGFBP-3) para IGF-I e IGF II

	IGF-I	IGF-II
wt IGFBP-3	2,96 x 10 ¹⁰ M ⁻¹	3,50 x 10 ¹⁰ M ⁻¹
mini-IGFBP-3	2,40 x 10 ¹⁰ M ⁻¹	3,14 x 10 ¹⁰ M ⁻¹

Resistencia de mini-IGFBP-3 a la degradación proteolítica. La susceptibilidad de IGFBP-3 de tipo silvestre y de mini-IGFBP-3 a la degradación proteolítica por trombina se estudió incubando las proteínas purificadas (100 ng) con concentraciones crecientes de trombina (0,0008; 0,004; 0,02 y 0,1 NHI U/ml) durante una hora. Los productos de digestión se separaron entonces por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron por inmunotransferencia utilizando un anticuerpo policlonal de conejo producido contra la molécula de IGFBP-3 completa.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.

Ejemplo 3: Propiedades de mini-IGFBP-3-avitag

5 La Figura 5 muestra una representación esquemática de un mapa de restricción del vector de transferencia pRH-3s-H6-avitag obtenido por mutagénesis de sitio dirigido. En este vector, cualquier secuencia de marco de lectura abierto
 10 flaqueada por los sitios de restricción *Sfi* I y *Pvu* II puede introducirse por PCR en el vector digerido por las mismas enzimas. El polipéptido secretado resultante de la traducción de la construcción llevará el péptido Avitag a su extremo C-terminal y será susceptible de biotilación enzimática dirigida utilizando la enzima BirA. La secuencia codificante
 de mini-IGFBP-3 se introdujo en este vector produciendo secuencialmente, el vector pRH-3s-H6-mini-IGFBP-3, el virus recombinante AcMNPV-mini-IGFBP-3 y la proteína recombinante mini-IGFBP-3-avitag.

Biotilación enzimática de mini-IGFBP-3-Avitag. Para evaluar la susceptibilidad de mini-IGFBP-3-Avitag a la biotilación enzimática, H6-IGFBP-3 recombinante purificada, mini-IGFBP-3 y mini-IGFBP-3-Avitag (1 µg de cada uno) se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul brillante de Coomassie. Se purificó por primera vez mini-
 15 IGFBP-3-Avitag antes de añadirse a una mezcla de reacción de biotilación que contenía biotina y la enzima BirA. Una alícuota del producto de reacción se cargó en un SDS-PAGE lado a lado con un anticuerpo monoclonal (7E8) que previamente se había biotilado químicamente. El gel se transfirió a una membrana de PVDF que, después de la saturación, se incubó con estreptavidina-HRP. La actividad de la peroxidasa se determinó por quimioluminiscencia. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.

Biotilación enzimática dirigida de mini-IGFBP-3-Avitag en extractos en bruto. Los extractos de proteínas de (a) un sobrenadante de un cultivo de células Sf-9 infectadas por un virus que produce mini-IGFBP-3 parental, (b) un sobrenadante de un cultivo de células Sf-9 infectadas por un virus que produce mini-IGFBP-3-Avitag, y (c) mini-IGFBP-
 20 3-avitag purificado se sometieron a biotilación BirA dirigida. Una alícuota de cada una de las muestras se separó entonces por SDS-PAGE y después se transfirió a una membrana de PVDF, que luego se incubó con estreptavidina-AP. La actividad de APasa se demostró entonces añadiendo NBT/BCIP. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7.

Después de una diálisis extensa contra PBS, el medio de cultivo en bruto que contenía mini-IGFBP-3-avitag-biotina (carril e en el panel B de la Figura 7) se inyectó en un chip de estreptavidina. Después del lavado con NaCl 1 M, se
 30 inyectaron secuencialmente una solución que contenía el anticuerpo monoclonal anti-IGFBP-3 6E8 y una solución que contenía IGF-II. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7(C).

Ejemplo 4: Proteína de fusión indicadora de SeAP-mini-IGFBP-3 y usos de la misma

35 La Figura 8(A) muestra el mapa de restricción del vector de transferencia pMJ-SeAP-mini-IGFBP-3 construido y usado para producir la proteína de fusión indicadora SeAP-mini-IGFBP-3.

Ensayo Sandwich en fase sólida. En la Figura 8 (B) se presenta una representación esquemática de un ensayo "sandwich" en fase sólida desarrollado para determinar las concentraciones de pro-IGF-II en plasma humano. Este ensayo "sandwich" utiliza como reactivo de captura un anticuerpo policlonal anti-IGF-II de péptido E inmovilizado en
 40 un soporte y como reactivo indicador específico, SeAP-mini-IGFBP-3.

Este ensayo se validó mediante la determinación de los niveles de pro-IGF-II en el plasma de adultos sanos (n = 40), de pacientes diagnosticados con hipoglucemia tumoral de células no islotes (NICTH) (n = 25) y de pacientes con NICTH después de la extirpación del tumor (n = 4). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 8(C).

Ejemplo 5: Propiedades de mini-IGFBP-3-Fc

La Figura 9(A) muestra el mapa de restricción del vector de transferencia pYM-mini-IGFBP-3 construido y usado para producir la proteína de fusión mini-IGFBP-3-FcIgG1, que se representa esquemáticamente en la Figura 9(B).

Afinidad de mini-IGFBP-3-Fc por IGF-II. Se usó un ensayo en fase sólida para estudiar la afinidad de unión de mini-IGFBP-3-Fc por IGF-II. En este ensayo, dos proteínas de unión (mini-IGFBP-3 y mini-IGFBP-3-Fc) se inmovilizaron en un soporte. Se incubaron con el trazador de IGF-II biotilado y luego se añadieron concentraciones crecientes de IGF-II. Los resultados obtenidos, que se presentan en la Figura 10(A), muestran que el mini-IGFBP-3-Fc se une al IGF-II con mayor afinidad aparente que su equivalente no fusionado (mini-IGFBP-3).

Actividad anti-proliferativa de mini-IGFBP-3-Fc. Se estudiaron los efectos de mini-IGFBP-3-Fc en la proliferación y supervivencia de tres líneas celulares de tumores humanos, Hep3B y HuH7 - líneas celulares de carcinoma hepatocelular) e INA-6 (línea celular de mieloma múltiple). Para cada línea celular cultivada en presencia de suero de ternera fetal (FCS) al 10 %, el efecto de mini-IGFBP-3-Fc se comparó con el efecto de picropodofilina (ppp), un compuesto que se sabe que interfiere con la vía de señalización de IGF1-R. Se realizó un ensayo de viabilidad celular
 60 72 horas después del inicio del cultivo en presencia de mini-IGFBP-3-Fc (100 nM) o ppp (1 µM) en un medio que contenía FCS al 10 % mediante la adición de WST-1 y supervisando la conversión de formazán. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 10(B). Muestran que el mini-IGFBP-3-Fc tiene actividad antiproliferativa en las tres líneas de células tumorales humanas ensayadas.

Inhibición de la fosforilación de AKT por mini-IGFBP-3-Fc. La línea celular de mieloma INA-6 se cultivó en presencia de FCS al 10 %. Las células se incubaron con mini-IGFBP-3 (100 nm) o ppp (1 µM) durante 3, 6 o 24 horas. Después de la incubación, las células se lisaron utilizando un tampón de lisis, y los extractos celulares (normalizados

para los contenidos de proteínas) se cargaron en gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se incubó adicionalmente con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el residuo de fosfo-S273 de la proteína AKT. La membrana también se volvió a sondear después de la eliminación con un anticuerpo anti-actina para verificar la carga equivalente. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 11A).

5 La actividad inhibidora de mini-IGFBP-3-Fc en la fosforilación de AKT también se evaluó en varias líneas de células tumorales humanas: MiaPaCa-2 (cáncer de páncreas), HT-29 (cáncer de colon) y A549 (cáncer de pulmón). La actividad inhibidora de mini-IGFBP-3 en la fosforilación de AKT se evaluó en células A549. Los resultados obtenidos, que se presentan en la Figura 11B), muestran que el mini-IGFBP-3-Fc y el mini-IGFBP-3 son capaces de bloquear la fosforilación de AKT de todas las líneas celulares de tumor humano analizadas.

Ejemplo 6: Propiedades de mini-IGFBP-3 y derivados *in vivo*

15 Para allanar el terreno para futuras evaluaciones de la actividad de mini-IGFBP-3 *in vivo*, mini-IGFBP-3 y sus derivados se inyectaron en ratones. Cuando se midió utilizando la prueba ELISA IGFBP-3 específica para seres humanos, se pudieron observar varias cinéticas.

20 Como se ve en la Figura 12, después de la administración, el mini-IGFBP-3 se eliminó del torrente sanguíneo con dos cinéticas diferentes: el 80-90 % de la dosis inicial abandonó el torrente sanguíneo en las primeras 3-4 horas, mientras que el 10-20 % restante desapareció muy lentamente hasta las 48 horas. Como cabía esperar, el mini-IGFBP-3 que portaba la unión de supresión de la mutación a ALS desapareció mucho más rápido y casi no quedaban proteínas 8 horas después de la inyección. Por el contrario, la concentración sérica de mini-IGFBP-3-Fc decayó con una cinética de pendiente única mucho más lenta con una semivida de aproximadamente 12 horas.

25 La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 productor de IGF-II, que previamente había demostrado ser sensible a mini-IGFBP-3 *in vitro*, se usó para evaluar la actividad *in vivo* de mini-IGFBP-3. Por lo tanto, se establecieron los xenoinjertos HT-29 en ratones desnudos. Una vez que el tumor alcanzó un tamaño crítico, los ratones se trataron con mini-IGFBP-3 o mini-IGFBP3-Fc en tres inyecciones i.p. separadas en un intervalo de tres horas y los ratones se sacrificaron después de 3 horas adicionales. Se evaluaron las vías de señalización de MEK y PI3Cinasa tumorales en estos tumores, junto con el regulador del ciclo celular Rb, mediante la evaluación del estado de fosforilación de AKT, ERK-1/2 y Rb, respectivamente, utilizando inmunotransferencias de Western.

35 Más específicamente, $2,5 \times 10^6$ células HT-29 se inyectaron s.c. en cada costado de ratones NMRI-nu de 5 semanas de edad. Se permitió que los tumores crecieran hasta un volumen de 500 mm³ antes de que los ratones se asignaran al azar a grupos de tratamiento individuales (n = 2) y recibieran tres inyecciones i.p. (340 µg) de mini-IGFBP-3 o mini-IGFBP-3-Fc cada 3 horas. El grupo de control se inyectó con solución salina. Doce (12) horas después del inicio del tratamiento, los ratones se sacrificaron y los tumores extirpados se cortaron por la mitad. Una mitad se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. La otra mitad se fijó en Finfix, se incluyó en parafina y se procesó para determinar la inmunohistoquímica. Para el análisis de transferencia de Western, los tumores se homogeneizaron en tampón de lisis (Tris HCl 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,1 %, SDS al 0,1 %, EDTA 1 mM, ortovanadato sódico 2 mM, comprimido de inhibidor de proteasa [Roche Molecular Biochemicals]). Tras la centrifugación, las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad). Se sometieron quince microgramos de proteína en un gel de SDS-PAGE al 4 %-12 % (Invitrogen). Las membranas se bloquearon en leche desnatada al 5 % en TBS-T durante una noche a 4 °C, se lavaron con TBS-T, se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante anti-ratón o anti-conejo en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron en TBS-T. La señal se visualizó utilizando una solución de quimioluminiscencia mejorada y se expuso a una película. Los anticuerpos de transferencia utilizados fueron fosfor-Akt, Akt, proteína cinasa activada por mitógeno ERK1/2, proteína cinasa activada por fósforo-mitógeno pErk1/2, Rb (BD Biosciences), β-actina y G3PDH; los anticuerpos eran de Cell Signaling Technology, a menos que se indique otra cosa.

45 Como se ve en la Figura 13, un tratamiento de 12 horas con mini-IGFBP-3 o mini-IGFBP-3-Fc, eliminó la fosforilación de AktS473 en tumores de cada ratón tratado, lo que indica un fuerte bloqueo de la vía de señalización de PI3K. Como cabía esperar, la vía de señalización de MEK se interrumpió de manera similar ya que la fosforilación de Erk1/2 también se redujo considerablemente en los tumores tratados en comparación con sus homólogos no tratados. Por lo tanto, el control del ciclo celular se evaluó examinando el estado de fosforilación de la proteína Rb. Como se muestra en la Figura 13, mientras que la proteína Rb estaba completamente fosforilada en tumores no tratados, la fosforilación de Rb disminuyó en todos los tumores tratados. De acuerdo con estos datos, el índice mitótico fue ligeramente más bajo (-12 %) en estos tumores en comparación con su homólogo no tratado. En conjunto, estos datos indican que el mini-IGFBP-3 y su derivado mini-IGFBP-3-Fc están activos *in vivo* para interrumpir las dos vías de señalización principales activadas por las tirosina cinasas del receptor de IGF-1R o IR-A, lo que lleva al inicio de la detención del ciclo celular. Por lo tanto, el secuestro de IGF-I libre y de IGF-II libre en un animal portador de un tumor productor de IGF-II por una proteína de unión a IGF resistente a la proteasa agota los IGF biodisponibles en el tumor a fin de privar al tumor y bloquear las vías de señalización involucradas en el avance del ciclo celular del tumor. La duración del tratamiento utilizado en estos experimentos fue demasiado corta para observar la activación de los marcadores ligados a la apoptosis.

Ejemplo 7: Trabajo presente y futuro

La capacidad del mini-IGFBP-3 para prevenir la aparición de células que escapan de su dependencia al estrógeno se está tratando actualmente. Las células MCF-7 típicas del tipo de neoplasia Luminal A son receptores de estrógeno positivos y dependen de los estrógenos para su multiplicación. En estos experimentos, estas células se colocan en placas en medio empobrecido en estrógenos en presencia o ausencia de mini-IGFBP-3. El crecimiento independiente del estrógeno se evalúa en las placas de control y de prueba mediante tinción con cristal violeta. Mientras que algunas células de control crecen en esas condiciones, no se espera que ninguna célula crezca en placas tratadas con mini-IGFBP-3.

La capacidad de mini-IGFBP-3 para resistir la digestión proteolítica por las metaloproteinasas de matriz, MMP-7 e MMP-9, también se está probando actualmente. MMP-7 y MMP-9 se expresan por células tumorales y están presentes en mayor cantidad en el torrente sanguíneo de pacientes con cáncer, donde contribuyen a la degradación de la IGFBP-3 nativa y endógena. En los experimentos, estas enzimas se activan primero con APMA 1 mM. Mini-IGFBP-3 y IGFBP-3 de longitud completa se comparan como sustrato para MMP-7 y MMP-9 activadas. Las concentraciones de cada sustrato (20 µM) se incuban en una relación molar de 1:10 con MMP-7 o MMP-9. Al final del periodo de incubación, las proteínas se analizan mediante SDS-PAGE para evaluar su división respectiva en fragmentos. Considerando que, la IGFBP-3 de longitud completa se digiere tanto con MMP-7 como MMP-9, el mini-IGFBP-3 resiste este ataque proteolítico.

Lista de secuencias

<110> INSERM
GODEAU, François

<120> Derivados de IGFBP-3 y usos de los mismos

<130> BEP090788

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 713 068 T3

Met Gln Arg Ala Arg Pro Thr Leu Trp Ala Ala Ala Leu Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 Val Leu Leu Arg Gly Pro Pro Val Ala Arg Ala Gly Ala Ser Ser Ala
 20 25 30
 Gly Leu Gly Pro Val Val Arg Cys Glu Pro Cys Asp Ala Arg Ala Leu
 35 40 45
 Ala Gln Cys Ala Pro Pro Pro Ala Val Cys Ala Glu Leu Val Arg Glu
 50 55 60
 Pro Gly Cys Gly Cys Cys Leu Thr Cys Ala Leu Ser Glu Gly Gln Pro
 65 70 75 80
 Cys Gly Ile Tyr Thr Glu Arg Cys Gly Ser Gly Leu Arg Cys Gln Pro
 85 90 95
 Ser Pro Asp Glu Ala Arg Pro Leu Gln Ala Leu Leu Asp Gly Arg Gly
 100 105 110

Leu Cys

5 <210> 2
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Val Asn Ala Ser Ala Val Ser Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Ala Pro Gly Asn Ala Ser Glu Ser Glu Glu Asp Arg Ser Ala
 20 25 30
 Gly Ser Val Glu Ser Pro Ser Val Ser Ser Thr His Arg Val Ser Asp
 35 40 45
 Pro Lys Phe His Pro Leu His Ser Lys Ile Ile Ile Ile Lys Lys Gly
 50 55 60
 His Ala Lys Asp Ser Gln Arg Tyr Lys Val Asp Tyr Glu Ser Gln Ser
 65 70 75 80
 Thr Asp Thr Gln Asn Phe Ser Ser Glu Ser Lys Arg Glu Thr Glu Tyr
 85 90 95

10 Gly Pro

<210> 3
 <211> 79
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 3

ES 2 713 068 T3

Cys Arg Arg Glu Met Glu Asp Thr Leu Asn His Leu Lys Phe Leu Asn
1 5 10 15

Val Leu Ser Pro Arg Gly Val His Ile Pro Asn Cys Asp Lys Lys Gly
20 25 30

Phe Tyr Lys Lys Lys Gln Cys Arg Pro Ser Lys Gly Arg Lys Arg Gly
35 40 45

Phe Cys Trp Cys Val Asp Lys Tyr Gly Gln Pro Leu Pro Gly Tyr Thr
50 55 60

Thr Lys Gly Lys Glu Asp Val His Cys Tyr Ser Met Gln Ser Lys
65 70 75

5 <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> enlazador
<400> 4

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

15 <210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> sitio de no unión a ALS
<400> 5

Ala Gly Gly Ser Gly
1 5

25 <210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sustrato de enzima BirA
<400> 6

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

35 <210> 7
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 713 068 T3

<223> cebador
 <400> 7
 atcgaaggcc gtgggggcca gggcgcgagc tcggggggct tggg 44
 5
 <210> 8
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
 15 cctcgagtta tcagctgccc ttgctctgca tgctgtagca gtgcacgtcc tc 52
 <210> 9
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> oligonucleótido mutagénico
 25 <400> 9
 gggaccatat tctgtctcac caccagacc gccagaccgc ccagaccgc cagaccgcc 60
 accgctgacg gcactagcgt tgac 84
 <210> 10
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido mutagénico
 35 <400> 10
 ccacacacca gcagaagccg ccgctgccgc ccgcggaagg gcgacactgc 50
 40 <210> 11
 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido mutagénico
 <400> 11
 cccctcgagt cattattcgt gccattcaat tttttgggct tcaaaaatgt cgttcaggcc 60
 50 gctgcccttg ctctgc 76

REIVINDICACIONES

1. Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 que comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, en el que:

5 el dominio N-terminal comprende la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, o de un fragmento biológicamente activo de la misma que conserva la capacidad del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y la subunidad ácido-lábil (ALS);
 10 el dominio intermedio comprende la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de la IGFBP-3 humana de tipo salvaje, en el que 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 residuos de aminoácidos contiguos de dicha secuencia de aminoácidos se reemplazan con un el enlazador que es resistente a la escisión proteolítica por proteasas que escinden la IGFBP-3 humana de tipo silvestre y que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4; y
 15 el dominio C-terminal comprende la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, o de un fragmento biológicamente activo de la misma que conserva la capacidad del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y ALS.

2. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio intermedio de IGFBP-3 humana de tipo salvaje consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

20 3. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio intermedio del derivado polipeptídico de IGFBP-3 consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en el que 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 se reemplazan con un el enlazador que es resistente a la escisión proteolítica por proteasas que escinden la IGFBP-3 humana de tipo silvestre y que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

25 4. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es la expuesta en la SEQ ID NO: 1; y
 30 la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es la expuesta en la SEQ ID NO: 3.

5. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:

35 el dominio N-terminal del derivado polipeptídico de IGFBP-3 consiste en la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 1; y
 el dominio C-terminal del derivado polipeptídico de IGFBP-3 consiste en la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 3.

40 6. Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 que comprende un dominio N-terminal, un dominio intermedio y un dominio C-terminal, en el que:

45 el dominio N-terminal comprende la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de IGFBP-3 humana de tipo silvestre, o de un fragmento biológicamente activo de la misma que conserva la capacidad del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre para unirse a IGF-I, IGF-II, heparina y la subunidad ácido-lábil (ALS);
 el dominio intermedio comprende la secuencia de aminoácidos del dominio intermedio de la IGFBP-3 humana de tipo salvaje, en el que 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 residuos de aminoácidos contiguos de dicha secuencia de aminoácidos se reemplazan con un el enlazador que es resistente a la escisión proteolítica por proteasas que escinden la IGFBP-3 humana de tipo silvestre y que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4; y
 50 el dominio C-terminal comprende la secuencia de aminoácidos del dominio C-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 3, en la que los residuos de aminoácidos 43 a 47 en la SEQ ID NO: 3 se reemplazan con AGGSG (SEQ ID NO: 5).

55 7. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el dominio intermedio de IGFBP-3 humana de tipo salvaje consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

8. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el dominio intermedio del derivado polipeptídico de IGFBP-3 consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2, en el que 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91 o 92 residuos de aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 2 se reemplazan con un el enlazador que es resistente a la escisión proteolítica por proteasas que escinden la IGFBP-3 humana de tipo silvestre y que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 4.

9. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que:
 65 la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre es la expuesta en la SEQ ID NO: 1.

10. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que: el dominio N-terminal del derivado polipeptídico de IGFBP-3 consiste en la secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de la IGFBP-3 humana de tipo silvestre expuesta en la SEQ ID NO: 1.
- 5 11. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende además, fusionado al mismo, el fragmento Fc de inmunoglobulina IgG1.
- 10 12. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además la secuencia de aminoácidos de IGF-I, en el que el IGF-I forma complejo con el derivado polipeptídico de IGFBP-3.
- 15 13. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un sustrato de la enzima BirA unido covalentemente al extremo terminal del dominio C-terminal del derivado polipeptídico de IGFBP-3.
- 20 14. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el sustrato de la enzima BirA tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6.
- 25 15. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que comprende además biotina unida covalentemente al sustrato de la enzima BirA.
- 30 16. El derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende además, fusionado al mismo, la secuencia de aminoácidos de SeAP (fosfatasa alcalina secretada).
- 35 17. Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 13 a 16 para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en cánceres y retinopatías proliferativas.
- 40 18. Un derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en resistencia a la hormona del crecimiento, deficiencia de IGF-I, quemaduras graves, desgaste por VIH, fibrosis quística, enfermedad celíaca, anorexia nerviosa, enfermedad de desgaste muscular, distrofia miotónica, esclerosis lateral amiotrófica, osteoporosis, resistencia grave a la insulina, diabetes de tipo I, diabetes tipo II, isquemia cerebral, e isquemia cardíaca.
- 45 19. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
20. Un método para determinar la concentración de pro-IGF-II en una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de:
- poner en contacto la muestra biológica con un derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 12 para permitir la formación de un complejo entre el derivado polipeptídico de IGFBP-3 y cualquier pro-IGF-II presente en la muestra biológica, en donde pro-IGF-II es una forma parcialmente procesada de IGF-II; y determinar la concentración de pro-IGF-II en la muestra biológica midiendo la actividad alcalina de SeAP en el complejo.
21. Un kit que comprende un derivado polipeptídico de IGFBP-3 de acuerdo con la reivindicación 16 y al menos un reactivo para medir la actividad alcalina.

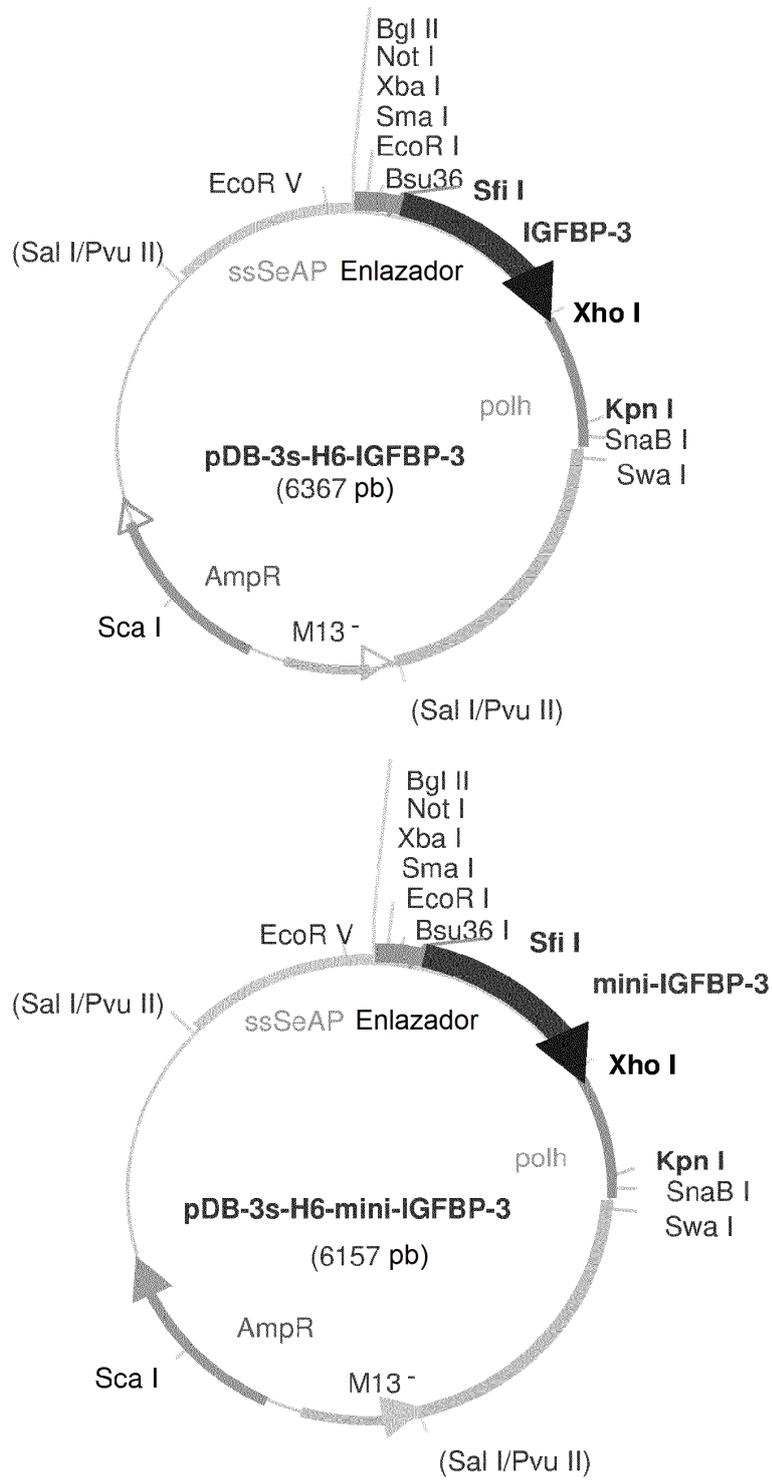
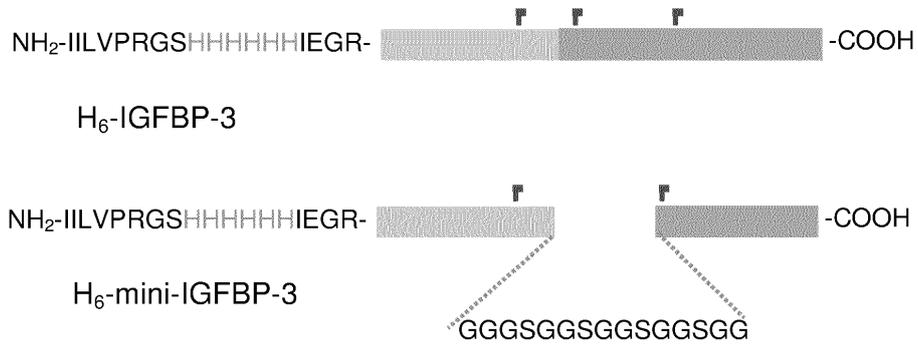


Figura 1

A



B

```

1           20
I I L V P R G S H H H H H I E G R G G Q G A S S G G L G P V V R C E P C D A R A L A Q C A P P P A
I I L V P R G S H H H H H I E G R G G Q G A S S G G L G P V V R C E P C D A R A L A Q C A P P P A
40           60
V C A E L V R E P G C G C C L T C A L S E G Q P C G I Y T E R C G S G L R C Q P S P D E A R P L Q A
V C A E L V R E P G C G C C L T C A L S E G Q P C G I Y T E R C G S G L R C Q P S P D E A R P L Q A
100          120
L L D G R G L C V N A S A V S R L R A Y L L P A P P A P G N A S E S E E D R S A G S V E S P S V S S
L L D G R G L C V N A S A V S -----
140          160
T H R V S D P K F H P L H S K I I I K K G H A K D S Q R Y K V D Y E S Q S T D T Q N F S S E S K R
----- GGGSGGSGGSGGSGG -----
200          220
E T E Y G P C R R E M E D T L N H L K F L N V L S P R G V H I P N C D K K G F Y K K K Q C R P S K G
E T E Y G P C R R E M E D T L N H L K F L N V L S P R G V H I P N C D K K G F Y K K K Q C R P S K G
240          260
R K R G F C W C V D K Y G Q P L P G Y T T K G K E D V H C Y S M Q S K
R K R G F C W C V D K Y G Q P L P G Y T T K G K E D V H C Y S M Q S K

```

Figura 2

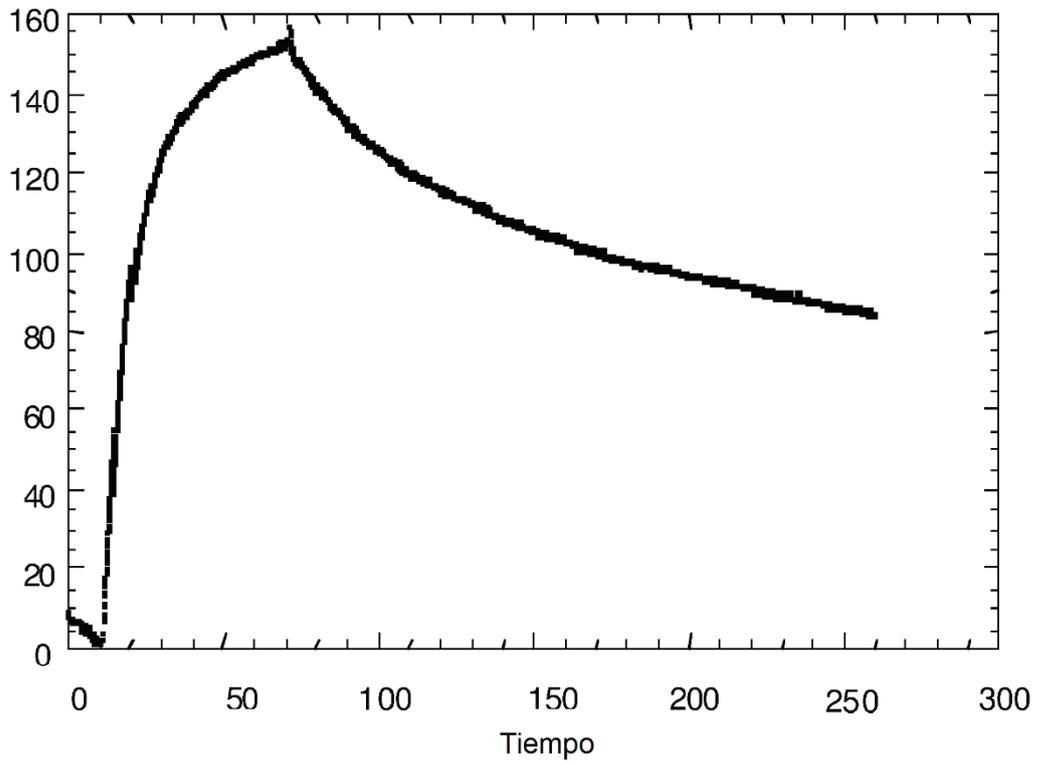


Figura 3

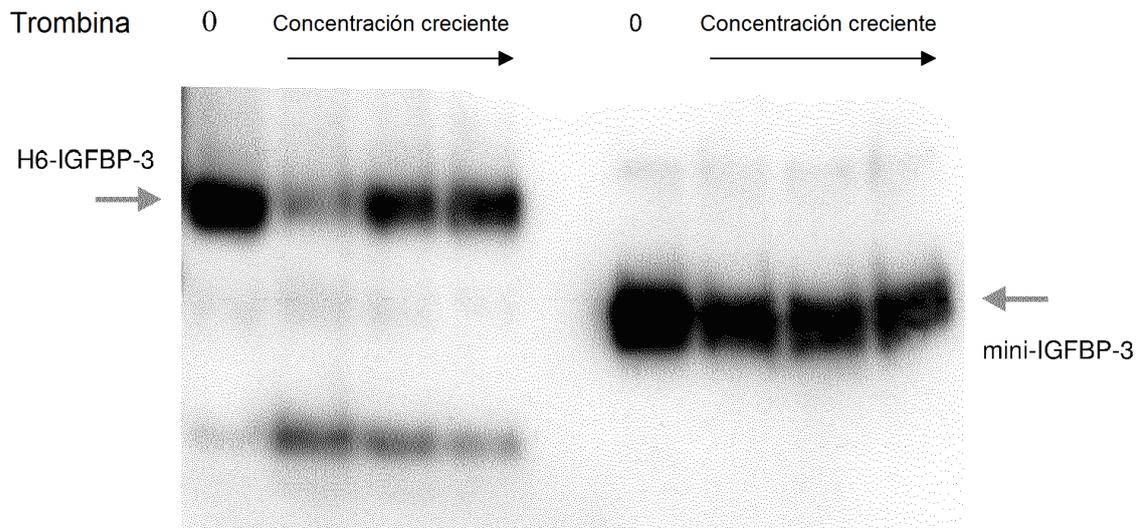


Figure 4

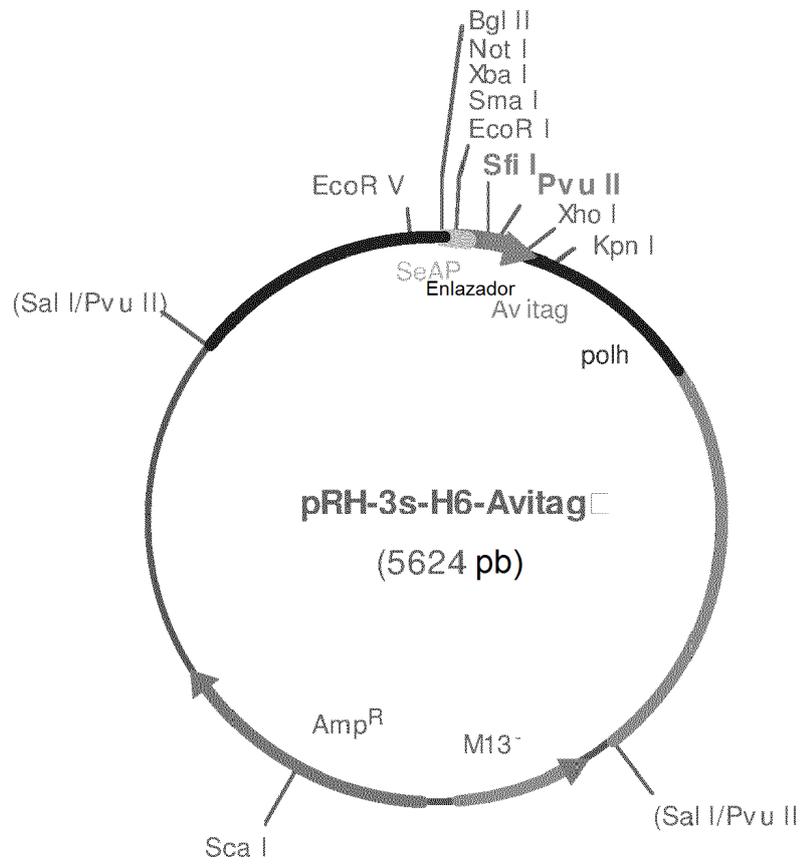


Figura 5

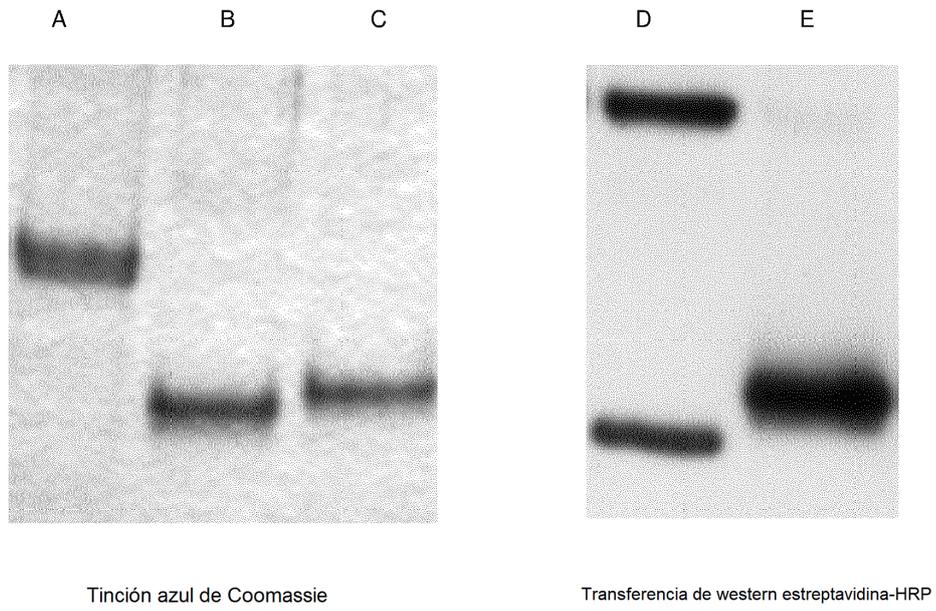


Figura 6

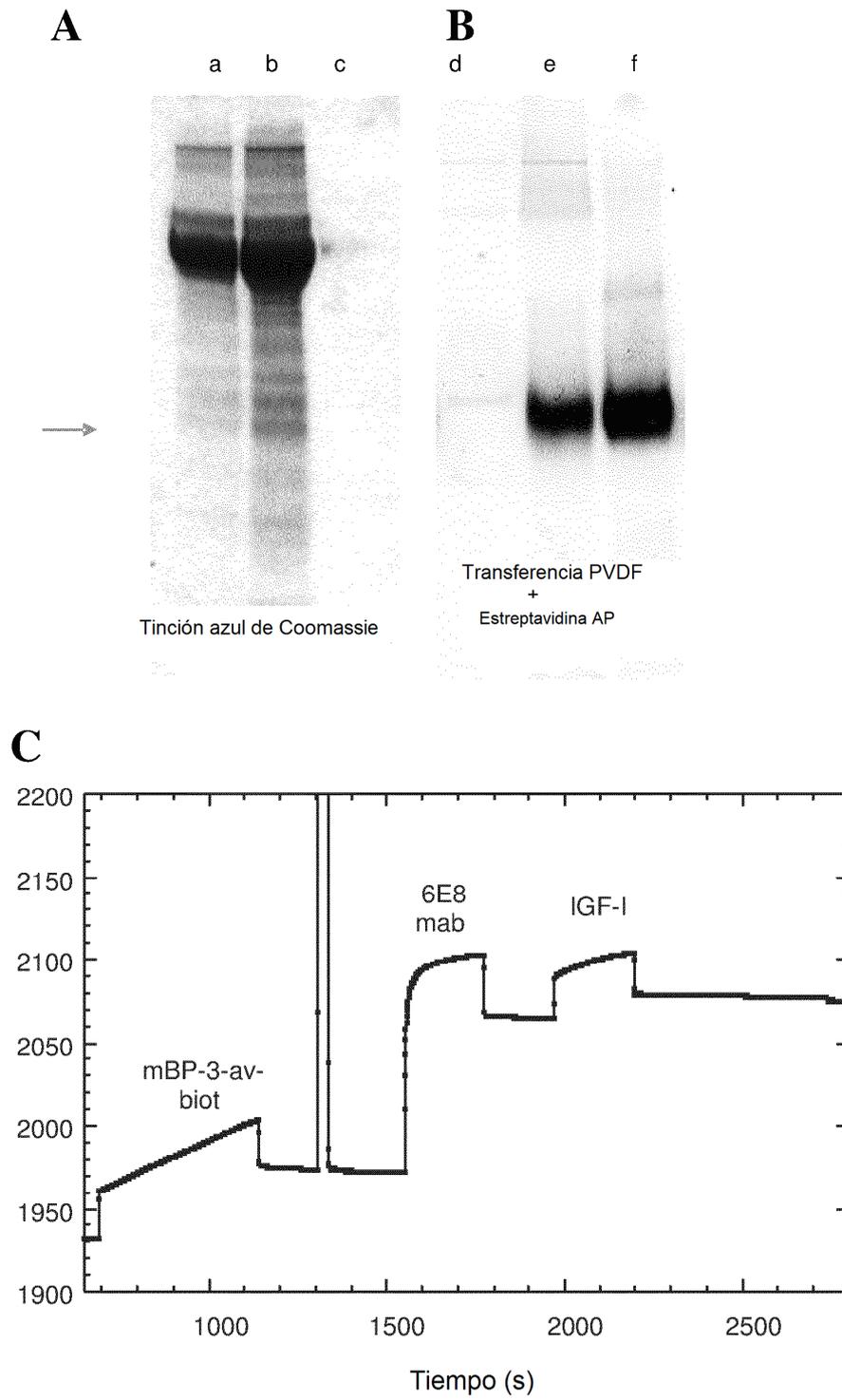


Figura 7

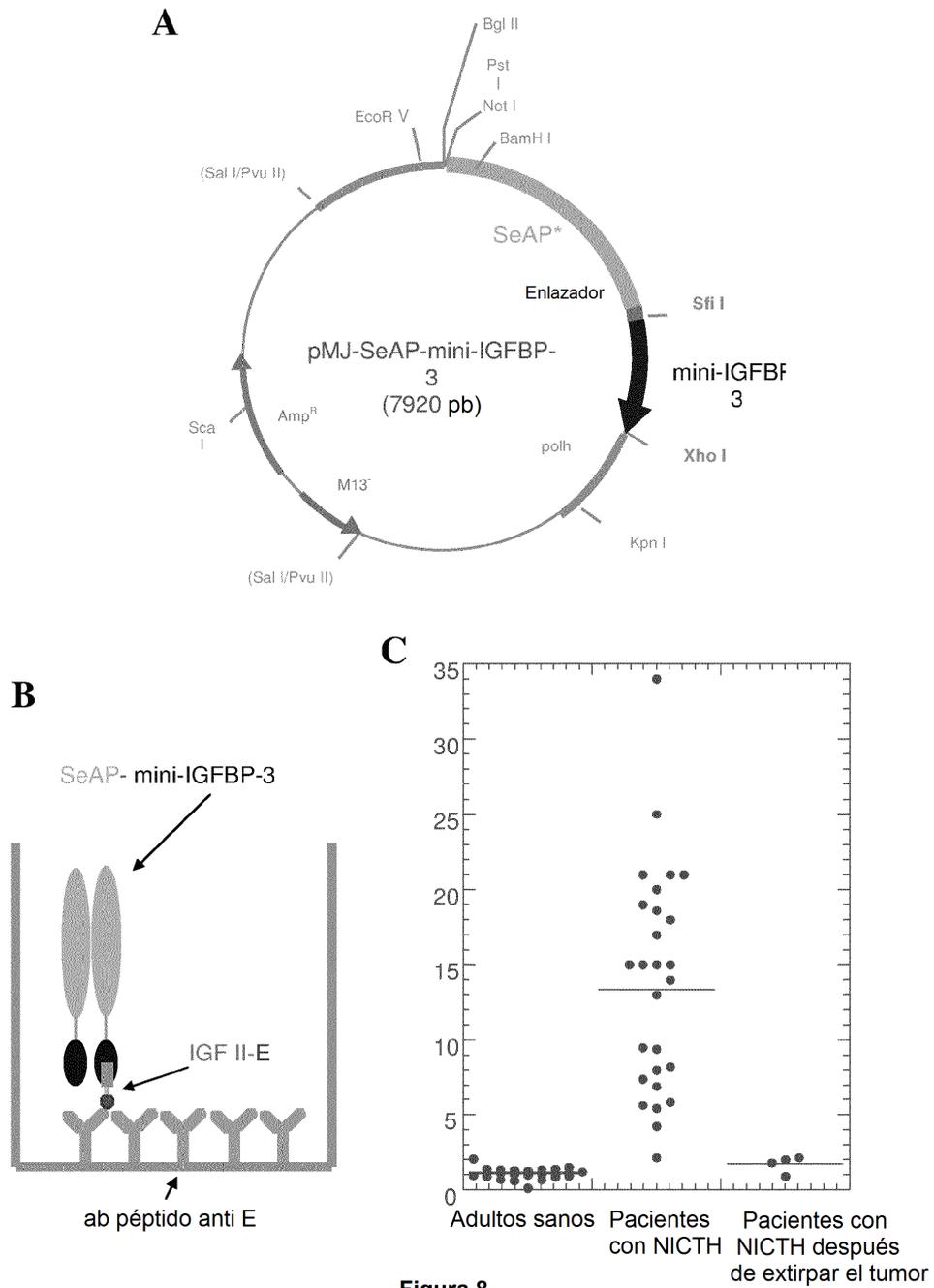
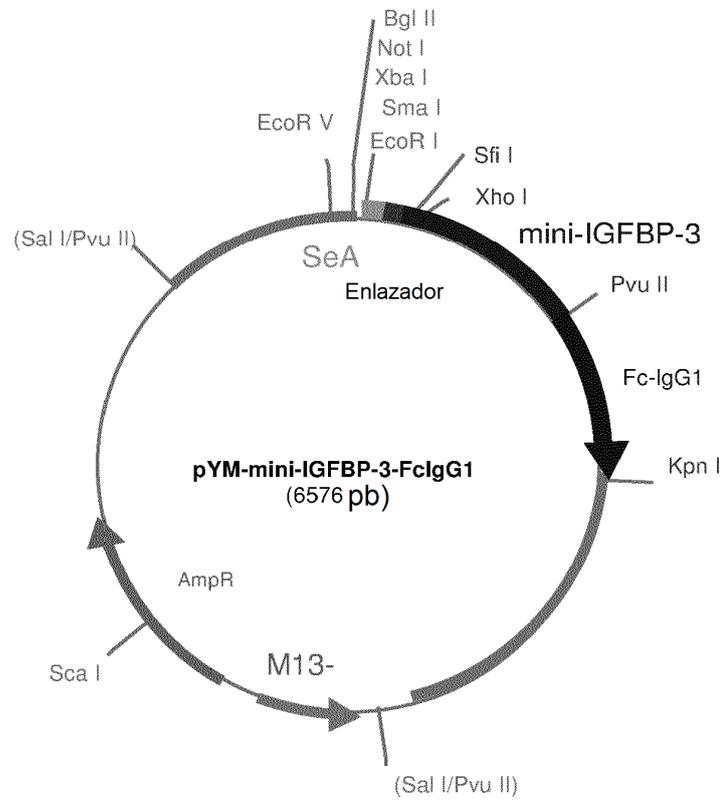


Figura 8

A



B

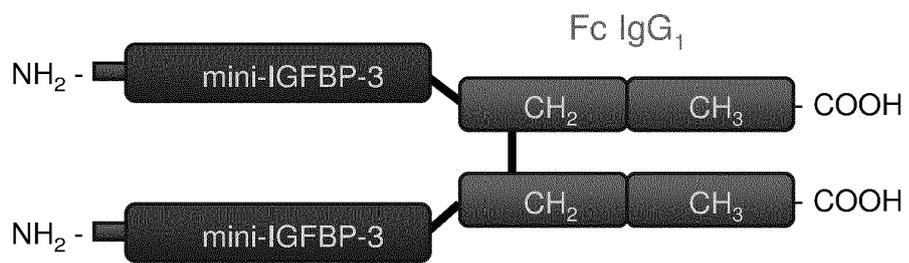
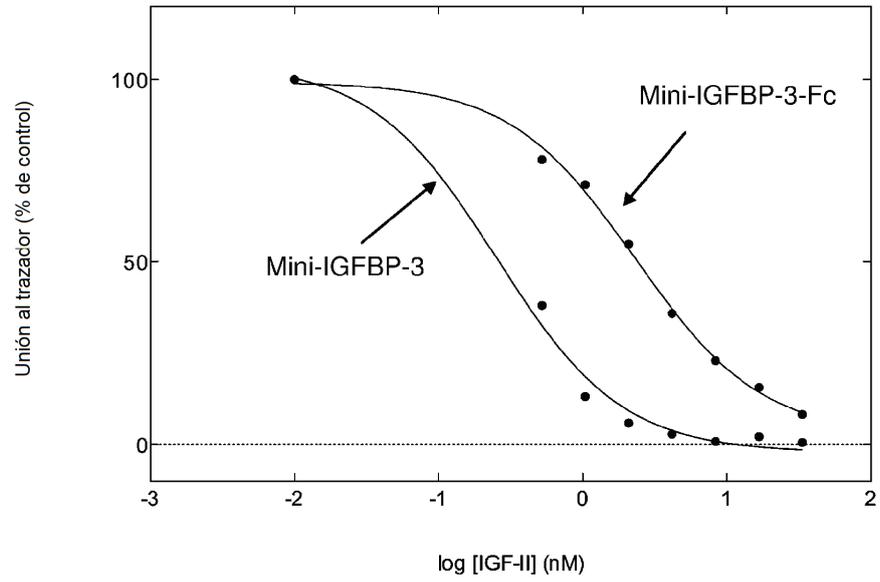


Figura 9

A



B

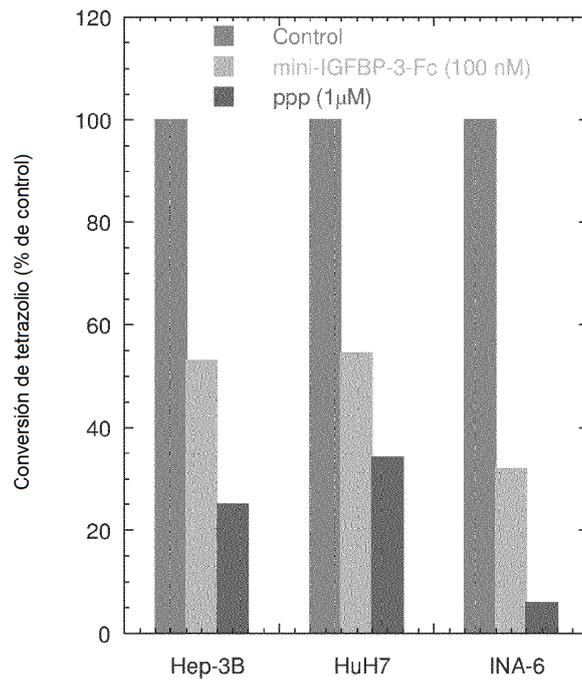
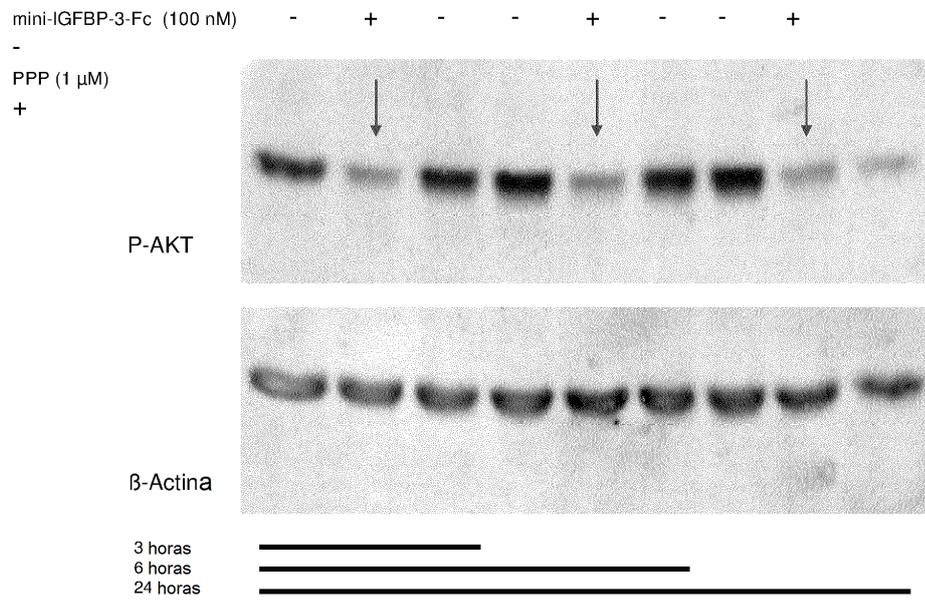


Figura 10

A



B

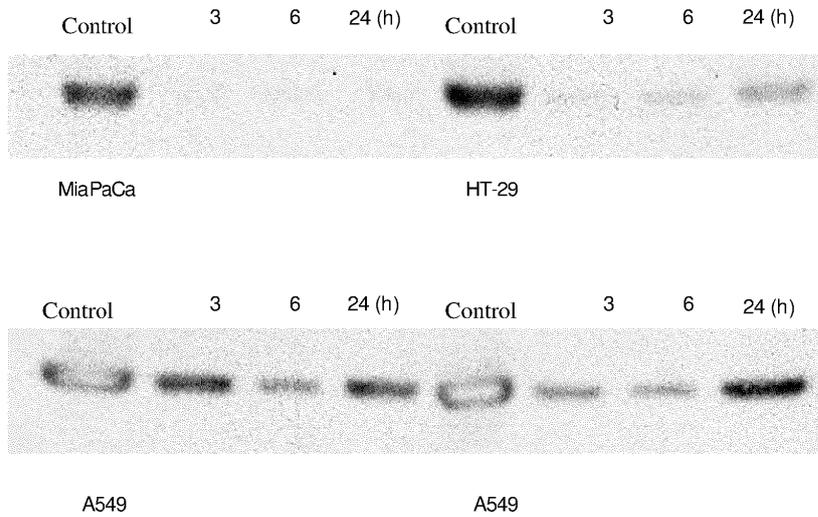


Figura 11

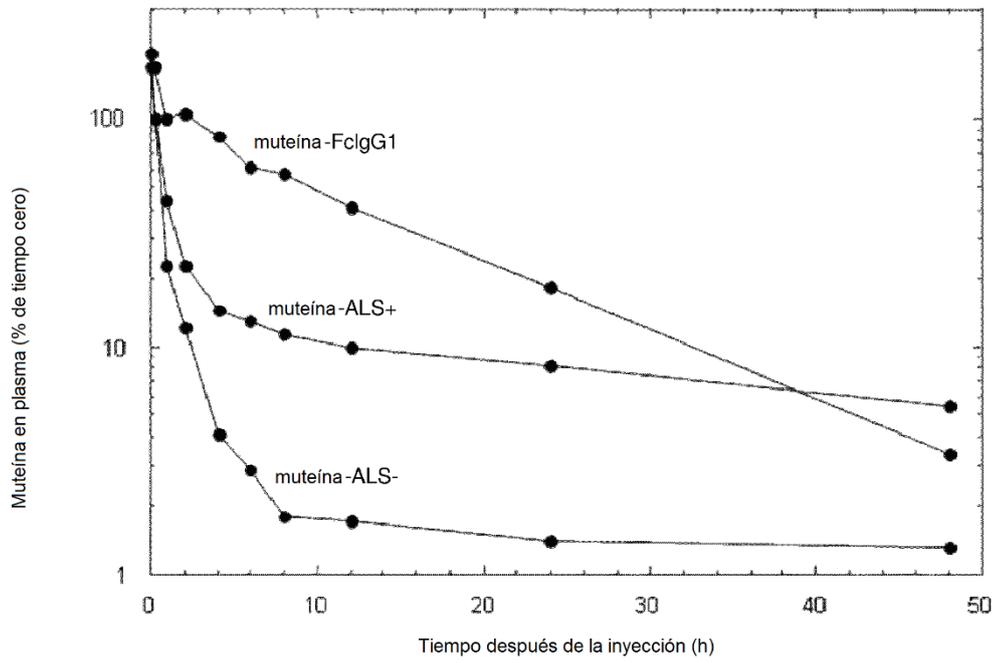


Figura 12

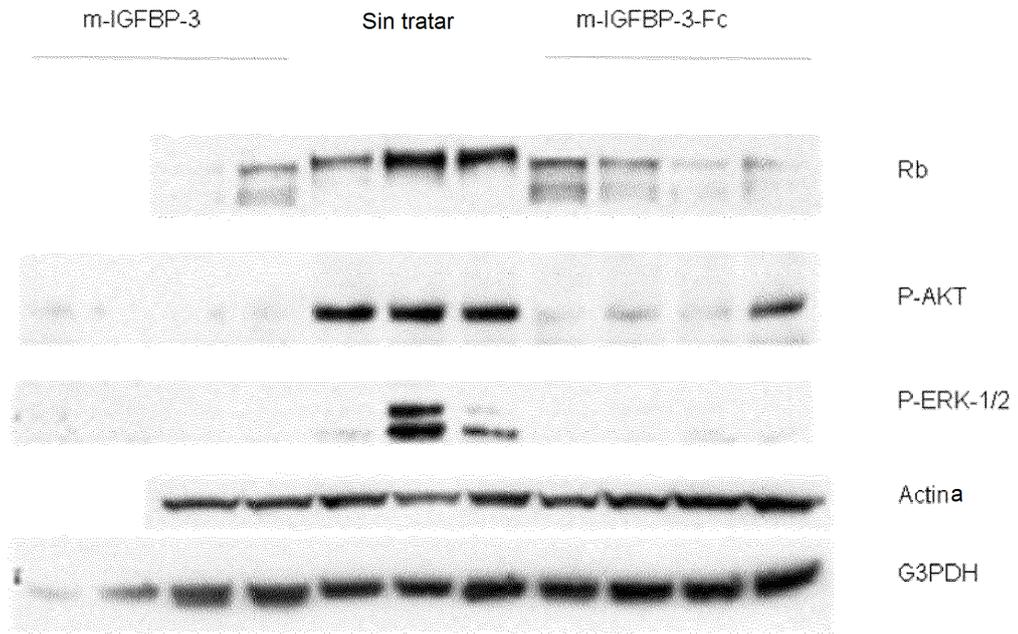


Figura 13