

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 163**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2019 PCT/US2019/026889**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2019 WO19200033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2019 E 19723548 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 3774859**

54 Título: **Composiciones de proteína de fusión recombinante de neuregulina-1 (NRG-1) humana y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

11.04.2018 US 201862656246 P

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

30.09.2024

73 Titular/es:

**SALUBRIS BIOTHERAPEUTICS, INC. (50.0%)
45 West Watkins Mill Road Suite E
Gaithersburg MD 20878, US y
SALUBRIS (CHENGDU) BIOTECH CO., LTD.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**LI, JOHN;
LI, SHENGWEI;
LUO, DIXIANG;
WU, YIRAN;
ZHOU, MING;
ZHUANG, XIAOLEI;
HUA, LIANG;
LUO, PENGYI y
WANG, YANG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 980 163 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

Composiciones de proteína de fusión recombinante de neuregulina-1 (NRG-1) humana y métodos de uso de las mismas

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La neuregulina (NRG; heregulina, HRG), también conocida como factor de crecimiento glial (GGF) y nuevo factor de diferenciación (NDF), es un tipo de glicoproteína con un peso molecular de 44 KD. La familia de proteínas NRG tiene cuatro miembros: NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4. NRG (incluyendo NRG-1) desempeña un papel particularmente importante en el desarrollo del corazón. Como ligando de tirosina cinasas receptoras de la familia ErbB, NRG-1 se une directamente a ErbB3 o ErbB4 unidos a la membrana, induciendo la dimerización para crear complejos ErbB2/ErbB4, ErbB2/ErbB3, ErbB3/ErbB3 y ErbB4/ErbB4, y la posterior señalización intracelular. En modelos animales, la expresión de NRG induce señalización paracrina para promover el crecimiento y la diferenciación en el tejido cardíaco durante la embriogénesis, y la eliminación de cualquiera de ErbB2, ErbB4 o NRG-1 conduce a la letalidad embrionaria. Además, se ha demostrado que las terapias contra el cáncer que bloquean la señalización del receptor de ErbB2 tienen importantes efectos secundarios de cardiotoxicidad, lo que demuestra en seres humanos que la señalización mediada por ErbB2 es esencial no sólo para el desarrollo sino también para la homeostasis del tejido cardíaco sano.

Las pruebas también muestran que la transducción de señales de NRG-1 juega un papel en el desarrollo y función de otros sistemas de órganos, así como en la patogénesis de enfermedades humanas (incluyendo la esquizofrenia y el cáncer de cabeza y cuello). NRG-1 tiene muchos isómeros. La investigación en ratones con genes mutados (ratones con supresión de genes) indica que los isómeros con diferentes regiones N terminales o dominios similares a EGF tienen diferentes funciones *in vivo*. La presente descripción se basa en la isoforma NRG-1βa2.

El NRG-1 endógeno se une e induce la señalización a través tanto de ErbB3 (HER3) como de ErbB4 (HER4). Numerosos estudios preclínicos y clínicos han demostrado el potencial terapéutico de NRG-1 en una variedad de indicaciones cardiovasculares, principalmente a través de sus interacciones con ErbB4 expresada en cardiomiocitos (HER4). Sin embargo, tres factores clave limitan las aplicaciones clínicas y la utilidad de la NRG-1 humana recombinante (rhNRG-1). En primer lugar, la señalización de NRG-1 a través de HER3 puede promover el desarrollo y/o la progresión del cáncer, lo que genera preocupaciones importantes para cualquier aplicación que requiera una administración crónica o sin factores de riesgo cardiovascular (CV) graves. En segundo lugar, la sobreactivación de HER3 por NRG-1 puede alterar la integridad epitelial y la homeostasis gastrointestinal (GI), lo que provoca una toxicidad gastrointestinal grave, y por tanto pérdida de la ventana terapéutica para NRG-1. En tercer lugar, ambos fragmentos de proteína activa de rhNRG-1 en etapa clínica han mostrado una vida media corta, lo que indica que pueden ser necesarios programas de dosificación y administración onerosos para lograr los niveles terapéuticos de exposición deseados. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un tratamiento basado en NRG-1 que conserve un potencial terapéutico clínicamente significativo en una variedad de indicaciones cardiovasculares, pero con un menor riesgo de oncogénesis o promoción de la progresión del cáncer, una mejor tolerabilidad gastrointestinal, y un perfil farmacocinético (PK) más favorable.

La invención aborda estas necesidades proporcionando una proteína recombinante que comprende una fusión del dominio activo de rhNRG-1 con un anticuerpo antagonista específico de HER3, como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto: La señalización de HER3 se bloquea de una manera que mitiga el riesgo oncogénico y la toxicidad gastrointestinal de rhNRG-1, y al mismo tiempo, el formato de la cadena principal del anticuerpo confiere una vida media molecular de un anticuerpo monoclonal típico, lo que permite una dosificación y administración más convenientes para el producto.

SUMARIO DE LA INVENCION

50 La invención está definida por el conjunto de reivindicaciones adjunto. Cualquier referencia a 'aspectos', 'casos', 'descripción', 'descrito aquí' o 'proporcionado aquí' se refiere a materia objeto que no se reivindica explícitamente y no define el alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones.

55 En un aspecto, se describe aquí una proteína de fusión recombinante que comprende un fragmento de la proteína cardioprotectora neuregulina-1 (NRG-1) fusionada a una cadena principal de anticuerpo monoclonal (mAb). En un aspecto relacionado, el fragmento de NRG-1 se fusiona con el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo mediante un conector. En otro aspecto relacionado, NRG-1 se une al conector a través del primer (1^{er}) aminoácido en el extremo N de NRG-1, que en un caso es un aminoácido de serina (S o Ser). En un aspecto relacionado, el fragmento es un fragmento activo que comprende el dominio activo de NRG-1. En otro aspecto relacionado, el mAb es mono específico para ErbB3 (HER3). En otro aspecto relacionado, la NRG-1 es la isoforma β2a de NRG-1.

60 En otro aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión recombinante que comprende un fragmento de la proteína cardioprotectora neuregulina-1 (NRG-1) fusionada a una cadena principal de anticuerpo monoclonal anti-HER3, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se describe un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión recombinante descrita aquí.

5 En otro aspecto, se describe un método para prevenir, inhibir, suprimir o retrasar la aparición de una enfermedad o afección cardiovascular en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión recombinante descrita aquí.

10 En otro aspecto, se describe un método para tratar una enfermedad o afección relacionada con el SNC en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión recombinante.

15 En otro aspecto, se describe un método para prevenir, inhibir, suprimir o retrasar la aparición de una enfermedad o afección relacionada con el SNC en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión recombinante.

En otro aspecto relacionado, NRG-1 se une e induce la señalización a través de ErbB4 (HER4). En otro aspecto relacionado, el mAb inhibe la señalización de NRG-1 a través de ErbB3 (HER3).

20 En otro aspecto, la descripción se refiere a un kit que comprende una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante de la descripción o de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión recombinante de la descripción.

25 Otras características y ventajas de la invención y descripción resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos y figuras de descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La FIGURA 1 muestra la construcción de los plásmidos de expresión para expresar la proteína de fusión recombinante descrita aquí.

35 La FIGURA 2A-D ilustra la estructura esquemática de la proteína de fusión recombinante descrita aquí. La FIGURA 2A ilustra un esquema molecular de una proteína de fusión mAb anti-HER3/NRG-1 de la descripción. La FIGURA 2B muestra datos representativos generados por análisis de SDS-PAGE. La FIGURA 2C muestra los resultados de la transferencia Western detectados por el anticuerpo primario específico para el fragmento activo de 61 aminoácidos de NRG-1 que comprende el dominio de unión a HER3/4 ("NRG-1", R&D Systems, Minneapolis, MN). La FIGURA 2D muestra los resultados de la transferencia Western detectados por el anticuerpo primario específico para IgG.

40 La FIGURA 3 ilustra un análisis de unión que muestra que la proteína de fusión recombinante descrita aquí se une a la proteína HER3 (Curva 1, Etapa 2) y puede unirse simultáneamente a un anticuerpo anti-NRG-1 (Curva 1, Etapa 3). Téngase en cuenta que se introdujeron mutaciones de Fc en la proteína de fusión recombinante descrita aquí para suprimir la función efectora de Fc de la secuencia del anticuerpo original que codifica un anticuerpo específico de HER3, lo que puede mitigar la citotoxicidad no deseada hacia los tejidos normales que expresan el receptor de HER3.

45 La FIGURA 4A-D muestra gráficos representativos que muestran la tasa de crecimiento relativa media \pm SEM ($n = 3$) para diferentes líneas celulares cancerosas tratadas con una proteína de fusión mAb anti-HER3/NRG-1 o controles. La Figura 4A muestra la tasa de crecimiento relativa media en la línea celular de cáncer gástrico NCI-N87. La Figura 4B muestra la tasa de crecimiento relativa media en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. La Figura 4C muestra la tasa de crecimiento relativa media en la línea celular de cáncer de vejiga RT-112. La Figura 4D muestra la tasa de crecimiento relativa media en la línea celular de cáncer de mama T47D. En comparación con el péptido NRG-1 de control y la proteína de fusión mAb anti-GP120/NRG-1, la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí demuestra una actividad notablemente menor para promover la proliferación de células cancerosas.

50 La FIGURA 5A-B ilustra que a pesar del potencial reducido de crecimiento de células cancerosas, la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí conserva completamente la capacidad de inducir la señalización de PI3K/AKT en cardiomiocitos - lo que demuestra una actividad comparable a la de NRG-1 y la proteína de fusión mAb anti-GP120/NRG-1 recombinantes. La FIGURA 5A es un gráfico que muestra la relación relativa de fosfo-AKT (pAKT) a AKT total (tAKT) frente a la concentración de anticuerpo (en nM) en cardiomiocitos humanos tratados con la proteína de fusión recombinante de la descripción y con controles. La FIGURA 5B es un análisis de transferencia Western de la fosforilación de AKT en cardiomiocitos humanos tratados con la proteína de fusión recombinante de la descripción y con controles.

65

Las FIGURAS 6A-C muestran una comparación directa de la dimerización de HER2/4 y HER2/3 en presencia de la proteína de fusión recombinante descrita aquí y de controles. La FIGURA 6A muestra el principio del ensayo para detectar la dimerización inducida por ligando. El ensayo de dimerización PathHunter desarrollado por Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) se usa para detectar la dimerización inducida por ligando de dos subunidades de un par receptor-dímero. La enzima β -gal se divide en dos fragmentos, ProLink (PK) y receptor enzimático (EA). Las células se han diseñado para coexpresar la proteína diana 1 fusionada con el donante enzimático PK, y la proteína diana 2 fusionada con el aceptor enzimático EA. La unión del ligando a una proteína diana la induce a interactuar con la otra proteína diana, forzando la complementación de los dos fragmentos enzimáticos y dando como resultado la reacción enzimática para liberar una señal quimioluminiscente que se detecta como Unidad de Fluorescencia Relativa o UFR. La FIGURA 6B es un gráfico que ilustra que la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí puede inducir la dimerización de HER2/HER4 con una potencia comparable a la de NRG-1. La Figura 6C es un gráfico que ilustra que la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí es significativamente menos potente que NRG-1 para inducir la dimerización de HER2/HER3. Estos hallazgos validan adicionalmente que la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí preserva todo el potencial de señalización de HER2/4 de NRG-1 al tiempo que reduce significativamente la inducción de la señalización de HER2/3.

La FIGURA 7 ilustra la afinidad de unión de la proteína de fusión mAb anti-HER3/NRG-1 al antígeno HER3 en diferentes especies, incluidas humana, mono, rata y ratón. La tasa de disociación de equilibrio (KD) determinada mediante análisis BIAcore es $3,13 \times 10^{-10}$ (humano), $3,97 \times 10^{-10}$ (mono), $2,68 \times 10^{-9}$ (rata) y $2,77 \times 10^{-9}$ (ratón), respectivamente. Estos datos indican que la proteína de fusión recombinante tiene una afinidad de unión similar por HER3 humana y de mono, mientras que su afinidad por HER3 de roedor (rata y ratón) es menor en aproximadamente un orden de magnitud.

La FIGURA 8 es un gráfico que ilustra el efecto de la proteína de fusión recombinante sobre la fracción de eyección (EF) en un modelo de rata de insuficiencia cardíaca sistólica inducida por ligadura de la arteria coronaria.

La FIGURA 9A-F es una serie de 6 imágenes que muestran cambios histopatológicos en la estructura del músculo cardíaco en un modelo de rata de insuficiencia cardíaca sistólica inducida por ligadura de la arteria coronaria. Los tejidos cardíacos próximos al sitio quirúrgico se recogieron y se fijaron en formaldehído al 4 %, y después se prepararon secciones de parafina y se tiñeron con H&E. La FIGURA 9A muestra tejido cardíaco de una rata de control de cirugía simulada. La FIGURA 9B muestra tejido cardíaco de una rata de modelo de insuficiencia cardíaca sistólica tratada con control del vehículo. La Figura 9C muestra tejido cardíaco de una rata de modelo de insuficiencia cardíaca sistólica tratada con mAb anti-GP120/NRG-1 (10 mg/kg). La FIGURA 9D muestra tejido cardíaco de una rata de modelo de insuficiencia cardíaca sistólica tratada con mAb anti-HER3/NRG-1 (1 mg/kg). La FIGURA 9E muestra tejido cardíaco de una rata de modelo de insuficiencia cardíaca sistólica tratada con mAb anti-HER3/NRG-1 (3 mg/kg). La FIGURA 9F muestra tejido cardíaco de una rata de modelo de insuficiencia cardíaca sistólica tratada con mAb anti-HER3/NRG-1 (10 mg/kg).

La FIGURA 10 es un gráfico que ilustra la evaluación de la actividad antitumoral *in vivo* usando un modelo de xenoinjerto de carcinoma FaDu subcutáneo en ratones NOD/SCID.

La FIGURA 11 es un gráfico que ilustra los cambios de peso corporal en ratones portadores de tumor tratados con la proteína de fusión recombinante de la descripción y con controles.

La FIGURA 12 es un gráfico que ilustra el perfil farmacocinético de la proteína de fusión recombinante en monos cinomolgos (macacos).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención, que se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto, proporciona una proteína de fusión recombinante que comprende una fusión entre un anticuerpo monoclonal fusionado a un fragmento activo de una isoforma de la proteína neuregulina-1 para uso en una variedad de indicaciones cardiovasculares y del sistema nervioso central (SNC).

Definiciones

A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

Para fines de interpretación de esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones, y cuando sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa.

"Neuregulina o análogos de neuregulina" son moléculas que pueden activar proteínas tirosina cinasas heterodímeras ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3, tales como todas las isoformas de neuregulina, el dominio de EGF de neuregulina solo, mutantes de neuregulina, y cualquier tipo de productos genéticos similares a neuregulina que también activen los receptores anteriores. La "neuregulina" preferida usada aquí es un fragmento polipeptídico de la isoforma β2 de neuregulina 1 humana que contiene el dominio similar a EGF y el dominio de unión al receptor. En un caso, el fragmento de neuregulina es un fragmento activo. La neuregulina-1 (NRG-1) y sus isoformas también se conocen en la técnica como neuregulina 1 (NRG1), factor de crecimiento glial (GGF), heregulina (HGL), HRG, nuevo factor de diferenciación (NDF), ARIA, GGF2, HRG1, HRGA, SMDF, MSTP131, MSTP131 y transcripto intrónico 2 de NRG1 (NRG1-IT2).

Los términos "ErbB3", "ErbB3 (HER3)", "HER3" se refieren a la misma proteína (o al mismo gen cuando se hace referencia al mismo), y se usan indistintamente aquí. En algunos casos, la fusión recombinante comprende una porción de anticuerpo monoclonal que es específica para ErbB3. ErbB3 (tirosina cinasa receptora 3 de erb-b2) también se conoce en la técnica como FERLK, LCCS2, ErbB-3, c-erbB3, erbB3-S, MDA-BF-1, c-erbB-3, p180-ErbB3, p45-sErbB3 y p85-sErbB3.

En un caso, los términos "ErbB4", "ErbB4 (HER4)", "HER4" se refieren a la misma proteína (o al mismo gen cuando se hace referencia al mismo), y se usan indistintamente aquí. ErbB4 (tirosina cinasa receptora 4 de erb-b2) también se conoce en la técnica como ALS19 y p180erbB4.

En un caso, los términos "ErbB2", "ErbB2 (HER2)", "HER2" se refieren a la misma proteína (o al mismo gen cuando se hace referencia al mismo), y se usan indistintamente aquí. ErbB2 (tirosina cinasa receptora 2 de erb-b2) también se conoce en la técnica como NEU, NGL, TKR1, CD340, HER-2, MLN 19 y HER-2/neu.

El término "activo", como se usa aquí, se refiere a un fragmento que tiene una actividad biológica o una función biológica. En algunos casos, la actividad es igual o se aproxima a la actividad de la proteína de tipo salvaje.

El término "sujeto", como se usa aquí, incluye, pero no se limita a, un mamífero, incluido, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, mono), un ratón, un cerdo, una vaca, una cabra, un conejo, una rata, un cobaya, un hámster, u caballo, un mono, una oveja u otro mamífero no humano, un no mamífero, incluido, por ejemplo, un vertebrado no mamífero, tal como un ave (por ejemplo, un pollo o un pato) o un pez; y un invertebrado no mamífero. En algunos casos, los métodos y composiciones descritos aquí se usan para tratar (tanto de forma profiláctica como terapéuticamente) animales no humanos. El término "sujeto" también puede referirse a pacientes, es decir, individuos que esperan o reciben atención médica.

La expresión "composición farmacéutica" significa aquí una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto, incluido un animal o un ser humano. Una composición farmacéutica comprende generalmente una cantidad eficaz de un agente activo (por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes de la descripción) y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un amortiguador, adyuvante o similar).

La expresión "cantidad eficaz" significa una dosis o cantidad suficiente para producir un resultado deseado. El resultado deseado puede comprender una mejora objetiva o subjetiva en el receptor de la dosis o cantidad (por ejemplo, supervivencia a largo plazo, disminución del número y/o tamaño de los tumores, prevención eficaz de una enfermedad, etc.).

Un "tratamiento profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos o síntomas de una enfermedad, patología, o trastorno médico, o muestra sólo signos o síntomas tempranos de una enfermedad, patología, o trastorno, de manera que el tratamiento se administra con el propósito de disminuir, prevenir o reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, patología, o trastorno médico. Un tratamiento profiláctico funciona como tratamiento preventivo contra una enfermedad o trastorno. Una "actividad profiláctica" es una actividad de un agente, tal como la proteína de fusión recombinante descrita aquí, o una composición de la misma, que, cuando se administra a un sujeto que no muestra signos o síntomas de una patología, enfermedad o trastorno (o que muestra sólo signos o síntomas tempranos de una patología, enfermedad, o trastorno) disminuye, previene o reduce el riesgo de que el sujeto desarrolle la patología, enfermedad, o trastorno. Un agente o compuesto "profilácticamente útil" (por ejemplo, una proteína de fusión recombinante de la descripción) se refiere a un agente o compuesto que es útil para disminuir, prevenir, tratar o reducir el desarrollo de una patología, enfermedad o trastorno.

Un "tratamiento terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra síntomas o signos de patología, enfermedad o trastorno, en el que el tratamiento se administra al sujeto con el fin de disminuir o eliminar esos signos o síntomas de patología, enfermedad o trastorno. Una "actividad terapéutica" es una actividad de un agente, tal como una proteína de fusión recombinante de la descripción, o una composición de la misma, que elimina o disminuye los signos o síntomas de una patología, enfermedad o trastorno, cuando se administra a un sujeto que padece tales signos o síntomas. Un agente o compuesto "terapéuticamente útil" (por ejemplo, una proteína de fusión recombinante de la descripción) indica que un agente o compuesto es útil para disminuir, tratar o eliminar tales signos o síntomas de la patología, enfermedad o trastorno.

La expresión "tratar el cáncer" como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir, ya sea parcial o completamente, el crecimiento de tumores, metástasis tumorales, u otras células neoplásicas o que causan cáncer en un sujeto. El término "tratamiento", como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, se refiere al acto de tratar.

5 La expresión "tratar una enfermedad cardiovascular" como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, significa prevenir, inhibir, suprimir, retrasar, revertir, o aliviar, ya sea parcial o completamente, la aparición de una enfermedad o afección cardiovascular en un sujeto, o la progresión de una enfermedad o afección cardiovascular preexistente, o un síntoma de la misma, en un sujeto. Los ejemplos no limitativos de enfermedades cardiovasculares que pueden
10 tratarse mediante los métodos de la descripción incluyen insuficiencia cardíaca crónica/insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), insuficiencia cardíaca aguda/infarto de miocardio (IM), disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, lesión por reperfusión asociada con IM, cardiotoxicidad inducida por quimioterapia (de adulto o pediátrica),
15 cardiotoxicidad inducida por radiación, complementaria a intervención quirúrgica en cardiopatías congénitas pediátricas. Ejemplos no limitativos de síntomas de enfermedad cardiovascular incluyen dificultad para respirar, tos, aumento rápido de peso, hinchazón en piernas, tobillos y abdomen, mareos, fatiga, debilidad, mareos, dolor torácico, desmayos (síncope), taquicardia y bradicardia. Los métodos para determinar la progresión de la enfermedad cardiovascular y la eficacia del tratamiento serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica. Por ejemplo, la
20 progresión de diversas enfermedades cardiovasculares se puede determinar mediante fracción de eyección, electrocardiograma (ECG), monitorización Holter, ecocardiograma, prueba de esfuerzo, cateterismo cardíaco, tomografía computarizada (TC) cardíaca y resonancia magnética cardíaca (MRI).

La expresión "tratar una enfermedad relacionada con el sistema nervioso central (SNC)" como se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, significa un método para prevenir, inhibir, suprimir, retrasar, revertir o aliviar, ya sea parcial
25 o completamente, la aparición de una enfermedad o afección relacionada con el SNC en un sujeto. La expresión "tratar una enfermedad relacionada con el SNC" también puede significar revertir, ralentizar o aliviar de otro modo una enfermedad o afección preexistente relacionada con el SNC, o un síntoma de la misma. Los ejemplos ejemplares pero
30 no limitativos de enfermedades o afecciones relacionadas con el SNC que pueden tratarse con los métodos de la descripción incluyen esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, parálisis de Bell, epilepsia y convulsiones, síndrome de Guillain-Barré, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, o una combinación de ellas. El tratamiento de enfermedades relacionadas con el SNC puede mejorar o prevenir síntomas como temblores, bradicinesia, rigidez muscular, pérdida de equilibrio, alteración de la postura, cambios en el habla, pérdida del control motor, parálisis, dificultad para tragar, calambres musculares, convulsiones, pérdida de memoria y confusión.

35 Los términos "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos o restos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener la máxima correspondencia. Para determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean con fines de comparación
40 óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Entonces se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son
45 idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En algunos casos, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La expresión "sustancialmente idéntico", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94
50 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % de identidad, o al menos 99 % de identidad (por ejemplo, según se determina usando uno de los métodos expuestos más adelante).

Como se usa aquí, la expresión "se une", "se une específicamente a", o es "específico para", se refiere a interacciones medibles y reproducibles tales como la unión entre una diana y un anticuerpo, que es determinante de la presencia de
55 la diana en presencia de una población heterogénea de moléculas, incluidas moléculas biológicas. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a una diana (que puede ser un epítipo) es un anticuerpo que se une a esta diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que con la que se une a otras dianas. En un caso, el grado de unión de un anticuerpo a una diana no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a la diana, medida, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En ciertos casos, un anticuerpo
60 que se une específicamente a una diana tiene una constante de disociación (Kd) de <1 μ M, <100 nM, <10 nM, <1 nM o <0,1 nM.

En ciertos casos, un anticuerpo se une específicamente a un epítipo de una proteína que se conserva entre proteínas de diferentes especies. En otro caso, la unión específica puede incluir, pero no requiere, la unión exclusiva.

65

Como se usan en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, las referencias a "neuregulina" o "un péptido de neuregulina" incluyen mezclas de dichas neuregulinas, isoformas de neuregulina, y/o polipéptidos similares a neuregulina. La referencia a "la formulación" o "el método" incluye una o más formulaciones, métodos, y/o etapas del tipo descritas aquí y/o que resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer esta descripción.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y su equivalente, y no se refiere a una longitud específica de un producto; por tanto, "péptidos" y "proteínas" están incluidos dentro de la definición de polipéptido. También se incluyen dentro de la definición de polipéptidos los "anticuerpos" como se definen aquí. Una "región polipeptídica" se refiere a un segmento de un polipéptido, cuyo segmento puede contener, por ejemplo, uno o más dominios o motivos (por ejemplo, una región polipeptídica de un anticuerpo puede contener, por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR). El término "fragmento" se refiere a una porción de un polipéptido que tiene preferiblemente al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido.

A menos que se indique lo contrario por el contexto, un "derivado" es un polipéptido o fragmento del mismo que tiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas con respecto a un segundo polipéptido (también denominado "variante"); o un polipéptido o fragmento del mismo que se modifica mediante unión covalente de una segunda molécula tal como, por ejemplo, mediante unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, y similares. Además, dentro de la definición de "derivado" se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (por ejemplo, aminoácidos no naturales y similares), polipéptidos con enlaces no sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural.

Un polipéptido "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. Un polipéptido aislado incluye un anticuerpo aislado, o un fragmento o derivado del mismo.

El término "alrededor de", como se usa aquí, significa en términos cuantitativos más o menos 5 %, o en otro caso más o menos 10 %, o en otro caso más o menos 15 %, o en otro caso más o menos 20 %.

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto normal en la técnica a la que pertenece la invención.

Proteína de fusión recombinante - Anticuerpo

La descripción proporciona una proteína de fusión recombinante que comprende una fusión entre un anticuerpo monoclonal fusionado a un fragmento de una isoforma de la proteína neuregulina-1 para uso en una variedad de indicaciones cardiovasculares y neurológicas. En casos típicos, el anticuerpo es específico para ERBB3 (HER3).

Como se usa aquí, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos codificados sustancial o parcialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural típica de inmunoglobulina (por ejemplo, anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (alrededor de 25 kD) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos, responsable principalmente del reconocimiento de antígenos. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a VH-CH1 mediante un enlace de disulfuro. El F(ab')₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace de disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero F(ab')₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, Nueva York (1999), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpo). Si bien diversos fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos Fab', etc., pueden sintetizarse de novo ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa aquí, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo utilizando metodologías de ADN recombinante. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monocatenarios, incluidos anticuerpos Fv monocatenarios (sFv o scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen (directamente o a través de un

conector peptídico) para formar un polipéptido continuo. Los anticuerpos incluyen anticuerpos de un solo dominio, que comprenden un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico que es capaz de unirse selectivamente a un dominio de antígeno. Los anticuerpos de un solo dominio ejemplares incluyen fragmentos VHH, que se aislaron originalmente de camélidos.

El dominio de anticuerpo de la proteína de fusión comprende opcionalmente todo o parte de una molécula de inmunoglobina, y contiene opcionalmente todo o parte de una región variable de inmunoglobina (es decir, el área de especificidad para el antígeno relacionado con la enfermedad) y comprende opcionalmente región o regiones codificadas por un gen V y/o un gen D y/o un gen J.

Como se explicó anteriormente (véase Definiciones, más arriba), los anticuerpos usados aquí comprenden opcionalmente F(ab)2, F(ab')2, Fab, Fab', scFv, anticuerpos de un solo dominio, etc. Algunas proteínas de fusión de la descripción comprenden dominios de IgG. Sin embargo, otros comprenden inmunoglobinas alternativas tales como IgM, IgA, IgD e IgE. Además, en esta descripción también se incluyen todos los isotipos posibles de las diversas inmunoglobinas. Por lo tanto, IgG1, IgG2, IgG3, etc. son todas moléculas posibles en los dominios de anticuerpo de las proteínas de fusión anticuerpo-inmunoestimulante usadas aquí. Además de la elección en la selección del tipo de inmunoglobina y el isotipo, se pueden escoger diversas regiones bisagra (o equivalentes funcionales de las mismas). Tales regiones bisagra proporcionan flexibilidad entre los diferentes dominios de las proteínas de fusión anticuerpo-inmunoestimulante. Véase, por ejemplo, Penichet, et al. 2001 "Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer" J Immunol Methods 248:91-101.

En algunos casos, el mAb comprendido por la proteína de fusión recombinante de la descripción es monoespecífico para ErbB3 (HER3).

HER3 humana (ErbB-3, ERBB3, c-erbB-3, c-erbB3, tirosina-proteína cinasa receptora erbB-3) codifica un miembro de la familia de tirosina cinasas receptoras del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que también incluye HER1 (también conocido como EGFR), HER2 y HER4 (Kraus, M.H. et al, PNAS 86 (1989) 9193-9197; Plowman, G.D. et al, PNAS 87 (1990) 4905-4909; Kraus, M.H. et al, PNAS 90 (1993) 2900-2904). Al igual que el receptor prototípico del factor de crecimiento epidérmico, el receptor transmembrana HER3 consiste en un dominio de unión a ligando extracelular (ECD), un dominio de dimerización dentro del ECD, un dominio transmembrana, un dominio de proteína tirosina cinasa intracelular (TKD) y un dominio de fosforilación C-terminal. Esta proteína HER3 unida a la membrana tiene un dominio de unión a heregulina (HRG) dentro del dominio extracelular, pero no un dominio de cinasa activo. Por lo tanto, puede unirse a este ligando pero no transmitir la señal al interior de la célula mediante la fosforilación de proteínas. Sin embargo, forma heterodímeros con otros miembros de la familia de HER que sí tienen actividad de cinasa. La heterodimerización conduce a la activación de la ruta de señalización mediada por receptores y a la transfosforilación de su dominio intracelular. La formación de dímeros entre los miembros de la familia de HER amplía el potencial de señalización de HER3, y es un medio no sólo para la diversificación de la señal sino también para su amplificación. Por ejemplo, el heterodímero HER2/HER3 induce una de las señales mitogénicas más importantes a través de la ruta PI3K y AKT entre los miembros de la familia de HER (Sliwkowski M.X., et al, J. Biol. Chem. 269 (1994) 14661-14665; Alimandi M, et al, Oncogene. 10 (1995) 1813- 1821; Hellyer, N.J., J. Biol. Chem. 276 (2001) 42153-4261; Singer, E., J. Biol.

En un caso, la proteína ERBB3 humana comprende la siguiente secuencia de aminoácidos proporcionada en GenBank AAH02706.1 y expuesta en SEQ ID NO: 1:

```
MRANDALQVLGLLFLSLARGSEVGNVQAVCPGTLNGLSVTGD AENQYQTLYK
LYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRG
TQVYDYGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLC HMDTIDWR
DIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCKGRCWGPGESEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGP
NPNQCCHDECAGGCSGPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQPLVYNKLTFFQLEPNPH
TKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSCVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGGLCPKAF (SEQ ID NO: 1). Debe
entenderse que la secuencia de ERBB3 (HER3) contra la que se dirige el anticuerpo de los presentes métodos y
composiciones puede ser un isómero, homólogo o variante de SEQ ID NO: 1.
```

En un caso, el mAb de la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí es un mAb anti-Her3 que inhibe la señalización de NRG-1 a través de ErbB3 (HER3).

En un caso particular, el mAb comprendido por la proteína de fusión recombinante de la descripción comprende un mAb anti-HER3. Tales anticuerpos anti-HER3 pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes: patritumab, seribantumab (mAb completamente humano), LJM716, KTN3379, AV-203, REGN1400, GSK2849330, o MM-141. Tales anticuerpos también pueden seleccionarse de cualquiera de las siguientes formas, incluida la forma quimérica, biespecífica, no humana, completamente humana, o humanizada, siempre que se unan e inhiban la señalización de ERBB3 humana (HER3). En algunos casos, el anticuerpo anti-HER3 es de origen humano.

En algunos casos, el término "anticuerpo" abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpos que incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo

humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, u otro anticuerpo modificado genéticamente siempre que se conserven las propiedades características deseadas. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente su dominio variable, o al menos su sitio de unión al antígeno. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpos monocatenarios, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos scFv se describen, por ejemplo, en Huston, JS, *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-88. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que tienen las características de un dominio V_H, es decir, que pueden ensamblarse junto con un dominio V_L, o de un dominio V_L que se une al antígeno respectivo y que puede ensamblarse junto con un dominio V_H para formar un sitio de unión al antígeno funcional y que proporciona así las propiedades de un anticuerpo según la descripción. Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan aquí, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de un solo aminoácido.

En algunos casos, se puede usar un anticuerpo quimérico en las composiciones y métodos proporcionados aquí. En un caso, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de ratón, y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, normalmente preparada mediante técnicas de ADN recombinante. Se prefieren especialmente los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable de ratón y una región constante humana. Tales anticuerpos quiméricos de rata/humano son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN que codifican regiones variables de inmunoglobulina de rata y segmentos de ADN que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" son aquellas en las que la clase o subclase se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original. Estos anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de transfección de genes y ADN recombinante convencionales, ahora bien conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Morrison, S.L., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; y los documentos US 5.202.238 y US 5.204.244.

En un caso, se puede usar un anticuerpo humanizado en las composiciones y métodos proporcionados aquí. En algunos casos, la expresión "anticuerpo humanizado" o "versión humanizada de un anticuerpo" se refiere a anticuerpos en los que la región estructural o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad en comparación con la de la inmunoglobulina original. En otros casos, las CDR de la V_H y V_L se injertan en la región estructural del anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., et al, *Nature* 332 (1988) 323-327; y Neuberger, MS et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Las regiones estructurales variables de cadena pesada y ligera pueden derivar de la misma o diferente secuencia de anticuerpo humano. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser secuencias de anticuerpos humanos de origen natural. Las regiones estructurales variables de las cadenas pesadas y ligeras humanas se enumeran, por ejemplo, en Lefranc, M.-P., *Current Protocols in Immunology* (2000) - Apéndice IP A.1P.1-A.1P.37, y son accesibles a través de IMGt, el ImMunoGeneTics internacional. information system® (<http://imgt.cines.fr>) o a través de <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>. Opcionalmente, la región estructural puede modificarse mediante mutaciones adicionales. Las CDR particularmente preferidas corresponden a aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos mencionados anteriormente para anticuerpos quiméricos. La expresión "anticuerpo humanizado", como se usa aquí, también comprende aquellos anticuerpos que se modifican en la región constante para generar las propiedades descritas aquí, especialmente con respecto a la unión del componente 1q (Clq) del complemento y/o a la unión al receptor Fc (FcR), por ejemplo mediante "cambio de clase", es decir, cambio o mutación de partes de Fc (por ejemplo, de IgG1 a IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4). La expresión "anticuerpo humano", como se usa aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, MA, y van de Winkel, JG, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits, A., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al, *Nature* 362 (1993) 255-258; Brueggemann, M.D., et al., *Year Immunol.* 7 (1993) 33-40). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom, HR, y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 381-388; Marks, JD, et al, *J. Mol. Biol.* 222 (1991) 581-597). Las técnicas de Cole, A., et al. y Boerner, P., et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, A., et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Liss, AL, p. 77 (1985); y Boerner, P., et al, *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Como ya se mencionó para los anticuerpos humanizados, la expresión "anticuerpo humano", como se usa aquí, también comprende aquellos anticuerpos que se modifican en la región constante para generar las propiedades descritas aquí.

En un caso particular, el mAb comprendido por la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí comprende al menos una mutación en el dominio o región Fc.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula

5 hospedante, por ejemplo una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana, o anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedante. Estos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes en forma reordenada. Los anticuerpos humanos recombinantes descritos aquí se han sometido a hipermutación somática *in vivo*. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

10 En algunos casos, las expresiones "que se une a HER3 humana", "que se une específicamente a HER3 humana" o "anticuerpo anti-HER3" son intercambiables, y se refieren a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno HER3 humano con un valor KD de alrededor de $4,81 \times 10^{-10}$ mol/l o menos a 25°C. La afinidad de unión se determina con un ensayo de unión estándar a 25°C, tal como la técnica de resonancia de plasmones superficiales (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Suecia). Por lo tanto, un "anticuerpo que se une a HER3 humana", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo o porción del mismo que se une específicamente al antígeno HER3 humano con una afinidad de unión dentro de un intervalo de KD $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l - $1,0 \times 10^{-13}$ mol/l) a 25°C, y preferiblemente con un valor KD de $4,81 \times 10^{-10}$ mol/l o menos a 25°C.

20 En otro aspecto, un anticuerpo anti-HER3 comprendido por la proteína de fusión recombinante descrita aquí comprende una cadena pesada de región variable (VH) y una cadena ligera (VL) de región variable. En un caso, el anticuerpo comprende las secuencias VH y VL en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente; y tiene una o más de las siguientes propiedades: inhibición de la fosforilación de HER3 en células tumorales, inhibición de la fosforilación de AKT en células tumorales, inhibición de la señalización a través de ErbB3 (HER3), e inhibición de la proliferación de células tumorales.

25 En un caso, el mAb anti-HER3 proporcionado aquí comprende una secuencia de aminoácidos de VH expuesta en SEQ ID NO: 2:

Cadena pesada:

30 QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQP PGKGLEWIGE
 INHSGSTNYN PSLKSRVTIS VETSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDKW
 TWYFDLWGRG TLYTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF
 PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVVTVPS SSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKTHTCP PCP APEFLGGPAV FLFPPKPKDT
 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHAHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID
 NO: 2).

En un caso, el mAb anti-HER3 proporcionado aquí comprende una secuencia de aminoácidos de VL de SEQ ID NO: 3:

35 **Cadena ligera:**

DIEMTQSPDS LAVSLGERAT INCRSSQSVL YSSSNRNYLA WYQQNPGQPP
 KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCQQYYST
 PRFTGQGTKV EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3).

40 En un caso, el anticuerpo anti-HER3 comprende al menos una mutación en la región Fc. En otro caso, el anticuerpo anti-HER3 maduro (es decir, que carece de un péptido señal) comprende al menos una mutación en los aminoácidos 234, 239, 434, o una combinación de los mismos, en el que en otros casos, las mutaciones de aminoácidos comprenden al menos una de las siguientes mutaciones de sustitución: L234F, S239A, N434A o una combinación de

las mismas. En otro caso, las mutaciones en los aminoácidos 234 y/o 239 anulan las funciones efectoras del anticuerpo anti-HER3. En otro caso, una mutación en el aminoácido 434 extiende la vida media del anticuerpo en un sujeto.

En algunos casos, una o más mutaciones en la región Fc reducen la función efectora. En algunos casos, la función efectora reducida comprende una afinidad reducida del anticuerpo anti-HER3 por uno o más receptores Fc. Los FcR pueden ser FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (158F), FcγRIIIa (158V) y C1q. En algunos casos, la afinidad reducida comprende un aumento en la constante de disociación de alrededor de 1 orden de magnitud o más. En algunos casos, la introducción de una o más mutaciones de Fc aumenta la KD del anticuerpo anti-HER3 de la proteína de fusión que lo comprende para FcγRI de $2,81 \times 10^{-9}$ M a $1,03 \times 10^{-8}$ M. En algunos casos, la introducción de una o más mutaciones de Fc aumentan la KD del anticuerpo anti-HER3 de la proteína de fusión que lo comprende para FcγRIIIa de $3,95 \times 10^{-7}$ M a $1,35 \times 10^{-6}$ M. En algunos casos, la introducción de una o más mutaciones de Fc aumenta la KD del anticuerpo anti-HER3 de la proteína de fusión que lo comprende para FcγRIIb de $1,03 \times 10^{-7}$ M a $1,52 \times 10^{-6}$ M. En algunos casos, la introducción de una o más mutaciones de Fc aumenta la KD del anticuerpo anti-HER3 de la proteína de fusión que lo comprende para FcγRIIIa (158F) de $6,37 \times 10^{-8}$ M a $1,18 \times 10^{-7}$ M. En algunos casos, la introducción de una o más mutaciones de Fc aumenta la KD del anticuerpo anti-HER3 de la proteína de fusión que lo comprende para FcγRIIIa (158V) de $3,41 \times 10^{-8}$ M a $9,10 \times 10^{-8}$ M.

En algunos casos, el anticuerpo anti-HER3 o la proteína de fusión recombinante que lo comprende se une a FcγRI con una constante de disociación en equilibrio (KD) mayor o igual a $1,03 \times 10^{-8}$ M. En algunos casos, el anticuerpo anti-HER3 o la proteína de fusión recombinante que lo comprende comprende una o más mutaciones de Fc y se une a FcγRIIIa con una KD mayor o igual a $1,35 \times 10^{-6}$ M. En algunos casos, el anticuerpo anti-HER3 o la proteína de fusión recombinante que lo comprende comprende una o más mutaciones de Fc y se une a FcγRIIb con una KD mayor o igual a $1,5 \times 10^{-6}$ M. En algunos casos, el anticuerpo anti-HER3 o la proteína de fusión recombinante que lo comprende comprende una o más mutaciones de Fc y se une a FcγRIIIa (158F) con una KD mayor o igual a $1,18 \times 10^{-7}$ M. En algunos casos, el anticuerpo anti-HER3 o la proteína de fusión recombinante que lo comprende comprende una o más mutaciones de Fc y se une a FcγRIIIa (158V) con una KD mayor o igual a $9,10 \times 10^{-8}$ M.

La expresión "función(es) efectora(s) de anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a una función aportada por una región o regiones Fc de una Ig. Tal función puede verse afectada, por ejemplo, por la unión de una región o regiones efectoras de Fc a un receptor Fc en una célula inmunitaria con actividad fagocítica o lítica, o por la unión de una región o regiones efectoras de Fc a componentes del sistema del complemento.

En un caso, el anticuerpo anti-HER3 no induce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana humanas por un anticuerpo en presencia de células efectoras.

En un caso, el anticuerpo está glicosilado. En algunos casos, la glicosilación es N-glicosilación. En otros casos, la glicosilación es O-glicosilación.

En el contexto de la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí y según la invención, los anticuerpos comprendidos por la proteína de fusión recombinante pueden producirse por medios recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, y comprenden la expresión de proteínas en células procariontas y eucariotas, con el aislamiento posterior del polipéptido del anticuerpo y normalmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas se insertan en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células hospedantes procariontas o eucariotas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras, o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o después de la lisis de las células). La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica, y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides, SC, *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al, *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880. Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se lleva a cabo para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, que incluyen cromatografía en columna y otras bien conocidas en la técnica (véase Ausubel, F., et al, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987)). La expresión en células NS0 se describe, por ejemplo, en Barnes, LM, et al, *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; Barnes, LM y otros, *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe, por ejemplo, por Durocher, Y., et al, *Nucl. Acids. Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe por Orlandi, R., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferido (HEK 293) lo describen Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., en *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83, y Schlaeger, E.-J., en *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199. Los anticuerpos monoclonales se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. El ADN y el ARN que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y secuencian fácilmente usando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de tal ADN y ARN. Una vez aislado, el ADN

puede insertarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células hospedantes, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospedantes.

5 Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera se combinan con secuencias promotoras, de inicio de la traducción, de región constante, de región 3' no traducida, de poliadenilación, y de terminación de la transcripción para formar constructos de vectores de expresión. Los constructos de expresión de cadenas pesadas y ligeras pueden combinarse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie, o transfectarse por separado en células hospedantes que después se fusionan para formar una única célula hospedante que expresa ambas cadenas.

10 Es evidente que los anticuerpos se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz, que es la cantidad del compuesto o combinación en cuestión que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que está buscando el investigador, veterinario, médico u otro clínico.

15 **Proteína de fusión recombinante - Neuregulina**

En un caso, la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí comprende un fragmento de una proteína NRG-1. Las proteínas NRG pueden unirse al receptor ErbB4 en la superficie de las células del miocardio, activar continuamente la ruta de señalización de PI3K/AKT en la célula, y cambiar la estructura de las células del miocardio, mejorando así la función de las células del miocardio.

20 Como se usa aquí, "neuregulina" o "NRG" se refiere a proteínas o péptidos que pueden unirse y activar ErbB3, ErbB4 o heterodímeros u homodímeros de los mismos, incluyendo isoformas de neuregulina, dominio similar a EGF de neuregulina, polipéptidos que comprenden dominio similar a EGF de neuregulina, mutantes o derivados de neuregulina, y cualquier tipo de productos genéticos similares a la neuregulina que puedan activar los receptores anteriores. La neuregulina también incluye proteínas NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4, péptidos, fragmentos y compuestos que tienen las funciones de la neuregulina. En casos preferidos, la neuregulina es una proteína o péptido que puede unirse y activar los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3, por ejemplo, pero sin fines de restricción, los péptidos incluyen un fragmento de la isoforma NRG-1 β 2, es decir, el fragmento de 177-237 aminoácidos, que contiene el dominio similar a EGF que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: SHI, VKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKPNEFTGDRQCQNYVMASFYK AEELYQ (SEQ ID NO: 4). Las proteínas NRG descritas aquí pueden activar los receptores anteriores y regular sus funciones biológicas, por ejemplo estimular la síntesis de receptores de acetilcolina en células del músculo esquelético, promover la diferenciación y supervivencia de cardiomiocitos y la síntesis de ADN. Es bien conocido por los expertos en esta técnica que una mutación de un único aminoácido en una región no crítica generalmente no alteraría la actividad biológica de la proteína o polipéptido resultante (véase, por ejemplo, Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 4^a, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub.co., p. 224). Las proteínas NRG se pueden aislar de fuentes naturales, o se pueden modificar mediante tecnología de recombinación, síntesis artificial u otros medios.

35 Como se usa aquí, "dominio similar al factor de crecimiento epidérmico" o "dominio similar a EGF" se refiere a un fragmento polipeptídico codificado por el gen de la neuregulina que se une y activa ErbB3, ErbB4, o heterodímeros u homodímeros de los mismos, y que incluyen heterodímeros con ErbB2, y estructuralmente similar a la región de unión al receptor de EGF como se describe en el documento WO 00/64400, Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); patentes de EE. UU. núms. 5.530.109 y 5.716.930; Hijazi et al., Int. J. Oncol., 13:1061-1067 (1998); Chang et al., Nature, 387:509-512 (1997); Carraway et al., Nature, 387:512-516 (1997); Higashiyama et al., J. Biochem., 122:675-680 (1997); y documento WO 97/09425. En ciertos casos, el dominio similar a EGF se une y activa los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3. En ciertos casos, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-1. En algunos casos, el dominio similar a EGF se refiere a los restos de aminoácidos 177-226, 177-237, o 177-240 de NRG-1. En ciertos casos, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de neuregulina-2 (NRG-2, también conocido en la técnica como DON1, HRG2 y NTAK). En ciertos casos, un dominio similar a EGF de NRG-2 comprende una secuencia de HARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCL (SEQ ID NO: 15). En ciertos casos, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de neuregulina 3 (NRG-3, también conocido en la técnica como HRG3 y pro-NRG3). En ciertos casos, el dominio similar a EGF de NRG-3 comprende una secuencia de HFKPCRDKDLAYCLNDGECFVIETLTGSHKHCRCKEGYQGVRC (SEQ ID NO: 16). En ciertos casos, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de neuregulina 4 (NRG-4, también conocido en la técnica como HER4). En ciertos casos, un dominio similar a EGF de NRG-4 comprende una secuencia de HEEPCGSPSHKSFCLNGGLCYVIPTIPSPFCRCVENYTGARCE (SEQ ID NO: 17). En ciertos casos, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos de Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro (SEQ ID NO: 18), como se describe en la patente de EE. UU. núm. 5.834.229.

60 En un caso, la proteína NRG-1 proporcionada en la proteína de fusión recombinante descrita aquí es la isoforma NRG-1 β 2a.

65

En algunos casos, el fragmento NRG-1 activo comprende el dominio de unión ERBB3/4. En otro caso relacionado, la NRG-1 se une e induce la señalización a través de ErbB4 (HER4). En otros casos, el mAb inhibe la señalización de NRG-1 a través de ErbB3 (HER3). En algunos casos, el fragmento proteico activo de NRG-1 comprende el dominio activo de NRG-1.

5

Proteína de fusión recombinante - Composiciones

En un caso, en la proteína de fusión recombinante descrita aquí, la NRG-1 se fusiona con el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 usando un conector. En otro aspecto relacionado, NRG-1 se une al conector a través del primer (1^{er}) aminoácido en el extremo N de NRG-1, que en un caso es un aminoácido de serina (S o Ser). La proteína de fusión recombinante específica descrita aquí puede obtenerse o crearse opcionalmente mediante cualquier método conocido en la técnica (incluida la adquisición a partir de fuentes comerciales). Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican la región estructural del anticuerpo apropiada se clonan opcionalmente y se ligan en vectores apropiados (por ejemplo, vectores de expresión para, por ejemplo, organismos procariontes o eucariotas). Además, las secuencias de ácido nucleico que codifican la molécula de la isoforma NRG-1 β 2a se clonan opcionalmente en el mismo vector en la orientación y ubicación apropiadas de modo que la expresión a partir del vector produzca una proteína de fusión anticuerpo-isoforma NRG-1 β 2a. Algunos casos opcionales también requieren modificación posterior a la expresión, por ejemplo ensamblaje de subunidades de anticuerpos, etc. Las técnicas y la técnica para las manipulaciones anteriores (y similares) son bien conocidas por los expertos en la técnica. Las instrucciones pertinentes se encuentran, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2^a ed.), vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 y *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, una sociedad entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (completada a lo largo de 1999). En algunos casos alternativos, el dominio de anticuerpo y la isoforma β 2a de NRG-1 se ensamblan después de la expresión, por ejemplo por medios químicos. En un caso, la descripción proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión recombinante descrita aquí.

En un caso, la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de cardiomiocitos. En otro caso, la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de tejido cardíaco. En un caso, la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de cardiomiocitos sin promover el cáncer y/o el crecimiento tumoral. En otro caso, la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de tejido cardíaco sin promover el cáncer o el crecimiento tumoral.

En un caso, el cáncer es carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer anorrectal, cáncer del canal anal, cáncer de apéndice, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, carcinoma de células basales, cáncer de piel (no melanoma), cáncer biliar, cáncer de vías biliares extrahepáticas, cáncer de vías biliares intrahepáticas, cáncer de vejiga, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de huesos y articulaciones, osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, cáncer de cerebro, tumor cerebral, glioma de tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, ependimoma, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de vías ópticas e hipotalámico, cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, tumor carcinoide, gastrointestinal, cáncer del sistema nervioso, linfoma del sistema nervioso, cáncer del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cánceres infantiles, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, linfoma cutáneo de células T, neoplasia linfoide, micosis fungoide, síndrome de Sezary, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, cáncer de las vías biliares extrahepáticas, cáncer ocular, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, tumor de células germinales de ovario, glioma tumoral trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, cáncer ocular, tumores de células de los islotes (páncreas endocrino), sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y de cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón microcítico, linfoma relacionado con el SIDA, linfoma de Hodgkin, linfoma primario del sistema nervioso central, macroglobulinemia de Waldenstroem, meduloblastoma, melanoma, melanoma intraocular (ojo), carcinoma de células de Merkel, mesotelioma maligno, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, cáncer de la lengua, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, micosis fungoide, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielógena crónica, leucemia mielóide aguda, mieloma múltiple, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer de cavidad oral, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario, cáncer epitelial de ovario, tumor de ovario poco maligno potencial, cáncer de páncreas, cáncer de páncreas de células de los islotes, cáncer de senos paranasales y de cavidad nasal, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, próstata cáncer, cáncer rectal, pelvis renal y uréter, cáncer de células de transición, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, tumores de la familia de sarcoma de Ewing, sarcoma de Kaposi,

65

sarcoma de tejidos blandos, sarcoma epitelioide, sarcoma sinovial, cáncer uterino, sarcoma uterino, cáncer de piel (no melanoma), cáncer de piel (melanoma), carcinoma de piel de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter y otros órganos urinarios, tumor trofoblástico gestacional, cáncer uretral, cáncer uterino endometrial, sarcoma uterino, cáncer de cuerpo uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar, o tumor de Wilm.

En otro caso, la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células del sistema nervioso central (SNC). En otro caso, la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de células del sistema nervioso central (SNC) sin promover el cáncer y/o el crecimiento tumoral. En otro caso, la proteína de fusión recombinante tiene una capacidad reducida para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

En algunos casos, la proteína de fusión recombinante promueve la señalización de HER2/4 sobre la señalización de HER2/3 con respecto al potencial de inducción de señales de NRG-1 recombinante.

En un caso particular, la proteína de fusión recombinante comprende un mAb anti-HER3 fusionado o conectado operativamente al extremo C de la cadena pesada del anticuerpo mediante un conector GGGGSGGGGS (G4S) (SEQ ID NO: 5) a la isoforma NRG-1 β 2a de SEQ ID NO: 4. En algunos casos, se pueden usar una o más copias del conector. En otros casos, se pueden usar aquí 2, 3, 4 o 5 copias del conector G4S o cualquier otro conector conocido en la técnica como adecuado para la composición descrita aquí.

El término "conector" es reconocido en la técnica, y se refiere a una molécula (que incluye, pero no se limita a, ácidos nucleicos o aminoácidos modificados o no modificados) o grupo de moléculas (por ejemplo, 2 o más, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más) que conectan dos compuestos, tal como dos polipéptidos. El conector puede estar compuesto por una única molécula conectora, o puede comprender una molécula conectora y al menos una molécula espaciadora, destinada a separar la molécula conectora y un compuesto mediante una distancia específica.

Una secuencia de ácido nucleico está "conectada operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una presecuencia de ácido nucleico o líder secretor está conectado operativamente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está conectado operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está conectado operativamente a una secuencia codificante si está colocado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "conectadas operativamente" significa que las secuencias de ácido nucleico que se conectan son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores son opcionalmente contiguos. La conexión se puede lograr, por ejemplo, mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, se pueden usar adaptadores oligonucleotídicos sintéticos, conectores u otros métodos conocidos en la técnica. En otro caso, "conectado operativamente" también se refiere al emparejamiento funcional de distintas secuencias de aminoácidos, péptidos o proteínas, como en el emparejamiento del anticuerpo y el fragmento de NRG-1 descrito aquí mediante una secuencia conectora también descrita aquí.

En otro caso, la cadena pesada del mAb anti-HER3 comprendida por la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí está codificada por SEQ ID NO: 6:

```

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATAATAAAAGGTGTCCAGT
GTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCC
50 TGTCTCTGACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTATTGGTCTTG
GATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACTC
TGGCTCCACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGTCCCGGGTGACCATCTCCGTGGAG
ACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCCGCTGACACA
GCCGTGTAATGCGCTAGGGACAAGTGGACCTGGTATTTGATCTGTGGGGAA
55 GGGGCACCCTGGTGACAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCTCCGTGTTTTCC
TCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTG
GTGAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTACCCTGAGCTGGAAGTCTGGCGCCCTGA
CCTCCGGAGTGATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGCGCCCTGTATAGCCT
GTCTTCCGTGGTGACCGTGCTAGCTCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGC
60 AACGTGAATCACAAAGCCCTCAATACAAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCTAAG
AGCTGTGATAAGACCCATACATGCCACCATGTCCAGCTCCTGAGCTGCTGGGAG
GACCTTCCGTGTTCCCTGTTTCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCTCG
CACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCAGAGGT
GAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCC
65 TAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCT
GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGG
    
```

CCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAG
 AGCCTCAGGTGTATACTGCCCCCTAGCCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
 TGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCATCTGACATCGCTGTGGAGTG
 GGAGTCCAATGGCCAGCCCAGACAATTATAAGACCACACCACCCGCTGCTGGA
 5 CTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGACTCCAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGCAACGTGTTTTCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATT
 ATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAGGCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGA
 GGAGGAGGCAGCTCTCATCTGGTGAAGTGTGCTGAGAAGGAGAAGACCTTCTGC
 10 GTGAACGGCGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCTAATCCATCCAGATACC
 TGTGCAAGTGCCCAACGAGTTCACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGC
 CTCTTTTTATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 6). En un caso, la secuencia expuesta en SEQ ID
 NO: 6 no comprende mutaciones de Fc. En un caso, SEQ ID NO: 6 también se denomina "NPCF".

En un caso, la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí comprende una cadena pesada de un mAb anti-
 15 HER3. En otro caso, la cadena pesada de mAb anti-HER3 está codificada por SEQ ID NO: 7:

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATAATAAAAGGTGTCCAGT
 GTCAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGAGCTGGACTGCTGAAGCCAAGCGAGACCC
 TGTCTCTGACATGCGCCGTGTACGGAGGATCCTTCAGCGGATACTATTGGTCTTG
 20 GATCAGGCGACCCACCTGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACTC
 TGGCTCCACCAACTACAATCCCTCTCTGAAGTCCCAGGATGACCATCTCCGTGGAG
 ACAAGCAAGAATCAGTTTTCCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACCGCCGCTGACACA
 GCCGTGACTATTGCGCTAGGGACAAGTGGACCTGGTATTTGATCTGTGGGGAA
 GGGGCACCCTGGTGCAGTGTCTTCCGCCTCTACAAAGGGCCCCTCCGTGTTTCC
 25 TCTGGCTCCAAGCTCTAAGAGCACCTCTGGAGGAACAGCCGCTCTGGGATGTCTG
 GTGAAGGATTACTTCCCTGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAAGTCTGGCGCCCTGA
 CCTCTGGAGTGCATACATTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTATAGCCT
 GTCTTCCGTGGTGACCGTGCCTAGCTTCCCTGGGCACCCAGACATACATCTGC
 AACGTGAATCACAAGCCCTCCAATACAAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCTAAG
 30 AGCTGTGATAAGACCCATACATGCCACCATGTCCAGCTCCTGAGTTCCTGGGAG
 GACCTGCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCTCTCG
 CACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGCCACGAGGATCCAGAGGT
 GAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCC
 TAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGT
 35 GCACCCAGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGG
 CCCTGCCAGCTCCCATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAG
 AGCCTCAGGTGTATACTGCCCCCTAGCCGCGAGGAGATGACCAAGAACCAGG
 TGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCATCTGACATCGCTGTGGAGTG
 GGAGTCCAATGGCCAGCCCAGACAATTATAAGACCACACCACCCGCTGCTGGA
 40 CTCCGATGGCAGCTTCTTTCTGACTCCAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGCAACGTGTTTTCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACGCTCATT
 ATACACAGAAATCTCTGTCCCTGAGCCCAGGCAAGGGAGGAGGAGGAAGCGGA
 GGAGGAGGCAGCTCATCTGTTGAGTGTGCTGAGAGAAGGAGAAGACCTTCTGC
 GTGAACGGCGCGAGTGTTTTATGGTGAAGGACCTGTCTAATCCATCCAGATACC
 45 TGTGCAAGTGCCCAACGAGTTCACAGGCGATCGCTGCCAGAATTACGTGATGGC
 CTCTTTTTATAAGGCTGAGGAGCTGTACCAGTAA (SEQ ID NO: 7). En un caso, SEQ ID NO: 7 también se denomina
 "NPCFA". En un caso, SEQ ID NO: 7 comprende una o más mutaciones que codifican una o más mutaciones en la
 región constante (Fc) del mAb anti-HER3 proporcionado aquí. En un caso, el anticuerpo anti-HER3 maduro comprende
 al menos una mutación en los aminoácidos 234, 239, 434, o una combinación de los mismos. En otro caso, las
 50 mutaciones de aminoácidos comprenden al menos una de las siguientes mutaciones de sustitución: L234F, S239A,
 N434A o una combinación de las mismas.

En un caso, la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí comprende una secuencia de cadena ligera de un
 55 mAb anti-HER3. En otro caso, la secuencia de cadena ligera está codificada por (SEQ ID NO: 8):

ATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTA
 CGGGGACATCGAGATGACCCAGTCTCCAGATTCCCTGGCCGTGAGCCTGGGAGA
 GAGGGCTACAATCAACTGCCGGTCCAGCCAGTCTGTGCTGACTCTTCCAGCAAC
 60 AGGAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAATCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGA
 TCTATTGGGCTAGCACCAGAGAGTCTGGAGTGCCTGACCGCTTCTCTGGATCCGG
 AAGCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCTTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCC
 GTGACTATTGCCAGCAGTACTCTACCCCTAGGACATTCCGGCCAGGGCACCA
 AGGTGGAGATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCATCCGTGTTTCATCTTTCCACCCTC
 CGACGAGCAGCTGAAGTCCGGAACCCGCTAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATT
 65 CTACCCAAGAGAGGCCAAGGTGCAAGTGGAGGATAACGCTCTGCAGAGCGG
 CAATTCTCAGGAGTCCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGATTCTACATATTCCTG

AGCTCTACCCTGACACTGTCCAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTT
GCGAGGTGACCCATCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACAAAGAGCTTCAACCGCG GCGAGTGTTAA (SEQ ID NO:
8). En un caso, SEQ ID NO: 8 también se denomina "PAL".

- 5 En un caso, la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 comprendida por la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGGS
FSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSTV
AADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVK
10 DLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 9).

En un caso, la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 comprendida por la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MEFGLSWVFLVAIIKGVQCQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGGSFSGYYWSWI
RQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQFSLKLSSTVTAADTAVYYC
ARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKC
KVSNAKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHAH
YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLC
15 KCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 10).

En un caso, la secuencia de cadena pesada del mAb anti-HER3 comprende una secuencia de péptido señal. En otro caso, la secuencia de péptido señal de la cadena pesada del mAb anti-HER3 comprende la secuencia de aminoácidos de MEFGLSWVFLVAIIKGVQC (SEQ ID NO: 11).

- 20 En un caso, la cadena ligera del anticuerpo anti-HER3 comprendida por la proteína de fusión recombinante comprende la siguiente secuencia de aminoácidos:

MVLQTVFISLLLWISGAYGDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSV
LYSSNRNYLAWYQQNPGQPPLLIIWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE
DVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF
YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12).

- 25 En un caso, la secuencia de cadena ligera del mAb anti-HER3 comprende una secuencia de péptido señal. En otro caso, la secuencia de péptido señal de cadena ligera del mAb anti-HER3 comprende la secuencia de aminoácidos de

MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO: 13). En un caso, un polipéptido maduro, tal como una secuencia de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera de anticuerpo descrita aquí, carece de un péptido señal.

En un caso, la proteína de fusión recombinante comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

5 **Cadena pesada**

QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAYVGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE
 WIGELNHSNSTNYPNPSLRSRVTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWY
 10 FDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
 SCDKTHTCPPCPAPEFLGGPAVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 15 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALTHAHYTQKLSLS
 PGKGGGGAGGGSSHLVKAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFT
GDRCQNYMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 14, en la que las cursivas en negrita indican el conector, y la negrita indica el fragmento de NRG-1); y

20 **Cadena ligera**

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPCKLLIYWA
 STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGGQIKVEIKRT
 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
 3).

25 En un caso, cada una de la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera en la proteína de fusión recombinante madura carece de una secuencia de aminoácidos de péptido señal.

30 En un caso particular, la cadena pesada del anticuerpo anti-HER3 proporcionado aquí se fusiona mediante la secuencia conectora del extremo C a la isoforma NRG-1 β2a proporcionada aquí. En otro caso, el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo comprende el dominio Fc del anticuerpo.

35 En algunos casos, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión recombinante descrita aquí formulada junto con un vehículo farmacéutico.

40 En algunos casos, el anticuerpo anti-HER3 y el fragmento de NRG-1 descritos aquí se fusionan/conectan operativamente de forma recombinante o química a través de un conector para formar una proteína de fusión. Una "proteína de fusión", "polipéptido de fusión", "proteína de fusión recombinante" o "polipéptido recombinante" se refiere a un polipéptido híbrido que comprende porciones polipeptídicas de al menos dos polipéptidos diferentes. Una "proteína de fusión", como se define aquí, es una fusión de una primera secuencia de aminoácidos (proteína) que comprende, por ejemplo, una isoforma NRG-1 β2a, unida mediante un conector al extremo C de una segunda secuencia de aminoácidos que comprende una cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a ERBB3 (HER3).

45 En un caso, la proteína de fusión se codifica y se produce de forma recombinante. En algunos casos, la proteína de fusión recombinante es codificada por una secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la descripción, que está conectada operativamente, mediante una secuencia de ácido nucleico que codifica un conector, a una secuencia de ácido nucleico que codifica una isoforma NRG-1 β2a.

50 En un caso, la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión recombinante es homóloga a la SEQ ID NO: 14 fusionada con SEQ ID NO: 3. El término "homología" puede referirse a la identidad con la secuencia de la proteína de fusión recombinante (por ejemplo, con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18) superior al 70 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 72 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 75 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 78 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 80 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 82 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 83 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 85 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 87 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 88 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 90 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 90 %.

se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 92 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 93 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 95 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 96 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 97 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 98 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 superior al 99 %. En otro caso, "homología" se refiere a la identidad con cualquiera de SEQ ID NO: 1-18 de 100 %.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Tal algoritmo se incorpora a los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a un ácido nucleico que codifica una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. Para obtener alineamientos con espacios con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST, como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Tal algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que forma parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12, y una penalización de espacio de 4. Se conocen en la técnica algoritmos adicionales para el análisis de secuencias, e incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5; y FASTA, descrito en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup=2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se comparan observando pares de restos alineados; si ktup=1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup se puede configurar en 2 o 1 para secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor predeterminado si no se especifica ktup es 2 para proteínas y 6 para ADN. Alternativamente, el alineamiento de la secuencia de proteínas se puede llevar a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, como lo describen Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

En algunos casos, los polinucleótidos de la descripción se preparan usando técnicas de PCR usando procedimientos y métodos conocidos por un experto en la técnica. En algunos casos, el procedimiento implica la ligación de dos secuencias de ADN diferentes (véase, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

En un caso, los polinucleótidos de la descripción se insertan en vectores de expresión (es decir, un constructo de ácido nucleico) para permitir la expresión del polipéptido recombinante. En un caso, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en procariontes. En un caso, el vector de expresión incluye secuencias adicionales que hacen que este vector sea adecuado para la replicación e integración en eucariotas. En un caso, el vector de expresión incluye un vector lanzadera que hace que este vector sea adecuado para la replicación e integración tanto en procariontes como en eucariotas. En algunos casos, los vectores de clonación comprenden secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación).

En un caso, se puede usar una variedad de células procariontes o eucariotas como sistemas de expresión hospedantes para expresar los polipéptidos de la descripción. En algunos casos, estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos, tales como bacterias transformadas con un vector de expresión recombinante de ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cósmido, que contiene la secuencia codificante del polipéptido; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante del polipéptido.

En algunos casos, se usan sistemas de expresión no bacterianos (por ejemplo, sistemas de expresión de mamíferos, tales como células CHO) para expresar el polipéptido de la descripción. En un caso, el vector de expresión usado para expresar los polinucleótidos en células de mamífero es el vector pCI-DHFR, que comprende un promotor de CMV y un gen de resistencia a neomicina.

En algunos casos, en los sistemas bacterianos descritos aquí, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso previsto para el polipéptido expresado. En un caso, se desean grandes cantidades de polipéptido. En un caso, se desean vectores que dirigen la expresión de niveles elevados del producto proteico, posiblemente como una fusión con una secuencia señal hidrófoba, que dirige el producto expresado al periplasma de las bacterias o al medio de cultivo en el que el producto proteico se purifica fácilmente. En un caso, cierta proteína de

fusión se diseña con un sitio de escisión específico para ayudar en la recuperación del polipéptido. En un caso, los vectores adaptables a tal manipulación incluyen, pero no se limitan a, la serie pET de vectores de expresión de *E. coli* [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].

5 En un caso, se usan sistemas de expresión de levadura. En un caso, se pueden usar en levadura varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, como se describe en la patente de EE. UU. núm. 5.932.447. En otro caso, se usan vectores que promueven la integración de secuencias de ADN extrañas en el cromosoma de levadura.

10 En un caso, los vectores de expresión descritos aquí pueden incluir además secuencias polinucleotídicas adicionales que permiten, por ejemplo, la traducción de varias proteínas a partir de un único ARNm, tal como un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), y secuencias para la integración genómica del promotor-polipéptido quimérico.

15 En algunos casos, los vectores de expresión incluyen elementos que aumentan la expresión de las proteínas de fusión recombinantes de la descripción. Tales características incluyen, pero no se limitan a, la elección del promotor y la poliadenilación. En algunos casos, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH). En algunos casos, el promotor comprende un promotor constitutivamente activo. En algunos casos, el promotor comprende un promotor de citomegalovirus (pCMV).

20 En algunos casos, los vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI, que está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV, que están disponibles en Strategene, pTRES, que está disponible en Clontech, y sus derivados.

25 En algunos casos, se usan vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas, tales como retrovirus. Los vectores SV40 incluyen pSVT7 y pMT2. En algunos casos, los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein Barr incluyen pHEBO y p205. Otros vectores ejemplares incluyen pMSG, pAV009/A+, pMTO10/A+, pMAMneo-5, pDSVE de baculovirus, y cualquier otro vector que permita la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV-40, el promotor tardío de SV-40, el promotor de metalotioneína, el promotor del virus del tumor mamario murino, el promotor del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la poliedrina, u otros promotores que han demostrado ser eficaces para la expresión en células eucariotas.

35 En algunos casos, los vectores virales recombinantes son útiles para la expresión *in vivo* de los polipéptidos descritos, ya que ofrecen ventajas tales como infección lateral y especificidad de direccionamiento. En un caso, la infección lateral es inherente al ciclo de vida de, por ejemplo, los retrovirus, y es el proceso mediante el cual una única célula infectada produce muchos viriones descendientes que brotan e infectan las células vecinas. En un caso, el resultado es que una gran zona se infecta rápidamente, la mayor parte de la cual no estaba inicialmente infectada por las partículas virales originales. En un caso, se producen vectores virales que no pueden propagarse lateralmente. En un caso, esta característica puede ser útil si el fin deseado es introducir un gen específico sólo en un número localizado de células diana.

40 En un caso, se pueden usar diversos métodos para introducir en las células el vector de expresión que codifica la proteína de fusión recombinante de la descripción. Tales métodos se describen generalmente en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, Nueva York (1989, 1992), en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) y Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986], e incluyen, por ejemplo, transfección estable o transitoria, lipofección, electroporación e infección con vectores virales recombinantes. Además, véanse las patentes de EE. UU. núms. 5.464.764 y 5.487.992 para métodos de selección positiva-negativa.

55 En algunos casos, la introducción de ácido nucleico mediante infección viral ofrece varias ventajas sobre otros métodos tales como la lipofección y la electroporación, ya que se puede obtener una mayor eficiencia de transfección debido a la naturaleza infecciosa de los virus.

60 En un caso, se apreciará que los polipéptidos descritos también pueden expresarse a partir de un constructo de ácido nucleico administrado al individuo empleando cualquier modo de administración adecuado, descrito anteriormente aquí (es decir, terapia génica *in vivo*). En un caso, el constructo de ácido nucleico se introduce en una célula adecuada mediante un vehículo/método de administración de genes apropiado (transfección, transducción, recombinación homóloga, etc.) y un sistema de expresión según sea necesario, y después las células modificadas se expanden en cultivo y se devuelven al individuo (es decir, terapia génica *ex vivo*).

65 Se apreciará que además de contener los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada (que codifica el polipéptido), el constructo de expresión también puede incluir secuencias diseñadas para optimizar la estabilidad, producción, purificación, rendimiento o actividad del polipéptido expresado.

En algunos casos, las células transformadas se cultivan en condiciones eficaces, que permiten la expresión de grandes cantidades de proteína o polipéptido de fusión recombinante. En algunos casos, las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero no se limitan a, medios eficaces, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno que permitan la producción de proteínas. En un caso, un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir el polipéptido recombinante de la descripción. En algunos casos, un medio incluye típicamente una disolución acuosa que tiene fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. En algunos casos, las células se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces agitados, tubos de ensayo, placas de microtitulación, y placas de Petri. En algunos casos, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de oxígeno apropiados para una célula recombinante. En algunos casos, las condiciones de cultivo están dentro de la experiencia de un experto normal en la técnica.

En algunos casos, dependiendo del vector y sistema hospedante usados para la producción, los polipéptidos resultantes permanecen dentro de la célula recombinante, se segregan en el medio de fermentación, se segregan en un espacio entre dos membranas celulares, tal como el espacio periplásmico en *E. coli*; o se retienen en la superficie exterior de una célula o membrana viral.

En un caso, después de un tiempo predeterminado en cultivo, se efectúa la recuperación del polipéptido recombinante.

En un caso, la frase "recuperar el polipéptido recombinante", usada aquí, se refiere a recoger todo el medio de fermentación que contiene el polipéptido y no necesita implicar etapas adicionales de separación o purificación.

En un caso, los polipéptidos de la descripción se purifican usando una variedad de técnicas de purificación de proteínas estándar, tales como, pero sin limitarse a, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración, electroforesis, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía con concanavalina A, cromatografía de exclusión, y solubilización diferencial.

En un caso, para facilitar la recuperación, la secuencia codificante expresada puede manipularse para codificar el polipéptido de la descripción y el resto escindible fusionado. En un caso, una proteína de fusión se puede diseñar de manera que el polipéptido pueda aislarse fácilmente mediante cromatografía de afinidad; por ejemplo, mediante inmovilización en una columna específica para el resto escindible. En un caso, se diseña un sitio de escisión entre el polipéptido y el resto escindible, y el polipéptido puede liberarse de la columna cromatográfica mediante tratamiento con una enzima o agente apropiado que escinde específicamente la proteína de fusión en este sitio [por ejemplo, véase Booth et al., *Immunol. Lett.* 19:65-70 (1988); y Gardella et al., *J. Biol. Chem.* 265: 15854-15859 (1990)].

En un caso, el polipéptido descrito se recupera en forma "sustancialmente pura".

En un caso, la frase "sustancialmente pura" se refiere a una pureza que permite el uso eficaz de la proteína en las aplicaciones descritas aquí.

En un caso, el polipéptido también se puede sintetizar usando sistemas de expresión *in vitro*. En un caso, los métodos de síntesis *in vitro* son bien conocidos en la técnica, y los componentes del sistema están disponibles comercialmente.

En algunos casos, los polipéptidos recombinantes se sintetizan y purifican; su eficacia terapéutica puede ensayarse *in vivo* o *in vitro*.

En un caso, la composición farmacéutica proporcionada aquí que comprende la proteína de fusión recombinante de la descripción se formula además con un vehículo farmacéutico. Como se usa aquí, "vehículo farmacéutico" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

Métodos terapéuticos

En un caso, se describe un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión recombinante descrita aquí.

En un caso, se describe un método para tratar una enfermedad o afección cardiovascular en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión recombinante o una composición farmacéutica que comprende la misma.

En un caso, se describe un método para prevenir, inhibir, suprimir o retrasar la aparición de una enfermedad o afección cardiovascular en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica descrita aquí.

5 En algunos casos, la enfermedad cardiovascular comprende insuficiencia cardíaca crónica/insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), insuficiencia cardíaca aguda/infarto de miocardio (IM), disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, lesión por reperfusión asociada con IM, cardiotoxicidad inducida por quimioterapia (de adulto o pediátrica), cardiotoxicidad inducida por radiación, complementaria a intervención quirúrgica en cardiopatías congénitas pediátricas.

10 En algunos casos, la cardiotoxicidad inducida por quimioterapia resulta de un sujeto que recibe antraciclinas, agentes alquilantes, agentes antimicrotúbulos, y agentes antimetabolitos usados como quimioterapia.

15 En algunos casos, la afección cardiovascular es cardiotoxicidad como resultado de que un sujeto reciba una terapia contra el cáncer. En otros casos, la terapia contra el cáncer es una terapia dirigida contra HER-2. En otros casos, la terapia dirigida contra HER-2 comprende el uso de trastuzumab, ado-trastuzumab, emtansina, lapatinib, neratinib, y pertuzumab, cualquier anticuerpo anti-HER2, cualquier agente anti-HER2, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para inducir la remodelación de estructuras sarcoméricas y de citoesqueleto de células musculares, o adhesiones célula-célula, comprendiendo el método tratar las células con la proteína de fusión recombinante descrita aquí.

20 En un caso, el método terapéutico se refiere a tratar la insuficiencia cardíaca resultante de la disociación de la adhesión entre células del músculo cardíaco y/o el desorden de las estructuras sarcoméricas en el mamífero.

25 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para prevenir, tratar o retrasar en un ser humano la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección conservada, comprendiendo el método administrar una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión recombinante descrita aquí.

30 Como se usa aquí, la expresión "fracción de eyección" se refiere a la fracción de eyección (EF), una medida, normalmente expresada como porcentaje, de cuánta sangre bombea el ventrículo izquierdo con cada contracción. Por ejemplo, una fracción de eyección del 50 por ciento significa que, con cada latido del corazón, sale el 50 por ciento de la cantidad total de sangre en el ventrículo izquierdo.

La descripción se refiere al tratamiento de sujetos con o en riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas y afecciones relacionadas, por ejemplo insuficiencia cardíaca.

35 Por la expresión "insuficiencia cardíaca" se entiende una anomalía de la función cardíaca en la que el corazón no bombea sangre a la velocidad necesaria para satisfacer las necesidades de los tejidos metabolizantes. La insuficiencia cardíaca incluye un amplio intervalo de estados patológicos, tales como insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmia, miocardiopatía hipertrófica familiar, cardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, y miocarditis. La insuficiencia cardíaca puede ser causada por diversos factores, incluidas las formas isquémica, congénita, reumática, o idiopática. La hipertrofia cardíaca crónica es un estado mórbido significativo que es precursor de insuficiencia cardíaca congestiva y paro cardíaco.

45 En un caso, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la hipertrofia cardíaca. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos propensos a padecerlo o aquellos en quienes se debe prevenir el trastorno. La hipertrofia cardíaca puede deberse a cualquier causa que responda al ácido retinoico, incluidas causas congénitas, virales, idiopáticas, cardiotróficas, o miotróficas, o como resultado de isquemia o agresiones isquémicas tales como infarto de miocardio. Normalmente, el tratamiento se realiza para detener o retardar la progresión de la hipertrofia, especialmente después de que se ha producido un daño cardíaco, tal como por ejemplo por isquemia. Preferiblemente, para el tratamiento de infartos de miocardio, la composición farmacéutica proporcionada aquí se administra inmediatamente después del infarto de miocardio, para prevenir o disminuir la hipertrofia.

55 En algunos casos, tratar a un sujeto con una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí puede dar como resultado un aumento en el tiempo medio de supervivencia de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe monoterapia con un fármaco que no es un compuesto de la descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, análogo o derivado del mismo. Preferiblemente, después del tratamiento con las estrategias, modalidades de tratamiento, métodos, combinaciones y composiciones proporcionados aquí, el tiempo medio de supervivencia aumenta en más de 30 días; más preferiblemente, en más de 60 días; más preferiblemente, en más de 90, 120 o 365 días; más preferiblemente, en más de 365 días. El aumento del tiempo medio de supervivencia de una población puede medirse por cualquier medio reproducible. Un aumento en el tiempo medio de supervivencia de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración media de supervivencia después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Un aumento en el tiempo medio de supervivencia de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población la duración media de supervivencia después de completar una primera ronda de tratamiento con la composición farmacéutica descrita aquí.

En algunos casos, tratar a un sujeto con una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión recombinante proporcionada aquí puede dar como resultado una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe portador solo. El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución de la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población no tratada. El tratamiento del cáncer puede dar como resultado una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados en comparación con una población que recibe monoterapia con un fármaco que no es un compuesto de la descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato, análogo o derivado del mismo. Preferiblemente, después del tratamiento con las estrategias, modalidades de tratamiento, métodos, combinaciones y composiciones proporcionados aquí, la tasa de mortalidad disminuye en más de 2 %; más preferiblemente, en más de 5 %; más preferiblemente, en más de 10 %; y lo más preferible, en más de 25 %. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población de sujetos tratados puede medirse por cualquier medio reproducible. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el número medio de muertes relacionadas con enfermedades por unidad de tiempo después del inicio del tratamiento con un compuesto activo. Una disminución en la tasa de mortalidad de una población también se puede medir, por ejemplo, calculando para una población el número medio de muertes relacionadas con enfermedades por unidad de tiempo después de completar una primera ronda de tratamiento con la composición farmacéutica descrita aquí.

En un caso, se describe un método para tratar una enfermedad o afección relacionada con el sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica descrita aquí.

En un caso, se describe un método para prevenir, inhibir, suprimir o retrasar la aparición de una enfermedad o afección relacionada con el SNC en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica descrita aquí.

En algunos casos, la enfermedad o afección relacionada con el SNC es esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, parálisis de Bell, epilepsia y convulsiones, síndrome de Guillain-Barré, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática, esclerosis múltiple, o una combinación.

Administración, Dosificación

Una composición de la invención o descripción se puede administrar por vía parenteral a un sujeto que lo necesite, o se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un compuesto mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones salinas y amortiguadoras acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

En casos típicos, las preparaciones para administración a sujetos incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Algunos casos incluyen disolventes no acuosos tales como propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo, aceites de oliva), ésteres orgánicos (por ejemplo, oleato de etilo), y otros disolventes conocidos por los expertos en la técnica. En ciertos casos se usan opcionalmente vehículos (o excipientes) fisiológicamente aceptables. Ejemplos de los mismos incluyen, por ejemplo, disolución salina, PBS, disolución de Ringer, disolución de Ringer lactada, etc. Además, opcionalmente se añaden conservantes y aditivos a las composiciones, para ayudar a garantizar la estabilidad y esterilidad. Por ejemplo, antibióticos y otros bactericidas, antioxidantes, agentes quelantes, y similares están todos opcionalmente presentes en diversos casos de las composiciones aquí.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente", como se usan aquí, significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la descripción, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la descripción, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

La proteína de fusión recombinante, o la composición farmacéutica que la comprende, se administra opcionalmente a sujetos que necesitan tratamiento (ya sea terapéutica o profilácticamente) en cualquier vehículo farmacéutico estéril

apropiado. Dicho vehículo farmacéutico actúa para mantener la solubilidad y la acción de la proteína de fusión. En algunos casos, puede ser deseable administrar componentes adicionales junto con la proteína de fusión. Por ejemplo, en algunos regímenes de tratamiento, agentes quimioterapéuticos, antibióticos, formulaciones adicionales que comprenden la proteína de fusión recombinante de la descripción y uno o más agentes estándar de cuidado, etc. se incluyen todos opcionalmente con las composiciones descritas aquí.

Como se usan aquí, las expresiones "tratamiento combinado", "terapia combinada" y "coterapia" se usan indistintamente, y generalmente se refieren a modalidades de tratamiento que presentan una proteína de fusión recombinante o una composición farmacéutica que la comprende como se proporciona aquí y un agente terapéutico adicional. Normalmente, las modalidades de tratamiento combinado son parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar un efecto beneficioso de la acción concurrente de la combinación de agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación puede incluir, pero no se limita a, coacción farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo durante un período de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas, dependiendo de la combinación seleccionada). En algunos casos, el tratamiento combinado comprende la administración de dos o más agentes terapéuticos de manera secuencial, en el que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede lograr, por ejemplo, administrando al sujeto una única forma de dosificación que tiene una relación fija de cada agente terapéutico, o en múltiples formas de dosificación separadas para los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede efectuar mediante cualquier vía apropiada que incluye, pero no se limita a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares, y absorción directa a través de tejidos de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Los agentes terapéuticos se pueden administrar según el mismo intervalo de administración o uno diferente. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse mediante inyección intravenosa, mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral, o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse mediante inyección intravenosa.

En algunos casos, la terapia combinada también abarca la administración de los agentes terapéuticos como se describió anteriormente en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos y terapias no farmacológicas (por ejemplo, cirugía o tratamiento de radiación). Cuando la terapia combinada comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico puede realizarse en cualquier momento adecuado siempre que se logre un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se logra cuando el tratamiento no farmacológico se elimina temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás por días o incluso semanas.

En algunos casos, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico (también denominado agente antineoplásico o agente antiproliferativo), por ejemplo un agente alquilante; un antibiótico; un antimetabolito; un agente desintoxicante; un interferón; un anticuerpo policlonal o monoclonal; un inhibidor de EGFR; un inhibidor de HER2; un inhibidor de histona desacetilasa; una hormona; un inhibidor mitótico; un inhibidor de MTOR; un inhibidor de múltiples cinasas; un inhibidor de serina/treonina cinasas; un inhibidor de tirosina cinasas; un inhibidor de VEGF/VEGFR; un taxano o derivado de taxano, un inhibidor de aromatasas, una antraciclina, un fármaco dirigido contra microtúbulos, un fármaco venenoso de topoisomerasas, un inhibidor de una diana molecular o enzima (por ejemplo, una cinasa o una proteína metiltransferasa), un fármaco análogo de citidina o cualquier producto quimioterapéutico, un inhibidor del punto de control inmunológico, un agente antineoplásico a base de platino, un inhibidor de CDK, un inhibidor de PARP, o cualquier agente antineoplásico o antiproliferativo conocido por los expertos en la técnica.

Los agentes alquilantes ejemplares adecuados para uso según las modalidades de tratamiento combinado proporcionadas aquí incluyen, pero no se limitan a, ciclofosfamida (Cytosan; Neosar); clorambucilo (Leukeran); melfalán (Akeran); carmustina (BiCNU); busulfán (Busulfex); lomustina (CeeNU); dacarbazina (DTIC-Dome); oxaliplatino (Eloxatin); carmustina (Gliadel); ifosfamida (Ifex); mecloretamina (Mustargen); busulfán (Myleran); carboplatino (Paraplatino); cisplatino (CDDP; Platino); temozolomida (Temodar); tiotepa (Tioptex); bendamustina (Treanda); o estreptozocina (Zanosar).

Las antraciclinas adecuadas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina (Adriamicina); doxorubicina liposomal (Doxil); mitoxantrona (Novantrona); bleomicina (Blenoxano); daunorrubicina (Cerubidina); daunorrubicina liposomal (DaunoXome); dactinomicina (Cosmegen); epirubicina (Ellence); idarrubicina (Idamicina); plicamicina (Mitracina); mitomicina (Mutamicina); pentostatina (Nipent); o valubicina (Valstar).

Los antimetabolitos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, fluorouracilo (Aduvici); capecitabina (Xeloda); hidroxiaurea (Hydrea); mercaptopurina (Purinethol); pemetrexed (Alimta); fludarabina (Fludara); nelarabina (Arranon); cladribina (Cladribine Novaplus); clofarabina (Clolar); citarabina (Cytosar-U); decitabina (Dacogen); citarabina liposomal (DepoCyt); hidroxiaurea (Droxia); pralatrexato (Foloty); floxuridina (FUDR); gemcitabina (Gemzar); cladribina

- (Leustatin); fludarabina (Oforta); metotrexato (MTX; Rheumatrex); metotrexato (Trexall); tioguanina (Tabloid); TS-1 o citarabina (Tarabine PFS).
- 5 Los agentes desintoxicantes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, amifostina (Ethyol) o mesna (Mesnex).
- Los interferones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, interferón alfa-2b (Intron A) o interferón alfa-2a (Roferon-A).
- 10 Los anticuerpos policlonales o monoclonales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, trastuzumab (Herceptin); ofatumumab (Arzerra); bevacizumab (Avastin); rituximab (Rituxan); cetuximab (Erbix); panitumumab (Vectibix); tositumomab/yodo-131 tositumomab (Bexxar); alemtuzumab (Campath); ibritumomab (Zevalin; In-111; Y-90 Zevalin); gemtuzumab (Mylotarg); eculizumab (Soliris) o denosumab.
- 15 Los inhibidores de EGFR ejemplares incluyen, pero no se limitan a, gefitinib (Iressa); lapatinib (Tykerb); cetuximab (Erbix); erlotinib (Tarceva); panitumumab (Vectibix); PKI-166; canertinib (CI-1033); matuzumab (EMD 72000) o EKB-569.
- Los inhibidores de HER2 ejemplares incluyen, pero no se limitan a, trastuzumab (Herceptin); lapatinib (Tykerb) o AC-480.
- 20 Los inhibidores de histona desacetilasa incluyen, pero no se limitan a, vorinostat (Zolinza).
- Las hormonas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, amoxifeno (Soltamox; Nolvadex); raloxifeno (Evista); megestrol (Megace); leuprolida (Lupron; Lupron Depot; Eligard; Viadur); fulvestrant (Faslodex); letrozol (Femara); 25 triptorelina (Trelstar LA; Trelstar Depot); exemestano (Aromasin); goserelina (Zoladex); bicalutamida (Casodex); anastrozol (Arimidex); fluoximesterona (Androxy; Halotestin); medroxiprogesterona (Provera; Depo-Provera); estramustina (Emcyt); flutamida (Eulexin); toremifeno (Fareston); degarelix (Firmagon); nilutamida (Nilandron); abarelix (Plenaxis); o testolactona (Teslac).
- 30 Los inhibidores mitóticos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel (Taxol; Onxol; Abraxane); docetaxel (Taxotere); vincristina (Oncovin; Vincasar PFS); vinblastina (Velban); etopósido (Toposar; Etopophos; VePesid); tenipósido (Vumon); ixabepilona (Ixempra); nocodazol; epotilona; vinorelbina (Navelbine); camptotecina (CPT); irinotecán (Camptosar); topotecán (Hycamtin); amsacrina o lamellarina D (LAM-D).
- 35 Los inhibidores de MTOR ejemplares incluyen, pero no se limitan a, everolimus (Afinitor) o temsirolimus (Torisel); rapamune, ridaforolimus; o AP23573.
- Los inhibidores de multikinásas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, sorafenib (Nexavar); sunitinib (Sutent); BIBW 40 2992; E7080; Zd6474; PKC-412; motesanib; o AP24534.
- Los inhibidores de serina/reonina cinasas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, ruboxistaurina; hidrocloreto de erilo/fasudilo; flavopiridol; seliciclib (CYC202; roscovitina); SNS-032 (BMS-387032); Pkc412; briostatina; KAI-9803; SF1126; VX-680; Azd1152; Ary-142886 (AZD-6244); SCIO-469; GW681323; CC-401; CEP-1347 o PD 332991.
- 45 Los inhibidores de tirosina cinasas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, erlotinib (Tarceva); gefitinib (Iressa); imatinib (Gleevec); sorafenib (Nexavar); sunitinib (Sutent); trastuzumab (Herceptin); bevacizumab (Avastin); rituximab (Rituxan); lapatinib (Tykerb); cetuximab (Erbix); panitumumab (Vectibix); everolimus (Afinitor); alemtuzumab (Campath); gemtuzumab (Mylotarg); temsirolimus (Torisel); pazopanib (Votrient); dasatinib (Sprycel); nilotinib (Tasigna); vatalanib (Ptk787; ZK222584); CEP-701; SU5614; MLN518; XI,999; VX-322; Azd0530; BMS-354825; SKI- 50 606 CP-690; AG-490; WHI-P154; WHI-P131; AC-220; or AMG888.
- Los inhibidores de VEGF/VEGFR ejemplares incluyen, pero no se limitan a, bevacizumab (Avastin), sorafenib (Nexavar), sunitinib (Sutent), ranibizumab, pegaptanib, o vandetinib.
- 55 Los fármacos dirigidos contra microtúbulos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina, nocodazol, epotilonas y navelbina.
- Los fármacos venenosos de topoisomerasas ejemplares incluyen, pero no se limitan a, tenipósido, etopósido, adriamicina, camptotecina, daunorrubicina, dactinomicina, mitoxantrona, amsacrina, epirubicina e idarrubicina.
- 60 Los taxanos o derivados de taxanos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel y docetaxol.
- Los inhibidores de puntos de control inmunitarios ejemplares incluyen inhibidores de la muerte celular programada 1 (PD-1), de la molécula CD274 (PD-L1) y de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4). Los inhibidores 65 de PD-1 ejemplares incluyen pembrolizumab, nivolumab y cemiplimab. Los inhibidores de PD-L1 ejemplares incluyen atezolizumab, avelumab y durvalumab. Los inhibidores de CTLA4 ejemplares incluyen ipilimumab.

Los agentes antineoplásicos basados en platino ejemplares incluyen cisplatino y carboplatino.

Los inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina (CDK) ejemplares incluyen abemaciclib, palbociclib, y ribociclib.

5 Los inhibidores de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) ejemplares incluyen talazoparib, olaparib, rucaparib, niraparib y veliparib.

10 Los agentes antiproliferativos, antineoplásicos y quimioterapéuticos generales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, altretamina (Hexalen); isotretinoína (Accutane; Amnesteem; Claravis; Sotret); tretinoína (Vesanoide); azacitidina (Vidaza); bortezomib (Velcade) asparaginasa (Elspar); levamisol (Ergamisol); mitotano (Lysodren); procarbazona (Matulane); pegaspargasa (Oncaspar); denileucina diftotox (Ontak); porfímero (Photofrin); aldesleucina (Proleucina); lenalidomida (Revlimid); bexaroteno (Targretin); talidomida (Thalomid); temsirolimus (Torisel); trióxido de arsénico (Trisenox); verteporfina (Visudyne); mimosina (Leucenol); (tegafur 1 M - 5-cloro-2,4-dihidroxipirimidina 0,4 M - oxonato de potasio 1 M) o lovastatina.

15 En algunos casos, se proporcionan modalidades de tratamiento combinado en las que el agente terapéutico adicional es una citocina, por ejemplo G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos). En otro aspecto, una composición farmacéutica proporcionada aquí se puede administrar en combinación con radioterapia. La radioterapia también se puede administrar en combinación con una composición farmacéutica proporcionada aquí y otro agente quimioterapéutico descrito aquí como parte de una terapia con múltiples agentes. En aún otro aspecto, una composición farmacéutica proporcionada aquí se puede administrarse en combinación con combinaciones de quimioterapia estándar, tales como, pero no restringidas a, CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo), CAF (ciclofosfamida, adriamicina y 5-fluorouracilo), AC (adriamicina y ciclofosfamida), FEC (5-fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida), ACT o ATC (adriamicina, ciclofosfamida y paclitaxel), rituximab, Xeloda (capecitabina), cisplatino (CDDP), carboplatino, TS-1 (tegafur, gimestat y otastat potásico en una relación molar de 1:0,4:1), camptotecina-11 (CPT-11, irinotecán o Camptosar™), CHOP (ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, oncovina y prednisona o prednisolona), R-CHOP (rituximab, ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, oncovina, prednisona o prednisolona), o CMFP (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo y prednisona).

20 En algunos casos preferidos, una composición farmacéutica proporcionada aquí se puede administrar con un inhibidor de una enzima, tal como una cinasa receptora o no receptora. Las cinasas receptoras y no receptoras son, por ejemplo, tirosina cinasas o serina/treonina cinasas. Los inhibidores de cinasa descritos aquí son moléculas pequeñas, ácidos polinucleicos, polipéptidos, o anticuerpos.

25 Los inhibidores de cinasa ejemplares incluyen, pero no se limitan a, Bevacizumab (dirigido contra VEGF), BIBW 2992 (dirigido contra EGFR y Erb2), Cetuximab/Erbitux (dirigido contra Erb1), Imatinib/Gleevec (dirigido contra Bcr-Abl), Trastuzumab (dirigido contra Erb2), Gefitinib/Iressa (dirigido contra EGFR), Ranibizumab (dirigido contra VEGF), Pegaptanib (dirigido contra VEGF), Erlotinib/Tarceva (dirigido contra Erb1), Nilotinib (dirigido contra Bcr-Abl), Lapatinib (dirigido contra Erb1 y Erb2/Her2), GW-572016/lapatinib ditosilato (dirigido contra HER2/Erb2), Panitumumab/Vectibix (dirigido contra EGFR), Vandetinib (dirigido contra RET/VEGFR), E7080 (múltiples dianas, incluidas RET y VEGFR), Herceptina (dirigida contra HER2/Erb2), PKI-166 (dirigido contra EGFR), Canertinib/CI-1033 (dirigido contra EGFR), Sunitinib/SU-11464/Sutent (dirigido contra EGFR y FLT3), Matuzumab/Emd7200 (dirigido contra EGFR), EKB-569 (dirigido contra EGFR), Zd6474 (dirigido contra EGFR y VEGFR), PKC-412 (dirigido contra VEGFR y FLT3), Vatalanib/Ptk787/ZK222584 (dirigido contra VEGFR), CEP-701 (dirigido contra FLT3), SU5614 (dirigido contra FLT3), MLN518 (dirigido contra FLT3), XL999 (dirigido contra FLT3), VX-322 (dirigido contra FLT3), Azd0530 (dirigido contra SRC), BMS-354825 (dirigido contra SRC), SKI-606 (dirigido contra SRC), CP-690 (dirigido contra JAK), AG-490 (dirigido contra JAK), WHI-P154 (dirigido contra JAK), WHI-P131 (dirigido contra JAK), sorafenib/Nexavar (dirigido contra RAF cinasa, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , KIT, FLT-3, y RET), Dasatinib/Sprycel (BCR/ABL y Src), AC-220 (dirigido contra Flt3), AC-480 (dirigido contra todas las proteínas HER, "panHER"), Motesanib difosfato (dirigido contra VEGF1-3, PDGFR, y c-kit), Denosumab (dirigido contra RANKL, inhibite SRC), AMG888 (dirigido contra HER3), y AP24534 (múltiples dianas, incluyendo Flt3).

30 En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que comprende el mismo polipéptido descrito aquí se administra a un sujeto una vez al día. En algunos casos, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez cada dos días. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez cada tres días. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez cada cuatro días. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez cada cinco días. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que comprende el mismo polipéptido se administra a un sujeto una vez cada seis días. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez por semana. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez cada 7-14 días. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez cada 10-20 días. En otro caso, la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica que la comprende se administra a un sujeto una vez

En otro caso, la dosis se administra diariamente, semanalmente, quincenalmente, mensualmente o anualmente. En otro caso, la dosis se administra una vez, dos veces, o dos o más veces al día, una semana, un mes o un año. En otro caso, la dosis se administra cada dos, tres, cuatro, o al menos cinco años.

5 En un caso, se pueden realizar administraciones (dosis) repetidas de las composiciones descritas aquí inmediatamente después del primer ciclo de tratamiento, o después de un intervalo de días, semanas o años, para lograr el efecto deseado como se proporciona adicionalmente aquí (por ejemplo, para prevenir o tratar enfermedad o afección cardiovascular, o una enfermedad o afección relacionada con el SNC).

10 En un caso, las composiciones farmacéuticas se administran mediante inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea o intramuscular de una preparación líquida. En otro caso, las formulaciones líquidas incluyen disoluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En un caso, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa, y por tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa.
15 En otro caso, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial, y por tanto se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial.

En algunos casos, las composiciones para uso en los métodos descritos aquí comprenden disoluciones o emulsiones, que en algunos casos son disoluciones o emulsiones acuosas que comprenden una cantidad segura y eficaz de los compuestos descritos aquí y, opcionalmente, otros compuestos, destinados a la administración intravenosa o subcutánea.
20

En algunos casos, los diversos constituyentes de las composiciones vienen premedidos y/o preenvasados y/o listos para su uso sin ninguna medida adicional, etc. La descripción también comprende opcionalmente kits para realizar/usar los métodos y/o las composiciones descritas aquí. En particular, estos kits incluyen opcionalmente, por ejemplo, proteína de fusión recombinante apropiada (y opcionalmente mezclas de varias de tales proteínas para llevar a cabo tratamientos sinérgicos, véase más arriba), y opcionalmente también antígeno o antígenos relacionados con la enfermedad apropiados). Además, tales kits también pueden comprender excipientes apropiados (por ejemplo, excipientes farmacéuticamente aceptables) para llevar a cabo los tratamientos terapéuticos y/o profilácticos descritos aquí. Tales kits contienen opcionalmente componentes adicionales para la fabricación y/o uso de las composiciones de la descripción, incluyendo, pero no se limitan a, diluyentes, etc.
25
30

Las composiciones descritas aquí se envasan opcionalmente para incluir todos (o casi todos) los componentes necesarios para llevar a cabo los métodos de la descripción o para usar las composiciones de la descripción (incluyendo opcionalmente, por ejemplo, instrucciones escritas para el uso de los métodos/composiciones de la descripción). Por ejemplo, los kits pueden incluir opcionalmente componentes tales como, por ejemplo, amortiguadores, reactivos, proteínas séricas, anticuerpos, sustratos, etc. En el caso de reactivos preenvasados, los kits incluyen opcionalmente cantidades premedidas o predosificadas que están listas para incorporar a los métodos sin medirlas, por ejemplo alícuotas de líquido previamente medidas, o reactivos sólidos previamente pesados o previamente medidos que pueden ser fácilmente reconstituidos por el usuario final del kit.
35
40

Tales kits también incluyen típicamente instrucciones apropiadas para llevar a cabo los métodos de la descripción y/o usar las composiciones de la descripción. En algunos casos, los componentes de los kits/envases se proporcionan en forma estabilizada, para evitar la degradación u otras pérdidas durante el almacenamiento prolongado, por ejemplo por fugas. Se usan ampliamente varios procedimientos/agentes estabilizantes para reactivos, etc. que se usan para almacenar, tal como la inclusión de estabilizantes químicos (es decir, inhibidores enzimáticos, microbicidas/bacteriostáticos, anticoagulantes), etc. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxica para el sujeto. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del sujeto que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
45
50
55

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición pueda administrarse mediante jeringa. Además de agua, el vehículo es preferiblemente una disolución salina amortiguada isotónica. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio.
60

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto, composición y modo de administración en particular, sin ser tóxica para el sujeto. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las
65

composiciones de la descripción particulares empleadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del sujeto que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Los artículos indefinidos "un" y "una", como se usan aquí en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, deben entenderse como "al menos uno".

La frase "y/o", como se usa aquí en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, debe entenderse como "cualquiera o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes de manera conjuntiva en algunos casos y presentes de manera disyuntiva en otros casos. Múltiples elementos enumerados con "y/o" deben interpretarse de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así unidos. Opcionalmente, pueden estar presentes otros elementos además de los elementos específicamente identificados por la cláusula "y/o", ya sea que estén relacionados o no con esos elementos específicamente identificados. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, una referencia a "A y/o B", cuando se usa junto con un lenguaje abierto como "que comprende", puede referirse, en un caso, a A solamente (opcionalmente que incluye 5 elementos distintos de B); en otro caso, sólo a B (opcionalmente que incluye elementos distintos de A); en aún otro caso, tanto a A como a B (opcionalmente que incluye otros elementos); etc.

Como se usa aquí en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse como al menos un elemento seleccionado de uno cualquiera o más de los elementos en la lista de elementos, pero no necesariamente incluye al menos uno de todos y cada uno de los elementos específicamente enumerados dentro de la lista de elementos, y no excluye ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que opcionalmente puedan estar presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a la que se refiere la frase "al menos uno", ya sea que estén relacionados o no con esos elementos específicamente identificados. Así, como ejemplo no limitativo, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B", o, de manera equivalente, "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en un caso, a al menos un, incluyendo opcionalmente más de un, A, sin B presente (y opcionalmente que incluye elementos distintos de B); en otro caso, a al menos un, incluyendo opcionalmente más de un, B, sin A presente (y opcionalmente que incluye elementos distintos de A); en aún otro caso, a al menos un, que incluye opcionalmente más de un, A, y al menos un, que incluye opcionalmente más de un, B (y opcionalmente que incluye otros elementos); etc.

La descripción proporciona además un kit para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o afección cardiovascular en un ser humano, en la que el kit comprende una o más dosis de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión recombinante descrita aquí usada para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o afección cardiovascular, e instrucciones sobre cómo usar la preparación o composición farmacéutica.

La descripción proporciona además un kit para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o afección relacionada con el SNC en un ser humano, en la que el kit comprende una o más dosis de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión recombinante descrita aquí usada para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o afección cardiovascular, e instrucciones sobre cómo usar la preparación o composición farmacéutica.

La descripción proporciona además un kit para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección conservada en un ser humano, en la que el kit comprende una o más dosis de una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión recombinante descrita aquí usada para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca con fracción de eyección conservada, e instrucciones sobre cómo usar la preparación o composición farmacéutica.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 - Clonación y construcción de plásmidos de expresión

GENEWIZ (Suzhou, China) sintetizó secuencias de ADN que codifican la cadena pesada de las proteínas de fusión recombinantes (denominadas NPCFA y NPCF para las secuencias con o sin mutaciones de Fc, respectivamente) y la cadena ligera (denominada PAL). El vector de expresión pCHOGUN se obtuvo de Horizon Discovery (Cambridge, Reino Unido) bajo un acuerdo de licencia. La construcción de los plásmidos de expresión se lleva a cabo como se describe en la Figura 1. Brevemente, el vector pCHOGUN se linealizó mediante la enzima de restricción BfuAI, y los fragmentos de inserto génico, tales como NPCF, NPCFA y PAL, se purificaron tras una doble digestión con enzimas de restricción mediante NcoI y Ascl. El pCHOGUN/BfuAI linealizado y el fragmento de inserto génico purificado se ligaron según el protocolo estándar y después se transformaron en células competentes de E. coli DH5 α . Se sembraron células DH5 α y se incubaron durante la noche a 37°C. Los plásmidos pCHOGUN-NPCF, pCHOGUN-NPCFA y pCHOGUN-PAL se aislaron y confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción o PCR. El plásmido que contenía el inserto de cadena pesada (pCHOGUN-NPCF o pCHOGUN-NPCFA) se digirió con las enzimas de restricción BspEI y PciI, mientras que el plásmido que contenía el inserto de cadena ligera (pCHOGUN-PAL) se digirió

con las enzimas de restricción NgoMIV y PciI. Tras la digestión con enzimas de restricción, los fragmentos con el inserto de cadena pesada o ligera se purificaron, se ligaron, y después se transformaron en células DH5 α . Los constructos de plásmido que contienen los insertos tanto de cadena pesada como ligera (pCHOGUN-NPCF+PAL o pCHOGUN-NPCFA+PAL) se identificaron y confirmaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

EJEMPLO 2 - Producción, purificación y caracterización de anticuerpos

HD-BIOP3, una línea celular sin glutamina sintetasa (GS^{-/-}) derivada de células CHO K1, se obtuvo de Horizon Discovery (Cambridge, Reino Unido) en virtud de un acuerdo de licencia. El ADN plasmídico se aísla usando kits de plásmidos Qiagen disponibles comercialmente. La transfección del ADN plasmídico en células HD-BIOP3 se llevó a cabo usando un sistema de electroporación disponible comercialmente de Lonza. Las células transfectadas se sembraron en placas de 96 pocillos y se sometieron a una selección de conjuntos usando procedimientos estándar. Las células de los conjuntos seleccionados se cultivaron en matraces agitados de 125 ml durante 10 a 14 días, y los medios se recogieron para la purificación de anticuerpos. Las proteínas de los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño, y después se analizaron con SDS-PAGE y transferencia Western según protocolos estándar.

La Figura 2A ilustra la estructura esquemática de la proteína de fusión recombinante descrita aquí. La Figura 2B muestra datos representativos generados por análisis de SDS-PAGE. Los resultados de la transferencia Western detectados por el anticuerpo primario específico para el fragmento activo de 61 aminoácidos de NRG-1 que comprende el dominio de unión HER3/4 ("NRG-1", R&D Systems, Minneapolis, MN) o IgG se muestran en las Figuras 2C y 2D, respectivamente.

EJEMPLO 3 - Integridad molecular evaluada mediante ensayo de unión basado en SPR

La integridad de la estructura molecular de la proteína de fusión recombinante descrita aquí se evalúa evaluando su capacidad de unión simultánea a la proteína HER3 y al anticuerpo Anti-NRG-1. La proteína recombinante HER3 etiquetada con His (Sino Biological, Beijing, China) se capturó en el chip sensor inmovilizado con anticuerpo anti-His (Thermo Fisher, Waltham, MA) (Etapa 1), seguido de la inyección de muestras (incluida la proteína de fusión recombinante descrita aquí, la proteína de fusión recombinante descrita aquí sin mutaciones de Fc, mAb anti-HER3 (Etapa 2), y anticuerpo anti-NRG-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) (Etapa 3). La unión de His-HER3 en el chip sensor se puede visualizar mediante el aumento de la señal en los 6 canales en la etapa 1. Tanto la proteína de fusión recombinante descrita aquí como la proteína de fusión recombinante descrita aquí sin mutaciones de Fc generaron una respuesta significativa en la etapa 2 al unirse a HER3 y en la etapa 3 al unirse al anticuerpo anti-NRG-1 inyectado (Canales 1, 3), indicando la presencia del epítipo de unión a HER3 y de NRG-1 en la proteína de fusión recombinante descrita aquí. Por el contrario, el mAb anti-HER3 se unió sólo a His-HER3 en la etapa 2, pero no al anticuerpo Anti-NRG-1 ni al amortiguador (Etapa 3) (Canales 4, 5), verificando la ausencia de actividad de unión a NRG-1 para la molécula de mAb anti-HER3. Se inyectó amortiguador en las etapas 2 y 3 como control en blanco. Por lo tanto, tanto el epítipo de unión a HER3 como NRG-1 están presentes en la proteína de fusión recombinante.

El sensorgrama de unión y las secuencias de inyección de muestras se muestran en la Figura 3.

EJEMPLO 4 - Efecto sobre la proliferación de líneas celulares tumorales *in vitro*

Se sembraron células tumorales en placas de 96 pocillos a razón de 2.500-20.000 células por pocillo, dependiendo de la cinética de crecimiento de cada línea celular. Después, las células se trataron con la proteína de fusión recombinante descrita aquí, con anticuerpo o con proteína de control en una serie de diluciones en serie 1:4 graduales durante 5 días. La viabilidad celular se evaluó usando el Cell Counting Kit-8 de Dojindo Molecular Technologies (Kumamoto, Japón) según las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism, y se presentan como la tasa de crecimiento con respecto al control no tratado.

La Figura 4 incluye gráficos representativos que muestran la tasa de crecimiento relativa media \pm SEM (n = 3) para diferentes líneas celulares de cáncer: (A) NCI-N87, gástrico; (B) MCF-7, mama; (C) RT-112, vejiga; y (D) T47D, mama. En comparación con las proteínas de fusión de control NRG-1 y mAb GP120/NRG-1, la proteína de fusión recombinante descrita aquí demuestra una actividad notablemente menor promoviendo la proliferación de células cancerosas.

EJEMPLO 5 - Activación de la ruta de señalización de PI3K/AKT en cardiomiocitos humanos

Se sembraron cardiomiocitos humanos obtenidos de Cellular Dynamics (Madison, WI) en placas de 96 pocillos recubiertas de gelatina al 0,1 %, y se recuperaron en el medio de siembra (Cellular Dynamics) durante 4 horas. Después, las células se cultivaron en el medio de mantenimiento (Cellular Dynamics) durante 96 horas antes de usarlas para la experimentación. Para examinar la capacidad de la proteína de fusión recombinante para activar la ruta de señalización de HER2:HER4 en cardiomiocitos, las células se privaron primero de alimentos durante 4 horas en medios sin suero, y después se trataron con la proteína de fusión recombinante o agentes de control (NRG-1, mAb

GP120/NRG-1, mAb anti-HER3, o mAb GP120) en una serie de diluciones en serie graduales 1:4 durante 15 minutos. Al final del tratamiento, las células se lisaron y se analizaron para determinar la fosforilación de AKT usando el kit ELISA Phospho-AKT/Total AKT de Abeam (Cambridge, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism, y se presentan como la relación de fosfo-AKT a AKT total con respecto al control no tratado.

Para el análisis de transferencia Western, las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se trataron con la proteína de fusión recombinante o con agentes de control a una concentración única de 16 nM. Al final del tratamiento, las células se lisaron en amortiguador RIPALysis que contenía inhibidores de proteasas y fosfatasas. SDS-PAGE y la transferencia Western se realizaron según protocolos estándar. La AKT total y la fosfo-AKT se transfirieron con anticuerpo de conejo anti-AKT y anticuerpo de conejo anti-p-AKT (S473) (Cell Signaling; Danvers, MA), respectivamente.

La Figura 5 muestra la fosforilación de AKT en respuesta a estímulos en cardiomiocitos humanos. Los resultados sugieren que la proteína de fusión recombinante descrita aquí puede activar la ruta de señalización de HER2:HER4 en cardiomiocitos con una potencia comparable a la de NRG-1.

EJEMPLO 6: Inducción de dimerización de HER2:HER3 y dimerización de HER2:HER4

El ensayo de dimerización PathHunter desarrollado por Eurofins DiscoverX (Fremont, CA) detecta la dimerización inducida por ligando de dos subunidades de un par receptor-dímero. El principio del ensayo se ilustra en la Figura 6A. La enzima β -gal se divide en dos fragmentos, ProLink (PK) y receptor enzimático (EA). Las células se han diseñado para coexpresar la proteína diana 1 fusionada con el donante enzimático PK, y la proteína diana 2 fusionada con el aceptor enzimático EA. La unión del ligando a una proteína diana la induce a interactuar con la otra proteína diana, forzando la complementación de los dos fragmentos enzimáticos y dando como resultado la reacción enzimática para liberar una señal quimioluminiscente que se detecta como Unidad de Fluorescencia Relativa o UFR.

La línea celular de dimerización PathHunter U2OS ErbB2/ErbB4 y la línea celular de dimerización ErbB2/ErbB3 se obtuvieron de Eurofins DiscoverX. Las células se sembraron a razón de 4.000 células/pocillo en placas de 384 pocillos, y se incubaron a 37°C/5% de CO₂ durante la noche. Los agentes de ensayo se prepararon en una serie de diluciones en serie 1:4 graduales a partir de 28,8 nM, y después se añadieron a las células en placas de 384 pocillos. Después de 4 horas de incubación, las células se analizaron para determinar la dimerización del receptor según las instrucciones del fabricante. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism, y se presentan como UFR media \pm SEM (n = 3).

Como se muestra en las Figuras 6B y 6C, la proteína de fusión recombinante descrita aquí puede inducir la dimerización de HER2/HER4 con una potencia comparable a la de NRG-1; mientras que su capacidad para inducir la dimerización de HER2/HER3 es mucho más débil. Como controles negativos para el estudio, ni el anticuerpo de control de isotipo mAb GP120 ni el mAb anti-HER3 indujeron la dimerización del receptor.

EJEMPLO 7: Eficacia *in vivo* de la proteína de fusión recombinante en un modelo de insuficiencia cardíaca sistólica en ratas

Para evaluar la capacidad de la proteína de fusión recombinante para regenerar la función cardíaca en un modelo de enfermedad, se empleó un modelo de infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca sistólica en ratas Sprague Dawley. Para establecer el modelo de enfermedad, se usó una sutura de seda 6-0 para ligar la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) 3-4 mm por debajo de la orejuela auricular izquierda en un procedimiento quirúrgico. Cuatro semanas después de la ligadura, la fracción de eyección (EF) se registró mediante ecocardiografía Doppler en modo M (ECG) para medir la función cardíaca frente a la EF inicial antes de la cirugía. Se usó un umbral de disminución mínima del 30% de la EF para la inclusión en el estudio posterior. Los animales de control simulados se sometieron a una cirugía idéntica sin la ligadura de LAD.

Después de establecer el modelo de enfermedad, los animales se dividieron en cinco grupos de once ratas cada uno, y se incluyeron diez ratas de cirugía simulada adicionales en un sexto grupo. El estudio se diseñó para que cada grupo recibiera inyecciones en la vena de la cola dos veces por semana durante un período de cuatro semanas, u ocho inyecciones en total. Tanto el grupo de cirugía simulada como el grupo de control negativo del vehículo recibieron disolución salina, tres grupos recibieron la proteína de fusión recombinante a 1, 3 o 10 mg/kg, y el grupo final recibió un control positivo de proteína de fusión mAb GP120/NRG-1 (10 mg/kg).

Debido a la pérdida de peso corporal observada durante el estudio, el tratamiento se interrumpió antes de la secuencia completa de ocho inyecciones en los grupos de proteína de fusión recombinante que recibieron 3 mg/kg y 10 mg/kg, y esos grupos recibieron sólo seis y tres inyecciones respectivamente. Todos los demás grupos recibieron el conjunto completo de ocho inyecciones.

Cuatro semanas después del primer tratamiento, se midió nuevamente la EF mediante ECG en modo M. Como se muestra en la Figura 8, con respecto al valor inicial, la proteína de fusión recombinante aumentó significativamente la

EF en los tres grupos de dosis. Específicamente, se observaron aumentos del 14,7 % (P <0,001), 26,9 % (P <0,001) y 36,6 % (P <0,001) para los grupos de 1, 3 y 10 mg/kg respectivamente. El control positivo mAb GP120/NRG-1 aumentó la EF en un 28,8 % (P <0,001) en los mismos puntos de tiempo. La disolución salina no mostró ningún efecto ni en el grupo de control simulado ni en el grupo de control del vehículo.

Después de la recopilación de los valores de ECG a los 28 días después del tratamiento, se practicó la eutanasia a los ratones y se recogieron los tejidos cardíacos próximos al sitio quirúrgico, se fijaron en formaldehído al 4 %, y se incluyeron en parafina. Secciones de parafina de cinco μm de grosor de los tejidos del corazón se tiñeron con colorantes de hematoxilina y eosina, y se observaron cambios histopatológicos bajo un microscopio óptico. Como se muestra en la Figura 9, en el grupo de operación simulada, los cardiomiocitos se dispusieron de manera ordenada, y el citoplasma y las fibras miocárdicas se tiñeron uniformemente. No se observó infiltración de células inflamatorias en los espacios intersticiales, y no se encontró necrosis miocárdica. Por el contrario, en el grupo de control del vehículo, la zona marginal del infarto de miocardio exhibió espacios ampliados entre las células del miocardio; los núcleos se condensaron y rompieron, y la disposición de las fibras miocárdicas perdió su estructura ordenada; el tamaño de las células aumentó, y se notó el edema intersticial. El tratamiento con la proteína de fusión recombinante alivió parcialmente los cambios patológicos en la zona del infarto de miocardio, incluyendo una reducción significativa de las células necróticas, el estrechamiento de los espacios intersticiales entre las células del miocardio, y la recuperación de la disposición de las fibras miocárdicas hacia la estructura normal.

EJEMPLO 8: La proteína de fusión recombinante atenuó el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de carcinoma subcutáneo FaDu en ratones NOD/SCID

Para evaluar el riesgo potencial de la proteína de fusión recombinante en la promoción del crecimiento tumoral, se llevó a cabo un estudio *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de carcinoma FaDu. Los ratones NOD/SCID (Beijing AK Bio-Technology Co. Ltd.) se mantuvieron en las instalaciones SPF del centro internacional de I+D CrownBio (Beijing, China) según las directrices institucionales. Todos los experimentos se realizaron según los requisitos de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC) y con el permiso del Comité IACUC de CrownBio.

Se inocularon por vía subcutánea ratones NOD/SCID hembra, de 7 a 10 semanas, en el flanco derecho con células tumorales FaDu (3×10^6) suspendidas en 0,1 ml de PBS. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 150 mm³, los ratones se distribuyeron aleatoriamente y se clasificaron en 6 grupos de estudio, con 8 animales por grupo. Las muestras de ensayo se administraron por vía intravenosa mediante inyección en la vena de la cola dos veces por semana durante tres semanas consecutivas, para un total de 6 tratamientos. El crecimiento tumoral se monitorizó por medidas con calibre. El estudio finalizó 21 días después del tratamiento.

El crecimiento tumoral en respuesta a diferentes tratamientos se resume en la Figura 10. El mAb anti-HER3 a 10 mg/kg mostró una actividad antitumoral significativa, con una inhibición del crecimiento tumoral (TGI) del 93,5 % al final del estudio ($p < 0,001$ frente al grupo de vehículo). La proteína de fusión recombinante también demostró una TGI estadísticamente significativa al final del estudio: 19,2 % a una dosis de 1 mg/kg ($p=0,048$ frente al grupo de vehículo) y 56,2 % a una dosis de 10 mg/kg ($p<0,001$ frente al grupo de vehículo). La molécula de control proteína de fusión mAb GP120/NRG-1 no mostró actividad antitumoral ni en dosis alta ni en dosis baja. No se produjeron muertes de animales durante el estudio. Todos los agentes de ensayo fueron bien tolerados por los ratones con tumores. No se observó una pérdida significativa de peso corporal en ningún grupo experimental (Figura 11). Estos datos muestran que bajo la condición de crecimiento tumoral activo *in vivo*, la proteína de fusión recombinante exhibe inhibición del crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis, y sugiere que el riesgo de que la proteína de fusión recombinante aumente o acelere el crecimiento tumoral *in vivo* es menor que el de la proteína NRG-1 nativa.

Ejemplo 9: No se observó toxicidad gastrointestinal significativa en monos cinomolgos a los que se les administró la proteína de fusión recombinante

Anteriormente se informó que en un estudio clínico de Fase Uno (NCT01258387), en el que los sujetos recibieron placebo o una dosis única de cimagermina (NRG-1 β 3 recombinante de longitud completa), las náuseas y la diarrea fueron el segundo y cuarto evento adverso más común surgido del tratamiento, que ocurrieron en el 40 % y el 27 % de las cohortes agregadas de dosis altas, respectivamente (Lenihan et al. J Am Coll Cardiol Basic Trans Science. 2016;1(7):576-86). De manera similar, en un estudio de Fase Dos de un fragmento de péptido NRG-1 recombinante (neucardina), las náuseas fueron el evento adverso relacionado con el tratamiento observado con mayor frecuencia, observado en el 20 % de los sujetos del estudio (Jabbour et al. European Journal of Heart Failure (2011) 13: 83-92). Finalmente, en un segundo estudio de Fase Dos de neucardina (ChiCTR-TRC-00000414), los resultados publicados muestran que el 48,4 % de los eventos adversos observados fueron de naturaleza gastrointestinal, el tipo de eventos adversos observado con mayor frecuencia en este estudio, y se correlacionaron con el nivel de la dosis (Gao et al. J Am Coll Cardiol 2010; 55:1907-14).

Se realizaron dos estudios para evaluar la seguridad y tolerabilidad de la proteína de fusión recombinante en macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*): un estudio de dosis única sin BPL (buenas prácticas de laboratorio) y un estudio de BPL de dosis repetidas. Las toxicidades gastrointestinales se monitorizaron cuidadosamente. En el estudio de dosis

única, se evaluó la seguridad y tolerabilidad de la proteína de fusión recombinante a niveles de dosis de 10, 30 y 60 mg/kg en comparación con el control del vehículo, con un animal macho y una hembra incluidos en cada cohorte. En este estudio de dosis única no hubo efectos relacionados con el agente de ensayo sobre el peso corporal o la evaluación cualitativa de los alimentos durante el período de evaluación posterior al tratamiento de dos semanas, ni observaciones de vómitos o diarrea. En el estudio de BPL de dosis repetidas, se evaluó la seguridad y tolerabilidad de la proteína de fusión recombinante después de cuatro administraciones semanales consecutivas a niveles de dosis de 3, 10 y 30 mg/kg en comparación con el control del vehículo, con tres machos y tres hembras incluidos en cada cohorte durante el período principal de estudio de 28 días, y dos machos y dos hembras adicionales en las cohortes de 30 mg/kg y de control del vehículo evaluadas después de un período de recuperación posterior de 28 días. No se observaron efectos relacionados con el agente de ensayo sobre el consumo de alimentos en este estudio de dosis repetidas. Si bien se observaron vómitos relacionados con el agente de ensayo en este estudio de dosis repetidas, las observaciones clínicas de vómitos sólo se asociaron con reacciones a la infusión, observadas sólo en un animal en la cohorte de 10 mg/kg (17 %) y en dos animales en la cohorte de 30 mg/kg (20 %), y fueron de naturaleza transitoria. Se observó diarrea sólo en la cohorte de control del vehículo y en la cohorte de la proteína de fusión recombinante de 30 mg/kg, en sólo uno (10 %) y tres (30 %) animales respectivamente, y se consideró normal para este tipo de procedimiento y no relacionada con la proteína de fusión recombinante. Finalmente, en este estudio de dosis repetidas, el peso corporal promedio se redujo >10 % con respecto al valor inicial sólo en los niveles de dosis de 10 mg/kg y 30 mg/kg, y sólo después de la cuarta dosis en la cohorte de 10 mg/kg y la tercera y cuarta dosis en la cohorte de 30 mg/kg. En resumen, el tratamiento con la proteína de fusión recombinante no produjo ningún hallazgo clínicamente significativo relacionado con la ingesta de alimentos, vómitos o diarrea excepto durante las reacciones agudas a la infusión, y los hallazgos gastrointestinales no tuvieron impacto en la determinación del nivel de eventos no adversos en cualquiera de los dos estudios. Estos resultados indican que el diseño de la proteína de fusión recombinante mitiga el efecto adverso de la proteína recombinante NRG-1 en el tubo digestivo.

Se recogieron muestras de sangre (~1 ml) de monos cinomolgos después de la administración de una dosis única de 60 mg/kg de la proteína de fusión recombinante en diferentes momentos, y los sueros se extrajeron y almacenaron a -80°C hasta que se analizaron. Las concentraciones de la proteína de fusión recombinante en las muestras de suero se analizaron mediante ELISA de captura según procedimientos estándar. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con la proteína HER3 humana recombinante (R&D System), se bloquearon con BSA, y se incubaron con muestras de ensayo. Después de múltiples lavados, las placas se incubaron con anticuerpo anti-Fc de IgG humana conjugado con HRP, y después se detectaron con sustrato TMB. La Figura 12 muestra que el perfil farmacocinético de la proteína de fusión recombinante es similar al del anticuerpo IgG.

EJEMPLO 10: Resumen de las constantes cinéticas en la unión al receptor Fc

La afinidad de unión entre la proteína de fusión recombinante mAb anti-HER3/NRG-1 y los receptores Fc se midió usando la técnica de SPR sin marcadores. Se analizó un total de seis receptores Fc (cada uno fusionado con una etiqueta His), incluidos FcyRI (Abcam), FcyRIIIa, FcyRIIIb, FcyRIIIa (158F), FcyRIIIa (158V), y C1q (Sino Biological), frente a la proteína de fusión recombinante, la proteína de fusión recombinante sin mutaciones de Fc, y el anticuerpo anti-HER3, respectivamente. Todos los receptores Fc y las muestras de ensayo se purificaron mediante cromatografía de afinidad. Todos los experimentos se llevaron a cabo en sistemas Biacore 8K (GE Healthcare), con HBS-EP+ (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y tensioactivo P20 al 0,05 % v/v) como amortiguador de ejecución. Específicamente, el anticuerpo anti-His se acopló en la celda de flujo activa y de referencia de un chip sensor CM5 mediante el método de acoplamiento de aminas. Los receptores Fc etiquetados con His purificados se capturaron en la celda de flujo activa de cada canal individual mediante la unión al anticuerpo anti-His inmovilizado. El nivel de captura para cada receptor Fc se mantuvo entre 80 y 120 UR. Para el análisis cinético, la proteína de fusión recombinante y todas las demás muestras se diluyeron en serie hasta un total de 6 concentraciones, que oscilaban de 0,3 nM a 30 nM, y las diluciones en serie se inyectaron en secuencia a través de ambas celdas de flujo en cada canal. Se completaron múltiples análisis en el mismo experimento inyectando simultáneamente muestras en múltiples canales.

Los sensorgramas resultantes se ajustaron a un modelo de unión de dos estados para extraer constantes cinéticas usando el software de evaluación Biacore 8K. Las tasas de disociación de equilibrio (KD) de todos los análisis se resumen en la Tabla 1 a continuación. Los valores de KD derivados cinéticamente de la proteína de fusión recombinante que se une a FcyRI, FcyRIIIa y FcyRIIIb fueron más de 10 veces mayores que los de la proteína de fusión recombinante sin mutaciones de Fc y del anticuerpo anti-HER3, lo que indica afinidades mucho más bajas como resultado de las mutaciones especificadas dentro de la región Fc de la proteína de fusión recombinante. Con FcyRIIIa (158F) y FcyRIIIa (158V), respectivamente, las mutaciones de Fc condujeron a una reducción de 2 a 3 veces en la afinidad de unión por la proteína de fusión recombinante. La unión a C1q fue demasiado débil para ser detectada en todas las muestras.

Para confirmar que la proteína de fusión recombinante tiene funciones efectoras Fc limitadas, se examinó la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) usando el ADCC Reporter Bioassay de Promega (Madison, WI). El ensayo usó como células efectoras una línea celular Jurkat manipulada, que expresaba de manera estable el receptor FcyRIIIa (V158), y un elemento de respuesta NFAT que acciona la expresión de la luciferasa de luciérnaga. Rituximab, como control positivo para el ensayo, mostró una fuerte actividad ADCC contra células Raji positivas para

CD20; mientras que la proteína de fusión recombinante no tenía ADCC detectable contra células diana positivas para HER3 (MCF7 o BT474) (datos no mostrados).

Tabla 1: Resumen de constantes cinéticas sobre la unión de receptores Fc.

5

Receptores Fc	KD (M)		
	mAb anti-HER3/NRG-1	mAb anti-HER3/NRG-1 (sin mutaciones de Fc)	mAb anti-HER3
FcγRI	1,03E-08	2,81E-09	4,56E-09
FcγRIIa	1,35E-06	3,95E-07	1,50E-07
FcγRIIb	1,52E-06	1,03E-07	1,04E-08
FcγRIIIa (158F)	1,18E-07	6,37E-08	1,66E-07
FcγRIIIa (158V)	9,10E-08	3,41E-08	3,80E-08
C1q	< LOD*	< LOD*	< LOD*

* < LOD - por debajo del límite de detección (LOD) debido a una unión débil

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión recombinante que comprende un fragmento activo de la proteína cardioprotectora neuregulina-1 (NRG-1) fusionada a una cadena principal de anticuerpo monoclonal (mAb) que es monoespecífico para ErbB3 (HER3), en la que el fragmento de NRG-1 se une e induce la señalización a través de ErbB4 (HER4), y el mAb inhibe la señalización de NRG-1 a través de ErbB3 (HER3).
- 10 2. La proteína de fusión recombinante de la reivindicación 1, en la que el fragmento de NRG-1 comprende el dominio de unión ErbB3/4.
- 15 3. La proteína de fusión recombinante de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho fragmento de NRG-1 comprende la isoforma β 2a de NRG-1.
- 20 4. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el fragmento de NRG-1 se fusiona a través de su aminoácido N-terminal al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo usando un conector.
opcionalmente en la que dicho conector comprende al menos una copia de un conector Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser expuesto en SEQ ID NO: 5.
- 25 5. La proteína de fusión recombinante de la reivindicación 4, en la que el extremo C de la cadena pesada del anticuerpo comprende el dominio Fc del anticuerpo.
- 30 6. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el anticuerpo monoclonal está glicosilado, opcionalmente en la que la glicosilación es N-glicosilación u O-glicosilación.
- 35 7. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el fragmento de NRG-1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 40 8. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el mAb comprende una cadena pesada representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 45 9. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el mAb comprende una cadena ligera representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 50 10. La proteína de fusión recombinante de la reivindicación 8, en la que el mAb maduro comprende una mutación de sustitución en al menos uno de los aminoácidos 234, 239 y 434 de SEQ ID NO: 2, opcionalmente en la que la al menos una mutación de sustitución comprende una mutación L234F, una mutación S239A, una mutación N434A, o una combinación de las mismas.
- 55 11. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la proteína de fusión recombinante comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 14.
- 60 12. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la proteína de fusión recombinante atenúa la proliferación de células tumorales o cancerosas con respecto a NRG-1 recombinante.
- 65 13. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de cardiomiocitos.
- 70 14. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la proteína de fusión recombinante promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de tejido cardíaco.
- 75 15. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la proteína de fusión recombinante tiene una capacidad reducida para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).
- 80 16. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que la proteína de fusión recombinante promueve la señalización de HER2/4 sobre la señalización de HER2/3 con respecto al potencial de inducción de señales de NRG-1 recombinante.
- 85 17. Una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica la proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
- 90 18. Un vector recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17.
- 95 19. Una célula recombinante que comprende el vector recombinante de la reivindicación 18.

20. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
- 5 21. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o la composición farmacéutica de la reivindicación 20 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección cardiovascular en un sujeto, o para uso en la prevención, supresión, inhibición o retraso de la aparición de una enfermedad o afección cardiovascular en un sujeto, en el que la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica es para administración en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 10 22. La proteína de fusión recombinante o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 21, en la que la enfermedad o afección cardiovascular es insuficiencia cardíaca crónica/insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), insuficiencia cardíaca aguda/infarto de miocardio (IM), disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, lesión por perfusión asociada con IM, cardiotoxicidad inducida por quimioterapia (de adulto o pediátrica), cardiotoxicidad inducida por radiación, complementaria a intervención quirúrgica en cardiopatías congénitas pediátricas.
- 15 23. La proteína de fusión recombinante o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 22, en la que la cardiotoxicidad inducida por quimioterapia resulta de un sujeto que recibe antraciclinas, agentes alquilantes, agentes antimicrotúbulos, o agentes antimetabolitos usados como quimioterapia.
- 20 24. La proteína de fusión recombinante o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 22, en la que la afección cardiovascular es cardiotoxicidad como resultado de que un sujeto reciba una terapia contra el cáncer.
- 25 25. La proteína de fusión recombinante o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 24, en la que la terapia contra el cáncer es una terapia dirigida contra HER-2.
- 26 26. La proteína de fusión recombinante o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 25, en la que la terapia dirigida contra HER-2 comprende el uso de trastuzumab, ado-trastuzumab, emtansina, lapatinib, neratinib, pertuzumab, cualquier anticuerpo anti-HER2, cualquier agente anti-HER2, o una combinación de los mismos.
- 30 27. Un kit que comprende una cantidad eficaz de la proteína recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o la composición farmacéutica de la reivindicación 20.
- 35 28. La proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o la composición farmacéutica de la reivindicación 20 para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección, en la que la proteína de fusión recombinante o la composición farmacéutica es para administración en una cantidad terapéuticamente eficaz.

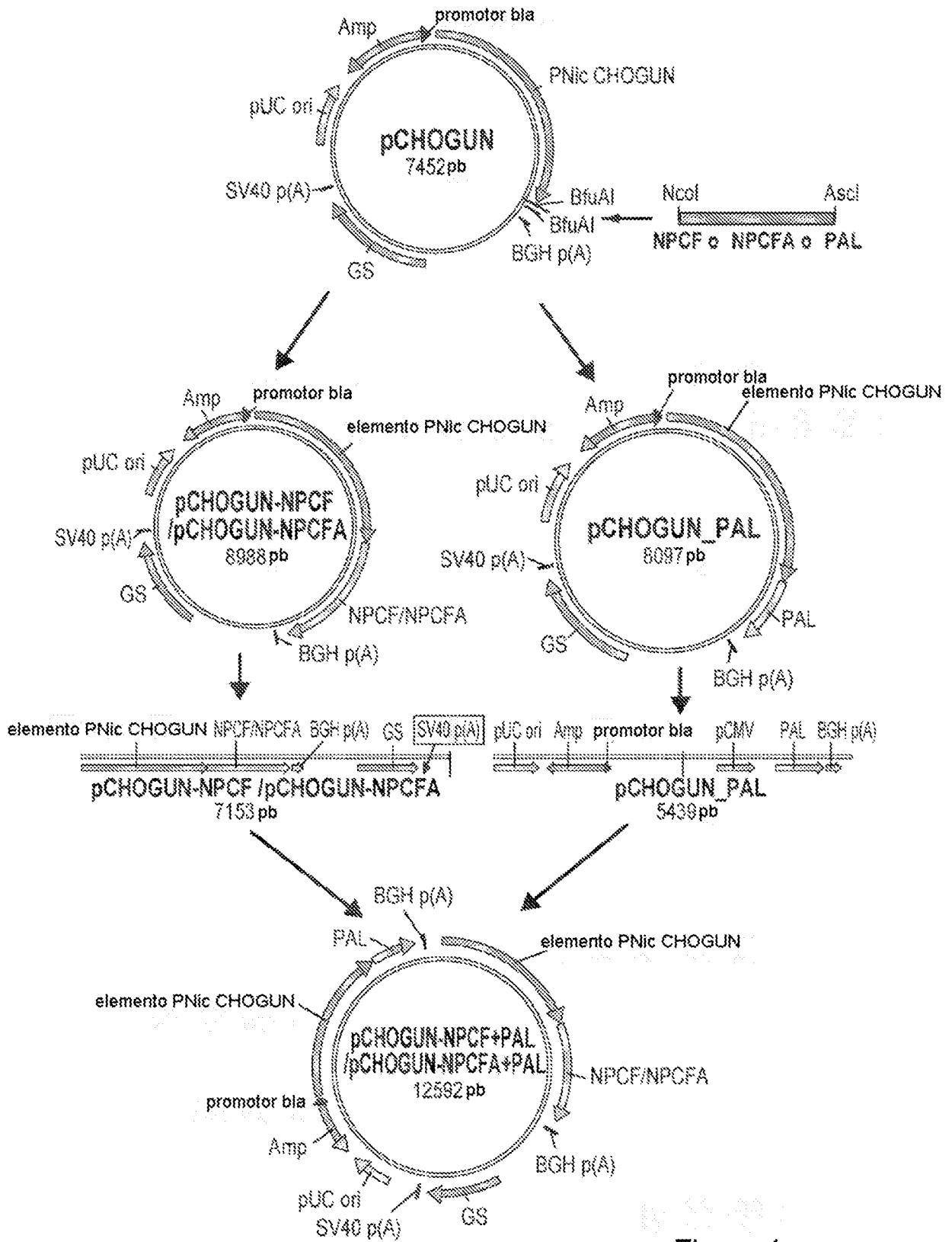


Figura 1

Esquema molecular de proteína de fusión mAb anti-HER3/NRG-1

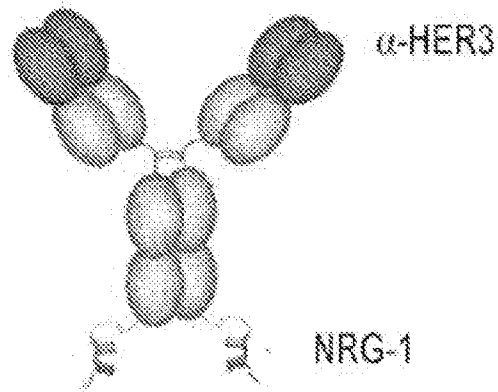


Figura 2A

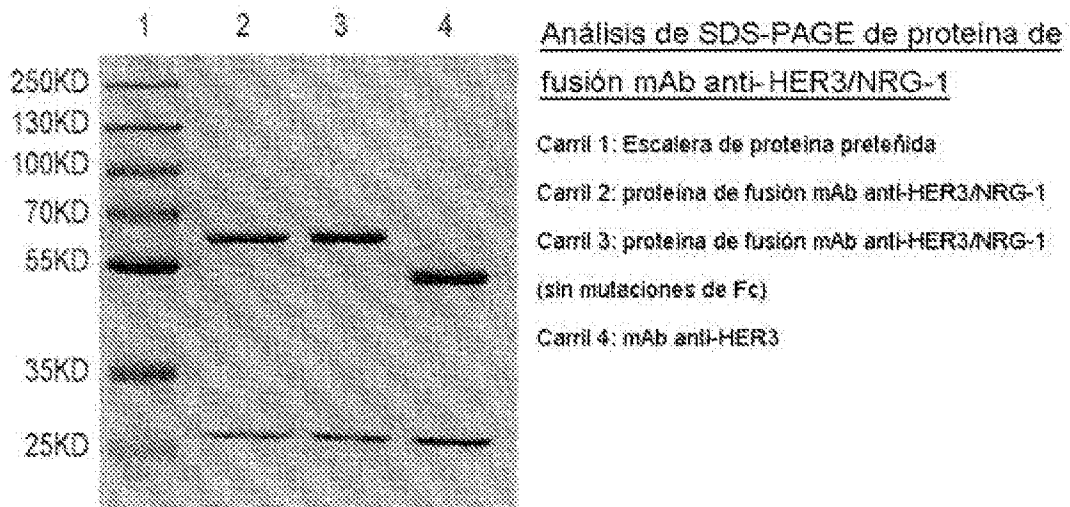


Figura 2B

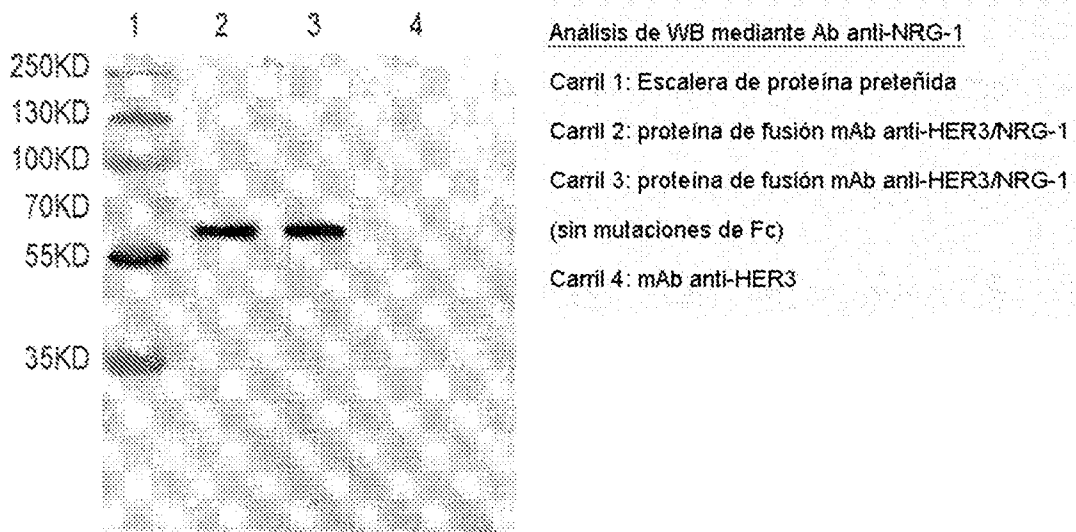


Figura 2C

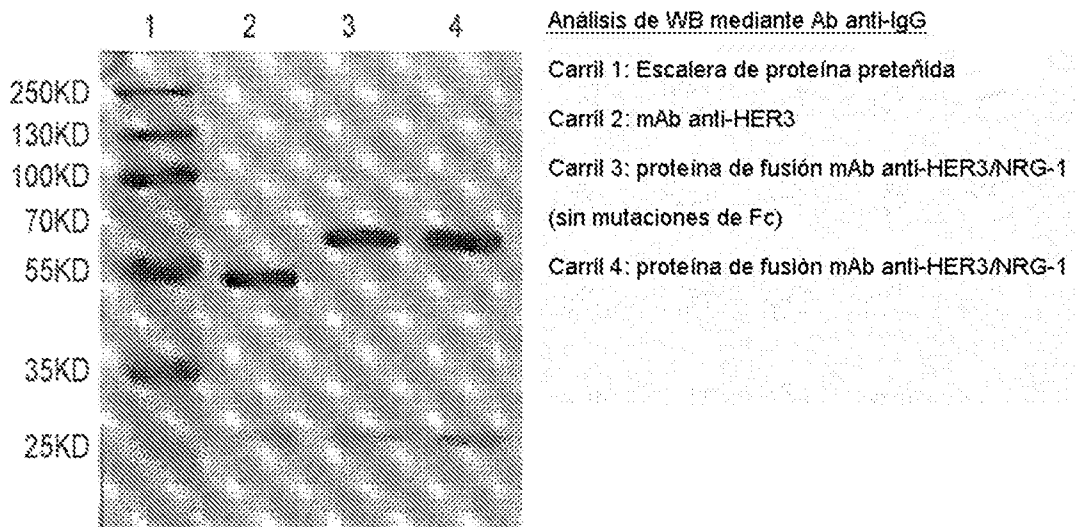
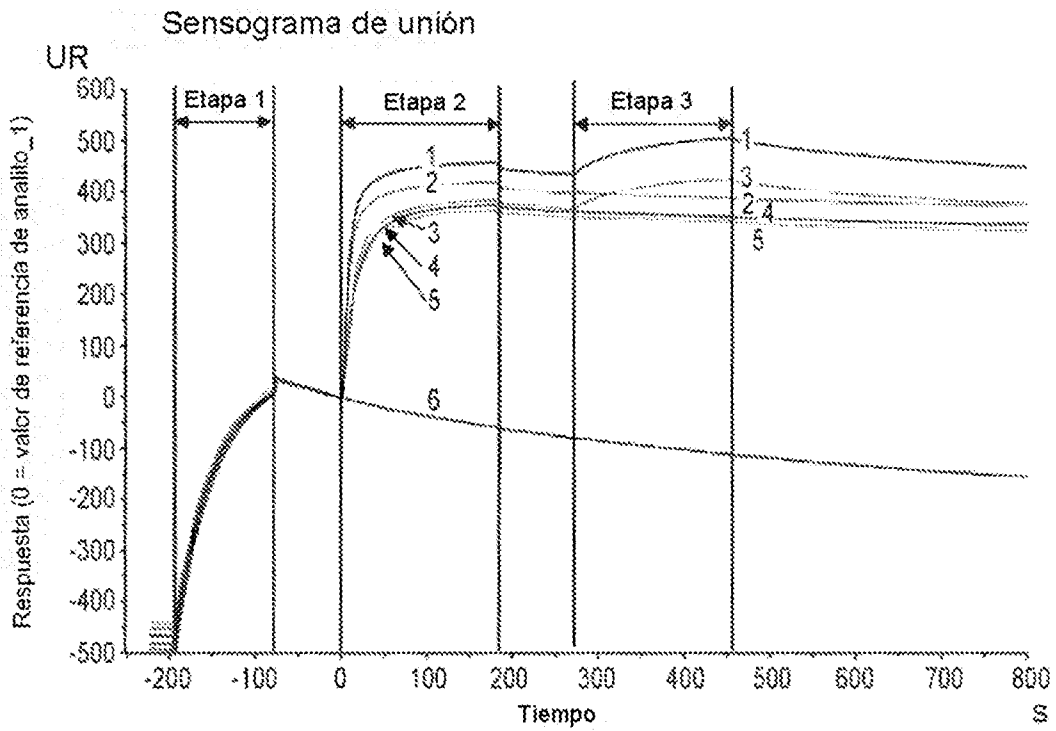


Figura 2D



Descripción de muestras

Curva	Muestra		
	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
1	HER3	fusión mAb anti-HER3/ NRG-1	mAb anti-NRG1
2	HER3	fusión mAb anti-HER3/ NRG-1	Amortiguador
3	HER3	fusión mAb anti-HER3/NRG-1 (sin mutaciones de Fc)	mAb anti-NRG1
4	HER3	mAb anti-HER3	mAb anti-NRG1
5	HER3	mAb anti-HER3	Amortiguador
6	HER3	Amortiguador	Amortiguador

Figura 3

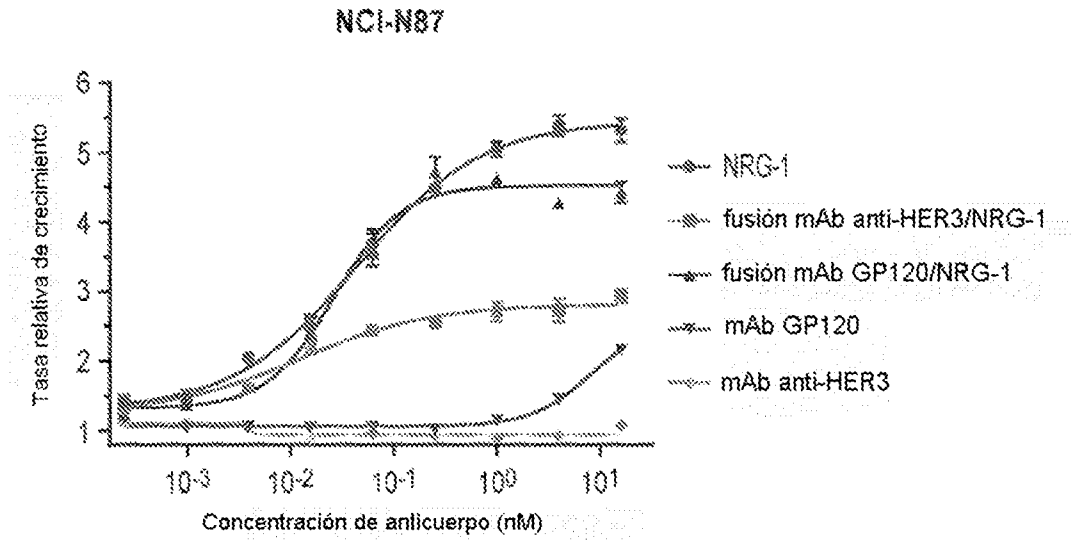


Figura 4A

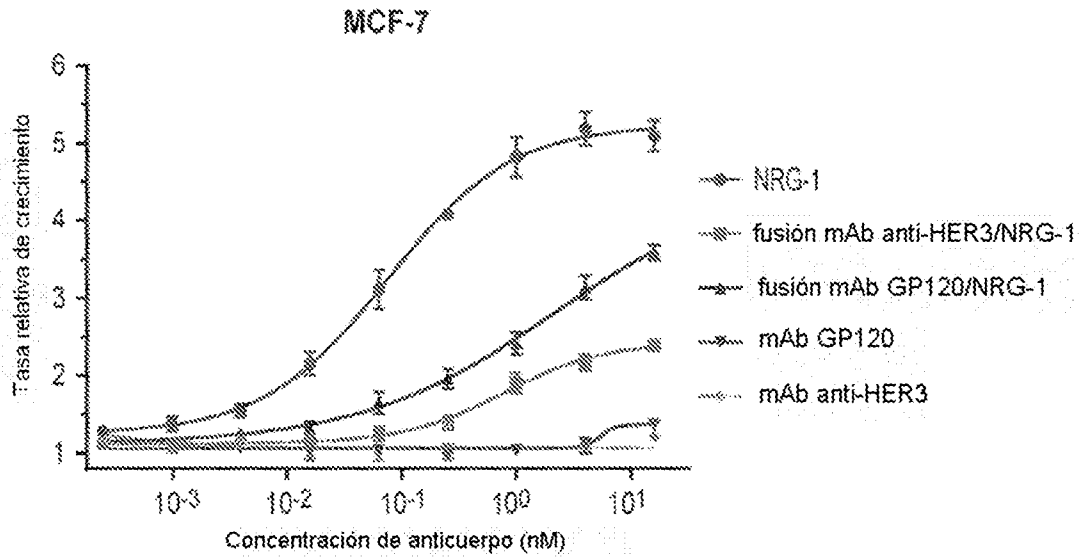


Figura 4B

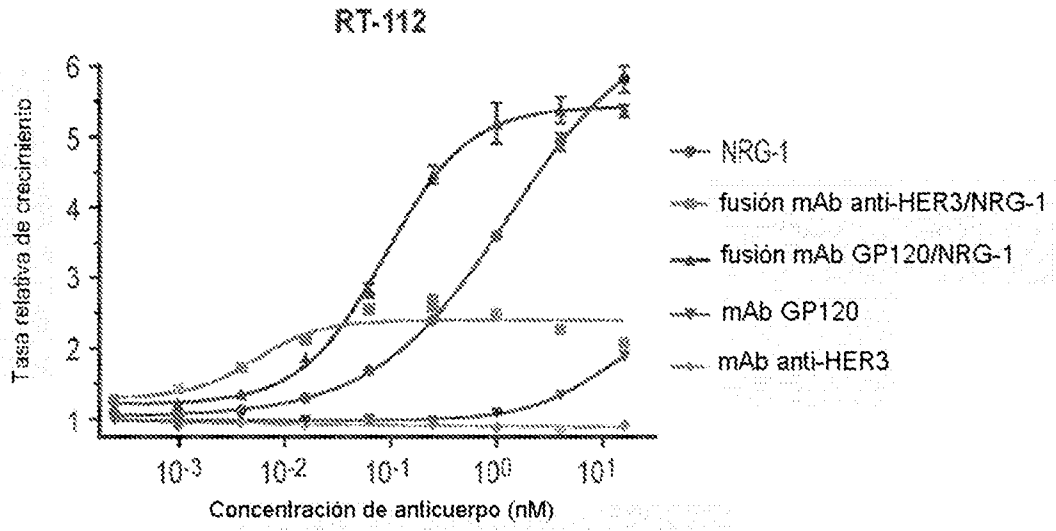


Figura 4C

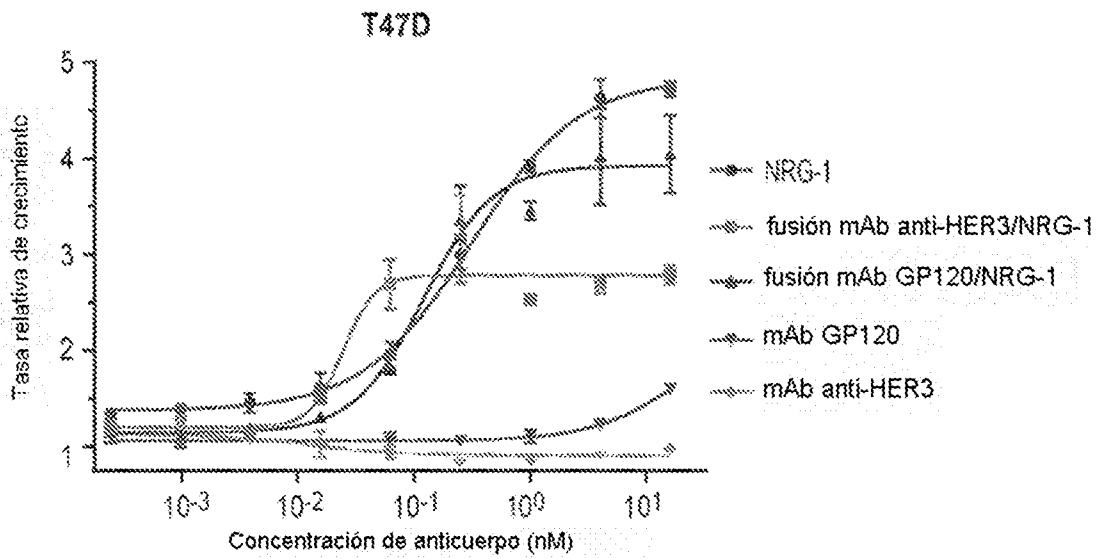


Figura 4D

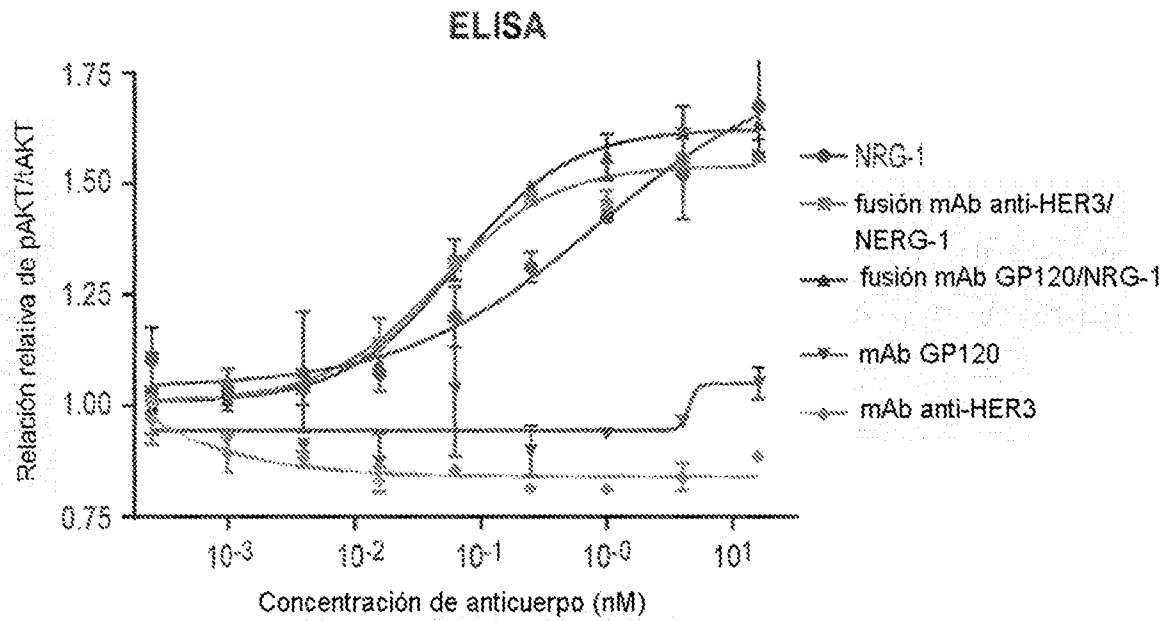


Figura 5A

Análisis de WB de fosforilación de AKT

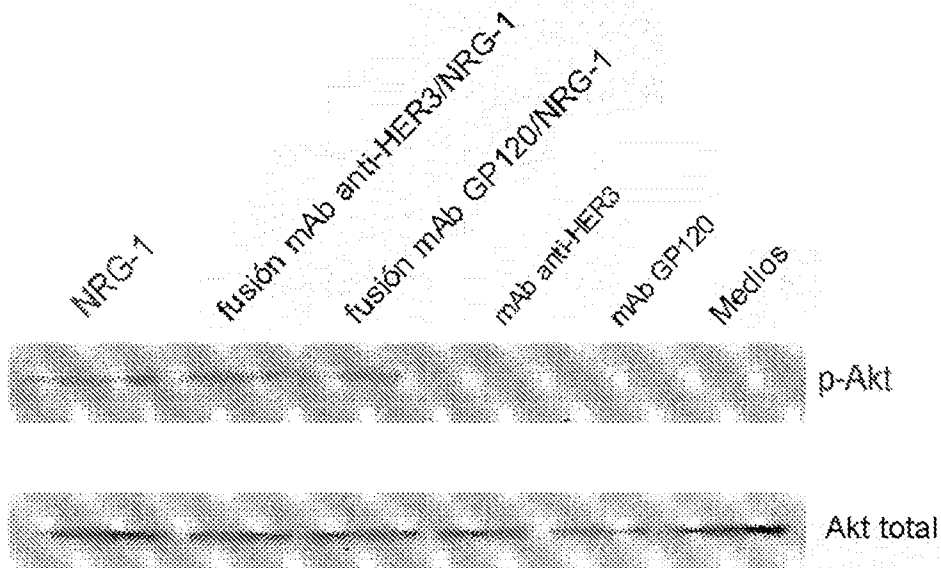


Figura 5B

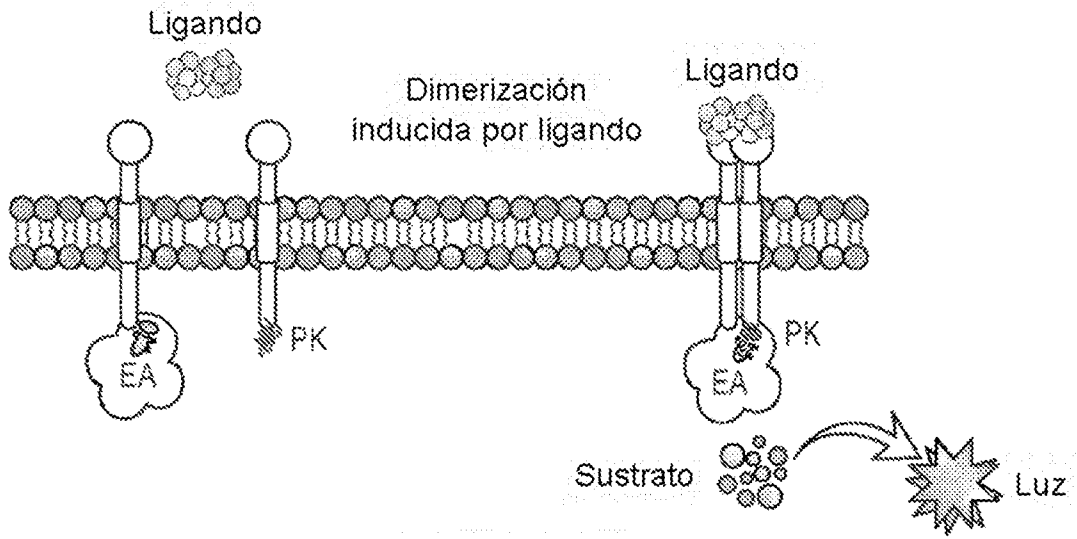


Figura 6A

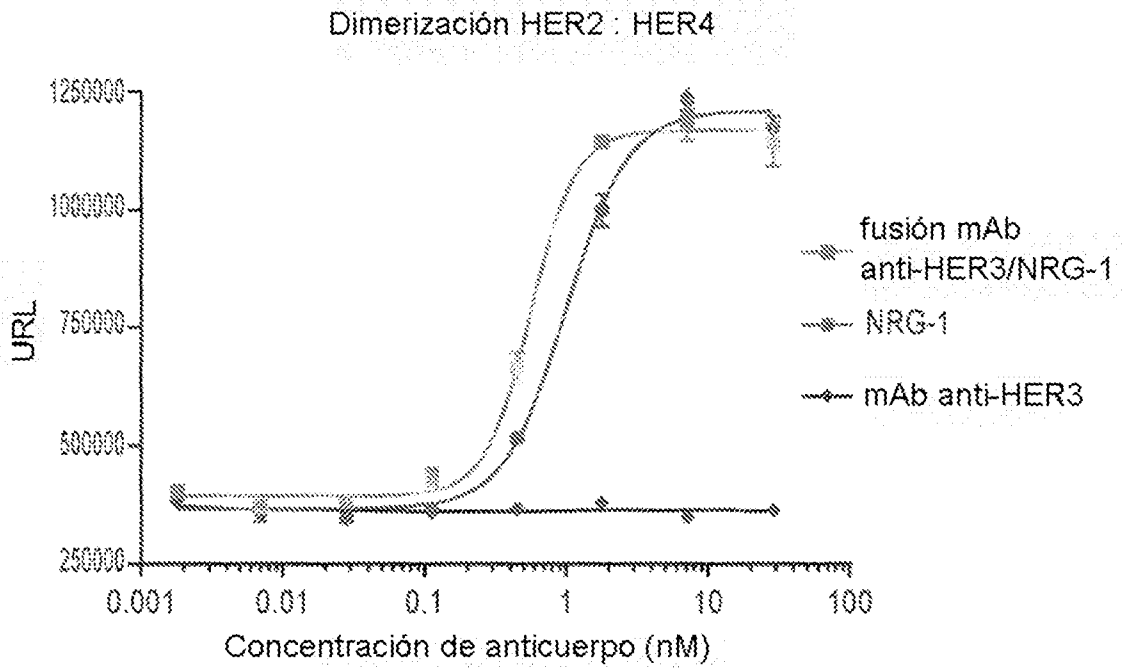


Figura 6B

Dimerización HER2 : HER3

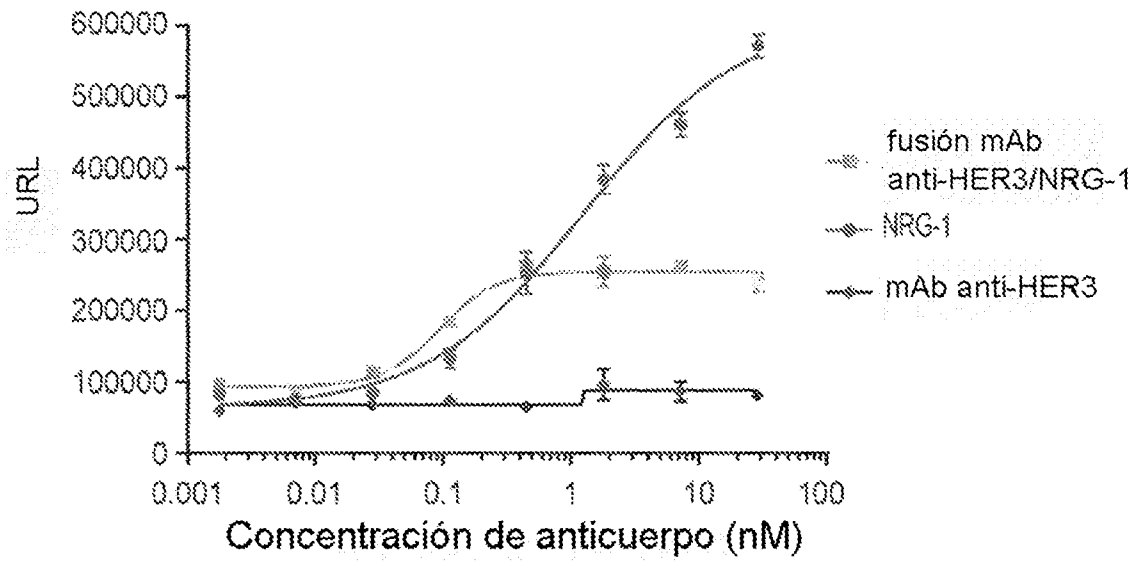


Figura 6C

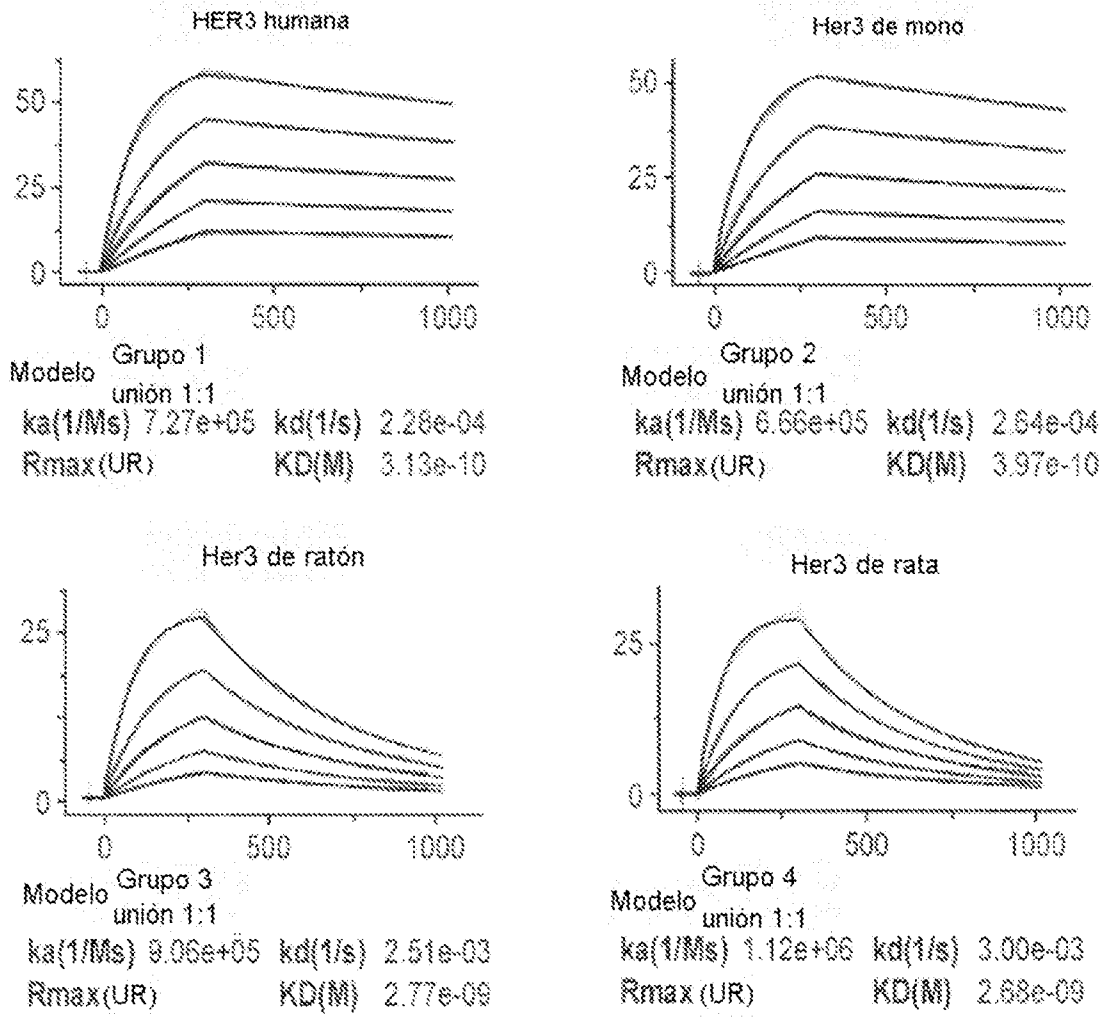


Figura 7

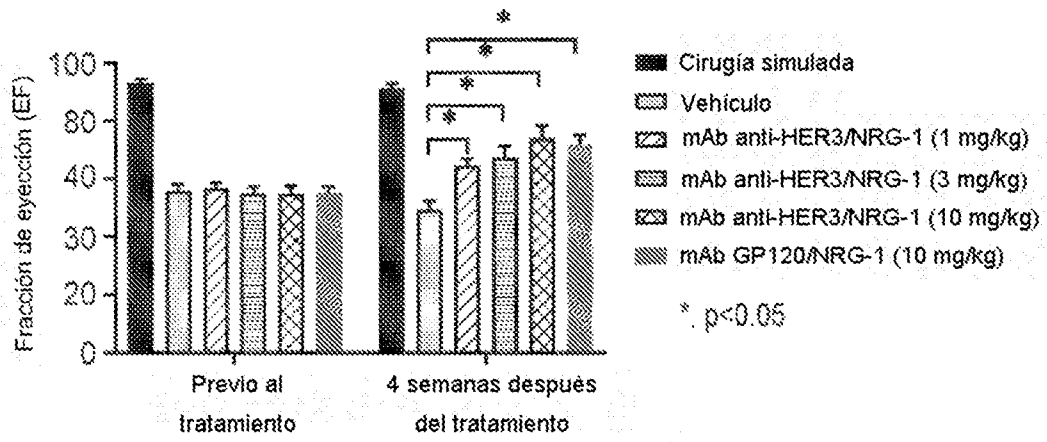


Figura 8

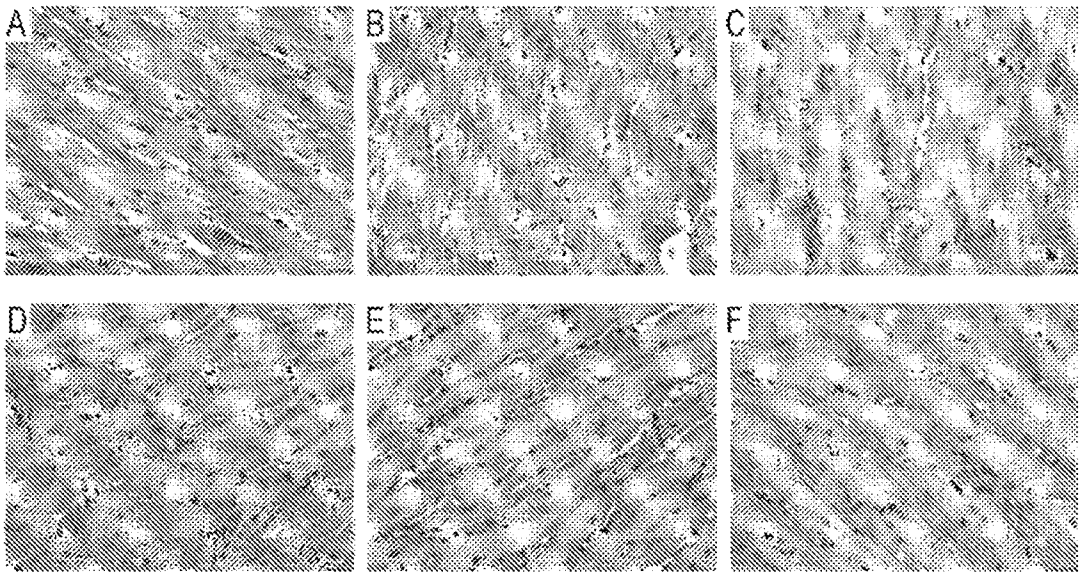


Figura 9

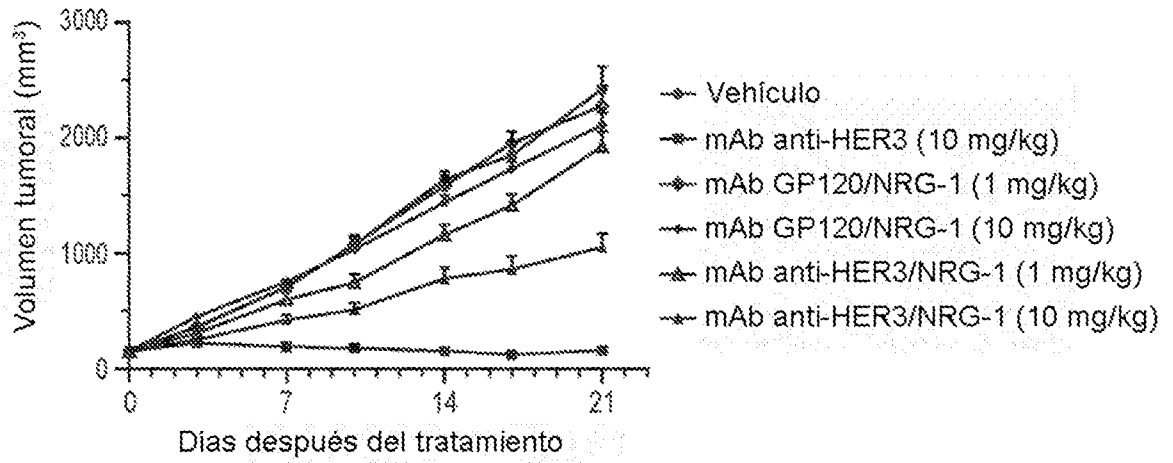


Figura 10

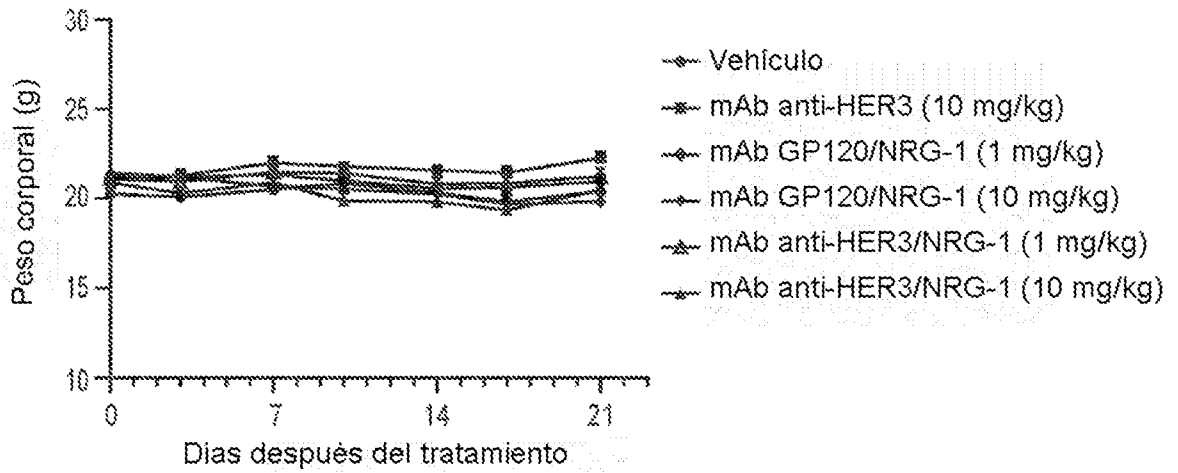


Figura 11

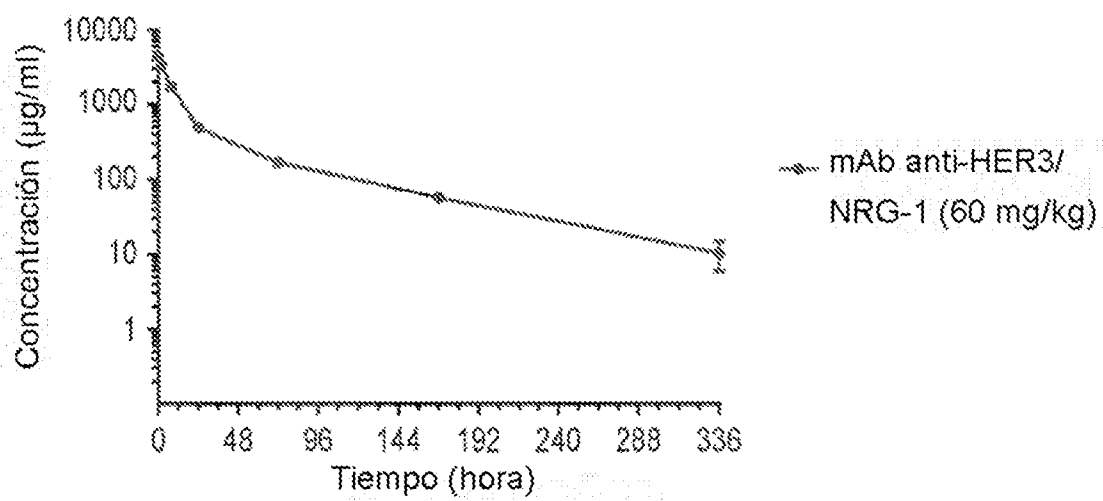


Figura 12