

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 274**

21 Número de solicitud: 201930121

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.02.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.08.2020

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**Avda. María Luisa s/n Pabellón de Perú
41013 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

**DELGADO MORA, Mario y
CAMPOS SALINAS, Jenny**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Cortistatina o un análogo de la misma como agente farmacéuticamente activo en forma latente**

57 Resumen:

Cortistatina o un análogo de la misma como agente farmacéuticamente activo en forma latente.

La semivida en sangre de péptidos endógenos tales como somatostatina y cortistatina es extremadamente corta, llegando apenas a pocos minutos (Skamene et al., Clin Endocrinol 1984, 20, 555-564). Por tanto, existe la necesidad de encontrar nuevos sistemas o composiciones que comprendan cortistatina o un análogo de la misma para el tratamiento de esas patologías en las que se expresan receptores de cortistatina específicos y aquellos receptores compartidos con otras moléculas tales como somatostatina (sstr1, sstr2, sstr3, sstr4 y/o sstr5) y/o ghrelina (GHSR), siendo además más estables en sangre que la cortistatina. La presente invención proporciona medios mejorados para proporcionar cortistatina o un análogo de la misma como agente farmacéuticamente activo en forma latente, más estable en sangre que la cortistatina, que libera cortistatina en un modo de liberación controlada.

ES 2 780 274 A1

DESCRIPCIÓN

**CORTISTATINA O UN ANÁLOGO DE LA MISMA COMO AGENTE
FARMACÉUTICAMENTE ACTIVO EN FORMA LATENTE**

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende un péptido asociado a latencia (LAP) y cortistatina o un análogo de la misma como agente farmacéuticamente activo, en la que el LAP y el agente farmacéuticamente activo se conectan mediante una secuencia de aminoácidos que comprende un sitio de escisión proteolítica.

Antecedentes de la invención

- 10 La presente invención se refiere al uso de proteínas, derivados de proteínas y constructos de ADN que confieren latencia a la cortistatina o un análogo de la misma como agente farmacéuticamente activo donde el agente farmacéuticamente activo se libera por la acción de un MMP. Tales productos son útiles en el tratamiento de fibrosis crónica, preferiblemente una
15 fibrosis crónica seleccionada de la lista que consiste en fibrosis hepática, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar y esclerodermia.

- La mayoría de citocinas y factores de crecimiento se expresan bajo estrictos mecanismos de control. Su expresión génica se regula mediante estímulos ambientales tales como infección, interacciones célula-célula, cambio en composición de matriz extracelular e interacciones con
20 moléculas de adhesión o mediante estimulación con otras citocinas.

- Además del control al nivel transcripcional y post-transcripcional, algunas citocinas no se liberan al medio a menos que una segunda señal active la célula. Un tercer nivel de regulación de actividad de citocinas se encuentra en moléculas que se secretan en forma latente y se
25 convierten en “activadas” liberando el resto de citocina donde tienen lugar los procesos de inflamación, curación de heridas y reparación de tejidos (Khalil N, Microbes and Infection, 1, 1255-1263 (1999). Respecto a esto último, el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ) ha recibido la mayor atención.

El TGFβ se sintetiza como citocina latente dimérica compuesta de una proteína asociada a latencia amino terminal (LAP) y la citocina de TGFβ activa en su extremo COOH terminal (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, M B y Roberts, A B, Springer-Verlag, 419-472 (1996); Roth-Eicchorn *et al.*, Hepatology, 28 1588-1596 (1998)).

- 5 El péptido precursor contiene un péptido señal (residuos 1-29) necesario para la secreción de proteínas y guiado de la molécula a través del aparato de Golgi para llegar a procesarse mediante escisión proteolítica y glicosilación. El dominio de LAP se separa de TGFβ mediante escisión proteolítica en las argininas (277-278).
- 10 El TGFβ maduro empieza en alanina 279. El LAP, además de proteger TGFβ, contiene residuos importantes necesarios para la interacción con otras moléculas. Recientemente se han asociado mutaciones en el dominio de LAP con la enfermedad de Camurati-Engelmann dominante autosómica (Janssens *et al.*, Nature Genetics, 26, 273-275 (2000). Las cisteínas 224 y 226 son importantes en el enlace disulfuro intermolecular entre dos LAP. Su mutación a
- 15 serina convierte a la molécula en “activa” (Sanderson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 92, 2572-2576 (1995); Brunner *et al.*, Mol. Endocrinol. 6, 1691-1700 (1992); Brunner *et al.*, J. Biol. Chem., 264, 13660-13664 (1989)). El motivo RGD (245-247) facilita la interacción con integrinas (Munger *et al.*, Mol. Biol. of the Cell, 9, 2627-2638 (1998); Derynck R, TIBS, 19, 548-553 (1994)). El ácido nucleico que codifica para TGFβ se describe en la patente
- 20 estadounidense n.º 5.801.231.

En la mayoría de tipos de células estudiados, incluyendo los de origen mesenquimal, epitelial y endotelial, TGFβ se secreta en forma latente que consiste en TGFβ y sus dímeros de propéptidos de péptidos asociado a latencia (LAP), unidos covalentemente a proteínas de

25 unión a TGFβ latente (LTBP). Las LTBP también se necesitan para la secreción y plegado de TGFβ (Miyazano *et al.*, EMBO J. 10, 1091-1101 (1991); Miyazano *et al.*, J. Biol. Chem. 267, 5668-5675 (1992); Eklov *et al.*, Cancer Res. 53, 3193-3197 (1993)). La cisteína 33 es importante para el puente disulfuro con la tercera repetición rica en 8 cisteínas de proteína de

30 modificación de LTBP mediante enzimas tales como trombospondina (Schultz *et al.*, The Journal of Biological Chemistry, 269, 26783-26788 (1994); Crawford *et al.*, Cell, 93, 1159-1170 (1998)), transglutaminasa (Nunes *et al.*, J. Cell, Biol. 136, 1151-1163 (1997); Kojima *et al.*, The Journal of Cell Biology, 121, 439-448 (1993)) y MMP9, MMP2 (Yu y Stamenkovic,

Genes y Dev, 14, 163-176 (2000)) podría liberar la porción activa de TGFβ del complejo latente.

5 Las citocinas son productos naturales que sirven como mediadores locales solubles de interacciones célula-célula. Tienen una variedad de acciones pleiotrópicas, algunas de las que pueden aprovecharse para fines terapéuticos. La selección como dianas de citocinas a tipos de células específicos usando scFv (Lode *et al.*, Pharmacol. Ther, 80, 277-292 (1998)) y vWF (Gordon *et al.*, Human Gene Therapy, 8, 1385-1394 (1997)) se ha enfocado por completo en el resto de citocina activo del complejo de citocina.

10

Las proteínas farmacológicamente activas u otros medicamentos basados en dichos agentes, que deben administrarse en concentraciones muy altas sistémicamente con el fin de alcanzar concentraciones biológicamente eficaces en el tejido que se selecciona como diana, tienden a dar origen a efectos sistémicos indeseables, por ejemplo, toxicidad, que limitan su uso y
15 eficacia.

Los principios que subyacen en la construcción de un sistema de este tipo para proporcionar latencia a agentes farmacéuticamente activos usando el LAP de TGFβ se describieron en el documento WO 02/055098. Los presentes inventores han desarrollado ahora medios
20 mejorados para proporcionar cortistatina o un análogo de la misma como agente farmacéuticamente activo en forma latente basándose en este sistema. Esto es particularmente importante en el caso de cortistatina por las siguientes razones.

La cortistatina (CST) es un péptido endógeno natural de 14 aminoácidos, descubierto en ratas
25 en 1996 (CST-14) [de Lecea *et al.*, Nature, 1996, 381, 242-245] y más tarde en 1997, encontrado en seres humanos como forma extendida de 17 aminoácidos (CST-17) [Fukusimi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1997, 232, 157-163]. La cortistatina, de hecho, existe en dos formas biológicamente activas ya que su precursor (prepro-CST) da origen a CST-14 y CST-29 en roedores y a CST-17 y CST-29 en seres humanos.

30

La cortistatina tiene una homología alta respecto a otro péptido endógeno, la somatostatina (SST), que está altamente conservado y se encuentra en mamíferos en forma de somatostatina-14 (SST-14) y somatostatina-28 (SST-28):

Secuencias de cortistatina y somatostatina

H2N-Pc[CKNFFWKTFSSC]K-OH

Cortistatina-14 (rata/ratón)

5

H2N-DRMPc[CRNFFWKTFSSC]K-OH

Cortistatina-17 (ser humano)

H2N-AGc[CKNFFWKTFSTSC]-OH

10 Somatostatina-14 (ser humano/rata/ratón)

De hecho, la cortistatina interactúa con los receptores de membrana acoplados a proteínas 5 G descritos para la somatostatina, sstr1-sstr5 [a] Spier *et al.*, Brain Research Reviews 2000, 33, 228-241; b) Patel *et al.*, Endocrinology 1994, 135, 2814-2817]. Pero la cortistatina no es la somatostatina [Gonzalez-Rey *et al.*, Mol. Cell. Endocrinol. 2008, 286 (1-2), 135-140] y, por tanto, además de su afinidad nanomolar por los receptores de somatostatina, la cortistatina también interactúa con el receptor de ghrelina (GHSR). Además, en la búsqueda de un receptor específico para la cortistatina, se describió el receptor huérfano MrgX2 como el primer receptor específico en humanos para cortistatina [Robas *et al.*, J. Biol. Chem. 2003, 278, 44400-44404]. Posteriormente, la ausencia de este receptor en células del sistema inmunitario y su alta afinidad por otros neuropéptidos, tales como proadrenomedulina, han hecho que hoy en día no se considere como receptor de cortistatina específico [van Hagen *et al.*, Mol. Cell. Endocrinol. 2008, 286(1-2), 141-147] y la caracterización de un receptor de cortistatina específico es un asunto que permanece sin resolver.

25

La actividad inmunomoduladora de la cortistatina se ha demostrado ampliamente en modelos experimentales de enfermedades que cursan con respuestas autoinmunitarias e inflamatorias tales como choque letal por endotoxinas, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide [a] Gonzalez-Rey *et al.*, J. Exp. Med. 2006, 203(3), 563-571; b) Gonzalez-Rey *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 2006, 103, 4228-4233; c) Gonzalez-Rey *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 2007, 66 (5), 582-588; d) documento WO 2007/082980 A1]. Dicha acción inmunoreguladora puede correlacionarse con su expresión en linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas y células del sistema inmunitario [a] Dalm V. A. *et al.*, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2003, 285, E344-353; b) Dalm V. A. *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003, 88, 270-276]. Se

ha revisado recientemente la expresión de cortistatina y sus receptores en el sistema inmunitario de seres humanos y patologías del sistema inmunitario [van Hagen *et al.*, Mol. Cell. Endocrinol. 2008, 286(1-2), 141-147].

5 En los estudios de investigación referenciados anteriormente que mostraban la eficacia de la cortistatina en enfermedades con componente inmunitario e inflamatorio, se usó CST-29. CST-29 es un péptido endógeno largo, de alta dificultad sintética y por tanto baja viabilidad industrial para su aplicación industrial en el sector farmacéutico. Su uso farmacéutico también presente un problema adicional: su baja estabilidad en suero.

10

Otras propuestas en estudio prueban la eficacia del péptido endógeno CST-17 combinado con el neuropéptido EI para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias [documento WO 2009/043523 A2], que presenta la ventaja de una dificultad sintética menor para su uso industrial. **Sin embargo, todavía posee la desventaja de tener una baja**
15 estabilidad en suero debido a su estructura nativa con L-aminoácidos.

15

Generalmente, los fármacos a base de péptidos son ventajosos porque los péptidos son intrínsecamente no tóxicos, su eficacia a dosis bajas asegura que no provocan efectos secundarios significativos comparados con otros fármacos a base de moléculas pequeñas o de anticuerpos, pero deben modificarse para mejorar su biodisponibilidad y semivida. La
 20 incorporación de aminoácidos no naturales en la secuencia natural es una de las estrategias conocidas en la técnica anterior para aumentar la estabilidad de un péptido endógeno. Por ejemplo, se han descrito modificaciones de somatostatina con aminoácidos halogenados, con p-cloro-Phe y pentafluoro-Phe en las posiciones 6, 7 y 11 [documento WO 2007/081792 A2;
 25 Meyers C. A. *et al.*, Digestion 1981, 21(1), 21-4]. También se han modificado las mismas posiciones 6, 7 y 11 de la somatostatina original con mesitilalanina y mesitilglicina, dando como resultado análogos de somatostatina que son más estables [documento WO 2010/128098 A1]. Sin embargo, estas modificaciones estabilizantes pueden comprometer la funcionalidad de la molécula original. Es el caso de la octreotida, un análogo de somatostatina
 30 de uso clínico que es mucho más estable que la molécula original, que conserva la unión al receptor sstr2 pero que pierde completamente su afinidad por los receptores sstr1 y sstr4. [Patel *et al.*, Endocrinology 1994, 135, 2814-2817].

30

La semivida en sangre de péptidos endógenos tales como somatostatina y cortistatina es extremadamente corta, llegando apenas a pocos minutos [Skamene *et al.*, Clin. Endocrinol. 1984, 20, 555-564]. Por tanto, existe la necesidad de encontrar nuevos sistemas o composiciones que comprendan cortistatina o un análogo de la misma para el tratamiento de esas patologías en las que se expresan receptores de cortistatina específicos y aquellos receptores compartidos con otras moléculas tales como somatostatina (sstr1, sstr2, sstr3, sstr4 y/o sstr5) y/o ghrelina (GHSR), siendo, además, más estables en sangre que la cortistatina. Esta es la razón por la que los presentes inventores han desarrollado ahora medios mejorados para proporcionar cortistatina o un análogo de la misma como agente farmacéuticamente activo en forma latente.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se describirá ahora a modo de ejemplo sólo con referencia a las figuras adjuntas en las que:

15

la figura 1 es una representación hipotética de LAP-GS-MMP-GS-CST29r y su plegado putativo e interacción con LTBP;

20

la figura 2 ilustra los experimentos realizados en los que se indujo esclerodermia mediante inyección intradérmica de bleomicina (3 veces por semana, durante cuatro semanas) en un área de 1 cm³ en la piel dorsal de ratones C57Bl/6. Los ratones se trataron localmente alrededor del área de la lesión con solución salina (grupo bleomicina), con cortistatina (grupo bleomicina+CST, 3 veces por semana, 10 ng cada vez), con vector de LAP vacío (Bleomicina+LAP, una vez a la semana, 20 pg) o con LAP-CST (Bleomicina+LAP-CST, una vez a la semana, 20 pg). Se usaron animales sin tratar previamente, sin bleomicina, como referencia de control basal. Después de cuatro semanas, se diseccionó el área de piel lesionada y se procesó para su análisis histológico usando tinción tricrómica de Mason. Se cuantificó el grosor de piel (desde epidermis hasta hipodermis) usando el programa Image J. Los depósitos fibróticos en la piel se tiñen de azul en secciones; y

30

la figura 3 ilustra los experimentos realizados en los que se indujo fibrosis pulmonar mediante inyección intratraqueal de bleomicina (50 µg/kg de peso corporal, disueltos en 50 µl de solución salina) en ratones C57Bl/6. Los ratones se trataron mediante inhalación nasal de

solución salina (grupo bleomicina+solución salina), cortistatina (grupo bleomicina+CST, 3 veces por semana, 10 ng cada vez), o LAP-CST (Bleomicina+LAP-CST, una vez a la semana, 20 pg). Después de 18 días, se diseccionaron los pulmones y se procesaron para su análisis histológico usando la tinción tricrómica de Mason y la tinción de rojo sirio. Se cuantificó la fibrosis pulmonar y el daño tisular usando el programa Image J y se puntuó usando un índice clínico establecido de desde 0 hasta 4 en modo ciego. La mortalidad provocada por fibrosis se muestra en esta figura.

Descripción de la invención

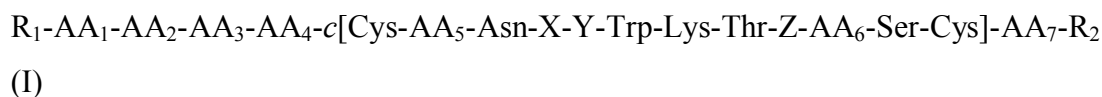
Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una proteína de fusión heteróloga que comprende (a) una proteína biológicamente activa, fusionada mediante (b) un sitio de escisión proteolítica con (c) un péptido asociado a latencia (LAP) que comprende un dominio precursor de TGF β , en la que dicha proteína biológicamente activa comprende una cortistatina o un análogo de la misma. Tal proteína de fusión puede aumentar significativamente la semivida en sangre de la cortistatina, ya que libera cortistatina de manera de liberación controlada.

La proteína de fusión que comprende un LAP, un sitio de escisión proteolítica y un agente farmacéuticamente activo pueden proporcionar activación específica de sitio del agente farmacéuticamente activo latente. El término “activación específica de sitio” tal como se usa en el presente documento quiere decir, en términos generales y sin limitarse a la retirada o reducción de latencia, conferido a un agente farmacéuticamente activo, mediante escisión específica de sitio en el sitio de escisión proteolítica.

Se espera que tenga lugar la escisión específica de sitio en el sitio de escisión proteolítica concomitantemente con la activación restaurada del agente farmacéuticamente activo.

El término “agente farmacéuticamente activo latente” tal como se usa en el presente documento se refiere a una cortistatina o un análogo de la misma que están latentes debido a su asociación con LAP y un sitio de escisión proteolítica. Específicamente, la cortistatina o un análogo de la misma pueden estar latentes en virtud de su fusión con un sitio de escisión proteolítica asociado a LAP para formar una proteína de fusión latente.

Cabe señalar que un análogo de cortistatina se refiere a cualquier péptido con acción antiinflamatoria y/o inmunoreguladora, similar a la del péptido natural. Ciertas modificaciones con aminoácidos no naturales, tales como mesitilalanina y/o dihalogenofenilalaninas, más la incorporación de ácidos grasos o PEGilaciones, conservan e incluso mejoran la acción antiinflamatoria y anti-autoinmunitaria de la molécula natural *in vitro* e *in vivo*. Además, el principal beneficio de los análogos de cortistatina es que la síntesis de los análogos de cortistatina es viable económicamente (con secuencias preferiblemente de 13 a 17 aminoácidos), un aspecto que garantiza su utilidad en la industria farmacéutica. En particular, se definen análogos de cortistatinas útiles en la presente invención mediante la fórmula (I),



sus estereoisómeros, mezclas de los mismos y/o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que

- AA₁ es Asp o un enlace
- AA₂ es Arg o un enlace
- AA₃ es Met o Ala o un enlace
- AA₄ es Pro o Gly
- AA₅ es Lys o Arg
- AA₆ es Ser o Thr
- AA₇ es Lys o un enlace
- X, Y, Z son los aminoácidos Phe, Phg, Msa, 3,4,5-trimetilfenilalanina, Msg, 3,4,5-trimetilfenilglicina y/o una dihalogenofenilalanina, diW-Phe;
- W se selecciona del grupo que consiste en F, Cl, Br e I;
- R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, un grupo alifático sustituido o no sustituido no cíclico, aliciclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, un polímero derivado de polietilenglicol, un agente quelante y R₅—CO—;
- R₂ se selecciona del grupo que consiste en —NR₃R₄, —OR₃ y —SR₃;

- R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, un grupo alifático sustituido o no sustituido no cíclico, aliciclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y aralquilo sustituido o no sustituido y un polímero;
- 5 • R₅ se selecciona del grupo que consiste en H, un grupo alifático sustituido o no sustituido no cíclico, aliciclilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido;
- y con la condición de que:
 - 10 ○ Al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es Msa, 3,4,5-trimetilfenilalanina, Msg, 3,4,5-trimetilfenilglicina y/o una dihalogenofenilalanina, diW-Phe;
 - Si AA₁ y AA₂ son enlaces, AA₃ es Ala, AA₄ es Gly, AA₅ es Lys, AA₆ es Thr y AA₇ es un enlace, entonces al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es una dihalogenofenilalanina, diW-Phe.

15 En una realización preferida, al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es una dihalogenofenilalanina, diW-Phe. Preferiblemente, W es flúor. Más preferiblemente la dihalogenofenilalanina es 3,5-difluorofenilalanina (Dfp).

En una realización preferida, AA₄ es Pro. En una realización más preferida, AA₃ es Met o un enlace y AA₄ es Pro. Preferiblemente, al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es Msa y/o
 20 3,5-difluorofenilalanina (Dfp).

Los grupos R₁ y R₂ están unidos a los extremos amino-terminal (N-terminal) y carboxi-terminal (C-terminal) de las secuencias de péptido respectivamente, y pueden ser aminoácidos.

Según una realización preferida de esta invención, R₁ se selecciona del grupo que consiste en
 25 H, un polímero derivado de polietilenglicol y R₅—CO—, en la que R₅ se selecciona del grupo que consiste en radical alquilo C₁-C₂₄ sustituido o no sustituido, alquenilo C₂-C₂₄ sustituido o no sustituido, alquinilo C₂-C₂₄ sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃-C₂₄ sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C₅-C₂₄ sustituido o no sustituido, cicloalquinilo C₈-C₂₄ sustituido o no sustituido, arilo C₆-C₃₀ sustituido o no sustituido, aralquilo C₇-C₂₄ sustituido o no
 30 sustituido, anillo heterociclilo sustituido o no sustituido de 3-10 miembros, y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 24 átomos de carbono y 1 a 3 átomos distintos de carbono

donde la cadena de alquilo es de 1 a 6 átomos de carbono. Más preferiblemente, R_1 se selecciona del grupo que consiste en H, acetilo, terc-butanoilo, prenilo, hexanoilo, 2-metilhexanoilo, ciclohexanocarboxilo, octanoilo, decanoilo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, behenilo, oleoilo y linoleoilo. Incluso más preferiblemente, R_1 es H, acetilo, hexanoilo, octanoilo, lauroilo, miristoilo o palmitoilo.

Según otra realización preferida, R_1 se selecciona de un polímero derivado de polietilenglicol con un peso molecular comprendido entre 200 y 35000 Daltons.

Según otra realización preferida, R_2 es $—NR_3R_4$, $—OR_3$ o $—SR_3$, en la que R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_{24} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{24} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{24} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{24} sustituido o no sustituido, cicloalquenilo C_5-C_{24} sustituido o no sustituido, cicloalquinilo C_8-C_{24} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{30} sustituido o no sustituido, aralquilo C_7-C_{24} sustituido o no sustituido, anillo heterociclilo sustituido o no sustituido de 3-10 miembros, y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 24 átomos de carbono y 1 a 3 átomos distintos de carbono, en el que la cadena de alquilo es de 1 a 6 átomos de carbono y un polímero derivado de polietilenglicol. Opcionalmente, R_3 y R_4 puede unirse mediante un enlace carbono-carbono saturado o insaturado, formando un ciclo con el átomo de nitrógeno. Más preferiblemente R_2 es $—NR_3R_4$ o $—OR_3$, donde R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_{24} sustituido o no sustituido, alquenilo C_2-C_{24} sustituido o no sustituido, alquinilo C_2-C_{24} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_3-C_{10} sustituido o no sustituido, arilo C_6-C_{15} sustituido o no sustituido, anillo de heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 3 a 10 miembros y una cadena de alquilo de 1 a 6 átomos de carbono y un polímero derivado de polietilenglicol. Más preferiblemente R_3 y R_4 se seleccionan del grupo que consiste en H, metilo, etilo, hexilo, dodecilo o hexadecilo. Incluso más preferiblemente R_3 es H y R_4 se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, etilo, hexilo, dodecilo o hexadecilo. Según una realización incluso más preferida, R_2 se selecciona de $—OH$ y $—NH_2$.

Según una realización preferida de esta invención, R_1 o R_2 es un agente quelante que está opcionalmente complejoado, con un elemento detectable o radioterápico. Un agente quelante se refiere a un grupo que puede formar complejos de coordinación con el elemento detectable o radioterápico. Preferiblemente, el agente quelante es un grupo que puede formar complejos con iones metálicos, más preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en DOTA,

DTPA, TETA o derivados de los mismos. El agente quelante puede unirse directamente o mediante un conector.

5 Elemento detectable se refiere a cualquier elemento radioactivo, fluorescente o generador de imágenes de resonancia magnética de contraste positivo, preferiblemente un ión metálico, que muestra una propiedad detectable en una técnica de diagnóstico *in vivo*. Se entiende por elemento radioterápico cualquier elemento que emite radiación α , radiación β o radiación γ .

En una realización específica, más particularmente, análogos de cortistatinas útiles en la presente invención se seleccionan del grupo de secuencias descritas a continuación:

Ala-Gly-c[-Cys-Lys-Asn-Phe-Dfp-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]

Ala-Gly-c[Cys-Lys-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]

Ala-Gly-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Dfp-Thr-Ser-Cys]

Ala-Gly-c[Cys-Arg-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Dfp-Ser-Ser-Cys]

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Msa-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Dfp-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Msa-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Arg-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Msa-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Msa-Ser-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Dfp-Thr-Ser-Cys]

Met-Pro-c[Cys-Arg-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Ser-Ser-Cys]-Lys

Asp-Arg-Met-Pro-c[Cys-Arg-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Asp-Arg-Met-Pro-c[Cys-Arg-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

El experto en la técnica entenderá que las secuencias de aminoácidos mencionadas en esta invención pueden modificarse químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que sean fisiológicamente relevantes, tales como fosforilación, acetilación, amidación, 5 PEGilación, n-octanoilación o palmitoilación, entre otras.

Los compuestos de esta invención pueden existir como estereoisómeros o mezclas de estereoisómeros; por ejemplo, los aminoácidos que los forman pueden tener una configuración L-, D-, o ser racémicos independientemente entre sí. Por tanto, es posible obtener mezclas isoméricas, así como mezclas racémicas o mezclas diastereoméricas, o 10 diastereómeros o enantiómeros puros, dependiendo del número de carbonos asimétricos y de qué isómeros o mezclas isoméricas están presentes. Las estructuras preferidas de los péptidos de la invención son isómeros puros, es decir un único enantiómero o diastereómero.

Por ejemplo, a menos que se indique de otro modo, se entiende que el aminoácido es L o D, o mezclas de los mismos, o bien racémico o bien no racémico. Los procedimientos de 15 preparación descritos en este documento permiten al experto en la técnica obtener cada uno de los estereoisómeros del compuesto de la invención eligiendo el aminoácido con la configuración adecuada. Por ejemplo, el aminoácido Trp puede ser L-Trp o D-Trp.

Más preferiblemente, los compuestos incluidos en la fórmula (I) se seleccionan del grupo que consiste en:

ES 2 780 274 A1

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Dfp-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Dfp-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Dfp-L-Ser-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Octanoyl-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Msa-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Octanoyl-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Msa-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Ac-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Dfp-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-NH₂

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Msa-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Msa-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Msa-L-Ser-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-NH₂

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

Octanoyl-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Dfp-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Ser-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Asp-L-Arg-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Myristoyl-L-Asp-L-Arg-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-Asp-L-Arg-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-

L-Cys]-L-Lys-OH

Por otro lado, el término “proteína de fusión” en este texto quiere decir, en términos generales, una o más proteínas unidas juntas por medios químicos, incluyendo enlaces de hidrógeno o puentes salinos, o mediante enlaces peptídicos a través de síntesis de proteína o ambos.

El péptido asociado a latencia (LAP) de la presente invención puede incluir, pero no está limitado a, la secuencia codificante para el dominio precursor de TGFβ o una secuencia que es sustancialmente idéntica a ella.

“Identidad” tal como se conoce en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias de polipéptido o dos o más secuencias de polinucleótido, tal como se determina comparando las secuencias. En la técnica, identidad también quiere decir el grado de parentesco de secuencia (homología) entre secuencias de polipéptido o polinucleótido, tal como pueda ser el caso, tal como se determina mediante el apareamiento entre hebras de tales secuencias. Mientras existan varios métodos para medir la identidad entre secuencias de dos polipéptidos o de dos polinucleótidos, los métodos empleados comúnmente para determinar la identidad están codificados en programas informáticos. Los programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, paquete de

programas GCG (Devereux, *et al.*, Nucleic Acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul *et al.*, J. Molec. Biol. 215, 403 (1990).

El LAP de la presente invención puede comprender el dominio precursor de TGF β , por ejemplo, el péptido precursor de TGF β -1, 2 ó 3 (de ser humano) (Derynck *et al.*, Nature, 316, 701-705 (1985); De Martin *et al.*, EMBO J. 6 3673-3677 (1987); Hanks *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 79-82 (1988); Derynck *et al.*, EMBO J. 7, 3737-3743 (1988); Ten Dyke *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 85, 4715-4719 (1988)) TGF β -4 (de pollo) (Jakowlew *et al.*, Mol. Endocrinol. 2, 1186-1195 (1988)) o TGF β -5 (de *Xenopus*) (Kondaiah *et al.*, J. Biol. Chem. 265, 1089-1093 (1990)). El término “dominio precursor” se define como una secuencia que codifica para un péptido precursor que no incluye la secuencia que codifica para la proteína madura, véase secuencia SEQ ID NO 1 a continuación

SEQ ID NO 1:

15

MPPSGLRLLPLLLPLLWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKKRRIEAIKRGQILSKLRL
ASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVET
HNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVKVEQHVELYQKY
SNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSCDSRDNT
LQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLMATPLERAQHLQS

En cualquier proporción, las secuencias de aminoácidos de los dominios precursores de TGF β 1, 2, 3, 4 y 5 se conocen bien (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, M B y Roberts, A B, Springer-Verlag, Capítulo 8, 422 (1996)), véase también el documento US8357515B2.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del LAP tiene al menos el 50% de identidad, usando los parámetros por defecto del programa informático BLAST (Atschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990) proporcionado por HGMP (proyecto de mapeo del genoma humano), a nivel de aminoácidos, respecto al dominio precursor de TGF β 1, 2, 3, 4 o 5 (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, M B y Roberts, A B, Springer-Verlag, Capítulo 8, 422 (1996)). Más preferiblemente, el LAP puede tener al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90% y todavía más preferiblemente el 95% (todavía más

preferiblemente al menos el 99%) de identidad, a nivel de aminoácidos o ácidos nucleicos, respecto al dominio precursor de SEQ ID NO 1 que comprende residuos Met1-Ser273.

5 El LAP puede comprender el LAP de TGF β 1, 2, 3, 4 o 5 (Roberts y Sporn, Peptide Growth Factors and their Receptors: Sporn, M B y Roberts, A B, Springer-Verlag, Capítulo 8, 422 (1996)).

El LAP puede contener al menos dos, por ejemplo, al menos 4, 6, 8, 10 o 20 residuos de cisteína para la formación de enlaces disulfuro.

10

El LAP puede proporcionar una “cubierta” protectora alrededor del agente farmacéuticamente activo de ese modo apantallándolo e impidiendo, o previniendo, su interacción con otras moléculas en la superficie celular o moléculas importantes para su actividad.

15 El LAP también puede comprender una secuencia que tenga al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de identidad con una secuencia de LAP de SEQ ID NO 1, usando los parámetros por defecto del programa informático BLAST proporcionado por HGMP.

20 El sitio de escisión proteolítica puede comprender cualquier sitio de escisión específico que se puede escindir mediante metaloproteinasas de matriz (MMP), también conocidas como matricinas, que son endopeptidasas que contienen cinc dependientes de calcio. En particular, el sitio de escisión proteolítica es un péptido señal putativo para escisión específica con cualquiera, incluyendo MMP1, MMP2 o MMP9 (PLGLWA), preferiblemente flanqueado por
25 dos secuencias de aminoácidos hidrófilos (GGGGS y GGGGSAAA) que actúan como conectores flexibles y facilitan la entrada de la enzima MMP. Más particularmente, el sitio de escisión proteolítica tiene la siguiente SEQ ID NO 2, o una secuencia que tiene al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO 2, usando los parámetros por defecto del programa informático BLAST proporcionado
30 por HGMP, a ello, y es susceptible de escindirse mediante metaloproteinasas de matriz (MMP):

SEQ ID NO 2:

PLGLWA.

5 Tal como ya se ha mencionado, la presente invención puede además proporcionar
opcionalmente un péptido “conector”. Preferiblemente, el péptido conector está conectado a la
secuencia de aminoácidos del sitio de escisión proteolítica. El péptido conector puede
proporcionarse en el extremo C terminal o N terminal de la secuencia de aminoácidos que
10 codifica para el sitio de escisión proteolítica. Preferiblemente, el péptido conector es continuo
con la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión proteolítica. El péptido conector puede
comprender la secuencia de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO:3) o un multímero de la
misma (por ejemplo un dímero, un trímero o un tetramero), un conector adecuado puede ser
(GGGGS) (SEQ ID NO:3), o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 50%, el
15 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de identidad, usando los parámetros por
defecto del programa informático BLAST proporcionado por HGMP para ello.

El término “péptido conector” pretende definir cualquier secuencia de residuos de aminoácido
que preferiblemente proporcionan una región hidrófila cuando una proteína expresada los
contiene. Una región hidrófila de este tipo puede facilitar la escisión mediante una enzima en
20 el sitio de escisión proteolítica.

El término “latencia”, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a un efecto
apantallante que puede impedir la interacción entre la proteína de fusión y otras moléculas en
la superficie celular. Alternativamente el término latencia puede usarse para describir una
25 reducción en la actividad (hasta de e incluyendo ablación de actividad) de una molécula/ un
agente asociado con la proteína de fusión. El término latencia puede también referirse a un
efecto estabilizante de la proteína de fusión. El efecto puede ser total o parcial, donde un
efecto parcial es suficiente para alcanzar la latencia del agente activo.

30 En una realización particular preferida, la proteína de fusión es SEQ ID NO 4:

SEQ ID NO 4:

MPPSGLRLLPLLLPLLWLLVLTTPGRPAAGLSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRL
 ASPPSQGEVPPGPLPEAVLALYNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVET
 HNEIYDKFKQSTHSIYMFFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRLKLVKVEQHVELYQKY
 SNNSWRYLSNRL LAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGIEIEGFRLSAHCSCDSRDNT
 LQVDINGFTTGRRGDLATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSEFGGGGSPGLWAGG
 GGSAAAQERPPLQPPHRDKKPKCNFFWKTFSS

o una secuencia que tiene al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99%
 de identidad con la secuencia de SEQ ID NO 4, usando los parámetros por defecto del
 5 programa informático BLAST proporcionado por HGMP.

La invención proporciona además un ácido nucleico que codifica para la proteína de fusión
 del primer aspecto de la invención o de cualquiera de sus realizaciones preferidas. Un
 segundo aspecto de la invención proporciona un constructo de ácido nucleico que comprende
 10 una primera secuencia de ácido nucleico que codifica para el agente farmacéuticamente
 activo, una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica para un LAP, en el que se
 proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica para un sitio de escisión proteolítica
 entre la primera y segunda secuencias de ácido nucleico.

15 El término “constructo de ácido nucleico” generalmente se refiere a cualquier longitud de
 ácido nucleico que puede ser ADN, ADNc o ARN tal como ARNm obtenido mediante
 clonación o producido mediante síntesis química. El ADN puede ser mono o bicatenario. El
 ADN monocatenario puede ser la cadena de sentido de codificación, o puede ser la cadena de
 no codificación o antisentido. Para su uso terapéutico, el constructo de ácido nucleico está
 20 preferiblemente en forma de poder expresarse en el sujeto a tratar.

El constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención puede estar en forma de
 un vector, por ejemplo, un vector de expresión, y puede incluir, entre otros, vectores
 cromosómicos, episomiales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de
 25 plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levaduras, de
 elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levaduras, de virus tales como
 baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar,
 virus de pseudorabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales
 como los derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos, tales como

cósmidos y fagémidos. Generalmente, cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar ácido nucleico para expresar un polipéptido en un huésped, puede usarse para la expresión a este respecto.

- 5 La invención proporciona además cortistatina o un análogo de la misma codificados por el constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, opcionalmente en asociación con proteína de unión a TGF β latente (LTBP) descrita en el presente documento.

10 El constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención incluye preferiblemente un promotor u otra secuencia reguladora que controla la expresión del ácido nucleico. Se han identificado promotores y otras secuencias reguladoras que controlan la expresión de un ácido nucleico y se conocen en la técnica. El experto en la técnica observará que puede no ser necesario utilizar el promotor u otra secuencia reguladora completos. Sólo puede requerirse el elemento regulador esencial mínimo y, de hecho, tales elementos pueden usarse para construir
15 secuencias quiméricas u otros promotores. El requisito esencial es, por supuesto, retener la especificidad temporal y/o tisular. El promotor puede ser cualquier promotor conocido adecuado, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano, el promotor temprano inmediato de CMV, la timidinacinasasa de HSV, los promotores tempranos y tardíos de SV40 o los promotores de LTR retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous
20 (RSV) y promotores de metalotionina tales como el promotor de metalotionina-I de ratón. El promotor puede comprender el mínimo comprendido para actividad de promotor (tal como elementos de TATA sin elementos potenciadores) por ejemplo, la mínima secuencia del promotor de CMV.

- 25 Preferiblemente, el promotor es contiguo a la primera y/o segunda secuencia de ácido nucleico.

Tal como se declara en el presente documento, el constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención puede estar en forma de un vector. Frecuentemente, los vectores
30 incluyen uno o más marcadores de expresión que permiten la selección de células transfectadas (o transformadas) con ellos, y preferiblemente, para permitir una selección de células que contienen vectores que incorporan ADN heterólogo. Generalmente estará presente una señal adecuada de iniciación y de terminación.

Una realización de la invención se refiere a una célula que comprende el constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención. La célula puede denominarse una célula “huésped”, que es útil para la manipulación del ácido nucleico, incluyendo clonación. Alternativamente, la célula puede ser una célula en la cual obtener la expresión del ácido nucleico. Los ejemplos representativos de células huésped apropiadas para la expresión del constructo de ácido nucleico de la invención incluyen células de empaquetamiento de virus que permiten la encapsulación del ácido nucleico en un vector viral; células bacterianas, tales como *Streptococci*, *Staphilococci*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus Subtilis*; células unicelulares, tales como células de levaduras, por ejemplo, células de *Saccharomyces Cerevisiae* y *Aspergillus*; células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, células animales tales como CHO, COS, C127, 3T3, PHK.293, y células de melanoma de Bowes y otras células humanas adecuadas; y células vegetales por ejemplo *Arabidopsis thaliana*.

La inducción de un vector de expresión en la célula huésped puede verse afectada por la transfección mediante fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción biolística, infección u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Segunda Edición, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, N.Y. (1989).

Pueden expresarse proteínas maduras en células huésped, incluyendo células de mamíferos tales como células CHO, levaduras, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. Pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas usando ARN derivados del constructo de ácido nucleico del tercer aspecto de la presente invención. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Segunda Edición, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, N.Y. (1989) describen vectores de expresión y clonación apropiados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas.

Pueden recuperarse y purificarse proteínas a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos que incluyen la precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía

con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatito, cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía con lectina y/o heparina. Para terapia, el constructo de ácido nucleico, por ejemplo en forma de un vector recombinante, puede purificarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como
5 mediante cromatografía en columna tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Segunda Edición, Coldspring Harbor Laboratory Press, Coldspring Harbor, N.Y. (1989).

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición según el primer
10 aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de fibrosis crónica, preferiblemente seleccionada de la lista que consiste en fibrosis hepática, fibrosis dérmica, fibrosis idiopática, fibrosis pulmonar y esclerodermia. Por tanto, este aspecto de la invención se extiende a e incluye un método para el tratamiento de fibrosis crónica, preferiblemente seleccionada de la lista que consiste en fibrosis hepática, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar y esclerodermia,
15 que comprende la administración a un sujeto de una composición que comprende una proteína de fusión que comprende un péptido asociado a latencia (LAP) conectado mediante un sitio de escisión proteolítica al agente farmacéuticamente activo.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico según el
20 segundo aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de fibrosis crónica, preferiblemente seleccionada de la lista que consiste en fibrosis hepática, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar y esclerodermia. Por tanto, este aspecto se extiende a e incluye un método para el tratamiento de fibrosis crónica, preferiblemente seleccionada de la lista que consiste en fibrosis hepática, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar y esclerodermia, que comprende la
25 administración a un sujeto de un constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención. Donde se usa el constructo de ácido nucleico en el método terapéutico de la invención, puede usarse el constructo como parte de un constructo de expresión, por ejemplo en forma de un vector de expresión tal como un plásmido o un virus. En un método de este tipo, el constructo puede administrarse por vía intravenosa, intradérmica, intranasal,
30 intramuscular, oral o por otras vías.

Puede emplearse el constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención, y proteínas derivadas a partir del mismo, sólo o conjuntamente con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos, por ejemplo fármacos antiinflamatorios, agentes citotóxicos,

agentes citostáticos o antibióticos. Los constructos de ácido nucleico y proteínas útiles en la presente invención se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y preferiblemente se purifican hasta homogeneidad.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” incluye cualquier pauta que pueda beneficiar a un ser humano o un animal. El tratamiento de “animales” se extiende al tratamiento de animales domésticos, incluyendo caballos y animales de compañía (por ejemplo gatos y perros) y animales de granja/agrícolas incluyendo miembros de las familias ovina, caprina, porcina, bovina y equina.

10

El constructo de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención puede usarse terapéuticamente en un método de la invención a modo de terapia génica.

15

La administración del constructo de ácido nucleico del segundo aspecto puede dirigirse al sitio diana mediante métodos físicos. Los ejemplos de éstos incluyen administración tópica del ácido nucleico “desnudo” en forma de un vector en un vehículo apropiado, por ejemplo, en disolución en un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, o administración de un vector mediante un método físico tal como bombardeo de partículas según métodos conocidos en la técnica.

20

Otros métodos físicos para administrar el constructo de ácido nucleico o proteínas del tercer aspecto de la invención directamente al recipiente incluyen ultrasonidos, estimulación eléctrica, electroporación y microsiembra. Los métodos de administración adicionales incluyen administración oral o administración por inhalación.

25

El constructo de ácido nucleico según el segundo aspecto de la invención también puede administrarse mediante vectores de suministro. Estos incluyen vectores de suministro virales, tales como vectores de suministro de adenovirus, retrovirus o lentivirus conocidos en la técnica.

30

Otros vectores de suministro no virales incluyen vectores de suministro de lípidos, incluyendo vectores de suministro de liposomas conocidos en la técnica.

La administración también puede tener lugar mediante células huésped transformadas. Tales células incluyen células recogidas del sujeto, en las que el constructo de ácido nucleico se transfiere mediante métodos de transferencia génica conocidos en la técnica. Seguido del crecimiento de las células transformadas en cultivo e injerto al sujeto.

5

Tal como se usa en el presente documento el término “terapia génica” se refiere a la introducción de genes mediante ingeniería genética recombinante de células corporales (terapia génica somática) en beneficio del paciente. Además, la terapia génica puede dividirse en técnicas *ex vivo* e *in vivo*. La terapia génica *ex vivo* se refiere a la retirada de células corporales de un paciente, tratamiento de las células retiradas con un vector, es decir, un vector recombinante, y posterior retorno de las células tratadas al paciente. La terapia génica *in vivo* se refiere a la administración directa del vector génico recombinante mediante, por ejemplo, medios intravenosos o intravasculares.

10

15 Preferiblemente, el método de terapia génica de la presente invención se lleva a cabo *ex vivo*.

Preferiblemente en terapia génica, el vector de expresión de la presente invención se administra de modo que se expresa en el sujeto a tratar. Por tanto, para terapia génica en seres humanos, el promotor es preferiblemente un promotor de ser humano de un gen humano, o de un gen que normalmente se expresa en seres humanos, tal como el promotor de CMV de ser humano.

20

Para terapia génica, la presente invención puede proporcionar un método para manipular las células somáticas de mamíferos humanos y no humanos.

25

La presente invención también proporciona un método de terapia génica que puede implicar la manipulación de las células de líneas germinales de un mamífero no humano.

30

Por tanto, la presente invención proporciona un método para proveer a un ser humano con una proteína terapéutica que comprende introducir células de mamífero en un ser humano, habiéndose tratado las células humanas *in vitro* para insertar en las mismas un constructo de ácido nucleico según el segundo aspecto de la invención.

La presente invención también cubre cada una de las etapas individuales del método de terapia génica somática *ex vivo*. Por ejemplo, la etapa de manipular las células retiradas de un paciente con el constructo de ácido nucleico del tercer aspecto de la invención en un vector apropiado. Tal como se usa en el presente documento, el término “células manipuladas” cubre las células transfectadas con un vector recombinante.

También está contemplado el uso de las células transfectadas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de fibrosis crónica, preferiblemente seleccionada de la lista que consiste en fibrosis hepática, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar y esclerodermia.

La presente invención también puede encontrar aplicación en veterinaria para el tratamiento/profilaxis de animales domésticos incluyendo caballos y animales de compañía (por ejemplo gatos y perros) y animales de granja que pueden incluir mamíferos de las familias ovina, porcina, caprina, bovina y equina.

La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden el constructo de ácido nucleico o proteínas del primer o segundo aspectos de la invención. Por tanto, la proteína de fusión o constructos de ácido nucleico de la presente invención pueden emplearse en combinación con el portador o portadores farmacéuticamente aceptable(s). Tales portadores pueden incluir, pero no están limitados a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, liposomas, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier manera eficaz, conveniente efectiva para tratar la enfermedad de un paciente incluyendo, por ejemplo, administración por vía respiratoria, oral, tópica, intravenosa, intramuscular, intranasal o intradérmica entre otras. En terapia o como profiláctico, puede administrarse el agente activo a un individuo como composición inyectable, por ejemplo como dispersión acuosa estéril, preferiblemente isotónica.

Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que la dosificación diaria del agente activo sea de desde 0,01 mg/kg de peso corporal, normalmente alrededor de 1 mg/kg. En cualquier caso, el médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para un individuo, que dependerá de factores que incluyen la edad, peso, género y respuesta del individuo. Las dosificaciones anteriores son a modo de ejemplo del

caso promedio. Por supuesto, puede haber ejemplos donde se justifiquen dosificaciones mayores o menores, y los mismos están dentro del alcance de esta invención.

5 Un sexto aspecto de la invención proporciona la proteína de fusión del primer aspecto de la invención, en el que la proteína de fusión se asocia con un agente farmacéuticamente activo. El agente farmacéuticamente activo puede ser tal como se describió anteriormente.

10 La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden la proteína de fusión y el agente farmacéuticamente activo asociado del sexto aspecto de la invención. Por tanto, la proteína de fusión y el agente farmacéuticamente activo asociado pueden emplearse en combinación con el portador o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales portadores pueden incluir, pero no están limitados a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, liposomas, agua, glicerol, polietilenglicol, etanol y combinaciones de los mismos.

15 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier manera eficaz, conveniente efectiva para tratar una enfermedad de un paciente que incluye, por ejemplo, administración por vía oral, tópica, intravenosa, intramuscular, intranasal o intradérmica entre otras. En terapia o como profiláctico, el agente activo puede administrarse a un individuo como composición inyectable, por ejemplo, como dispersión acuosa estéril, preferiblemente
20 isotónica.

Un séptimo aspecto de la invención contempla un procedimiento para preparar la proteína de fusión, del primer aspecto de la invención que comprende la producción de la proteína de fusión de manera recombinante mediante la expresión en una célula huésped, purificación de
25 la proteína de fusión expresada y asociación del agente farmacéuticamente activo a la proteína de fusión purificada por medio de unión de enlace peptídico, enlace salino o de hidrógeno o reticulación química.

Los siguientes ejemplos son sólo con fines ilustrativos.
30

Ejemplos

Materiales y métodos

- **Características de las secuencias de la proteína de fusión usada en los ejemplos**

SP-LAP-L1-MMP-L2-CST29r (secuencia de aminoácidos)

MPPSGLRLLPLLWLLVLTGPRPAAGLSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPPSQGEVPPGPLEAVLAL
YNSTRDRVAGESAEPEPEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAELRLLRL
KLVKVEQHVELYQKYSNNSWRYLSNRLAPSDSPEWLSFDVTGVVRQWLSRGGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLQVDINGFT
TGR**RGD**LATIHGMNRPFLLLMATPLERAQHLQSEFGGGGSPLGLWAGGGGSAAAQERPPPLQPPHRDKKPKCNFFWKTFFS
CK*

5

LAP: proteína asociada a latencia de factor de crecimiento transformante B1 (TGFβ-1), Met1-Ser273.

MMP: un péptido de señal putativo para escisión específica con MMP1, MMP2 y MMP9
10 (PLGLWA), flanqueado por dos secuencias de aminoácidos hidrófilos (GGGGS y GGGGSAAA) que actúan como conectores flexibles y facilitan la entrada de enzima MMP. El núcleo del sitio de escisión (PLGL) podría sustituirse por una versión diferente (PLGI) a escindir por MMP3, MMP7 y MMP8.

15 Cortistatina-29: secuencia en ratas de cortistatina

Otros componentes importantes:

CSC: Las cisteínas 224 y 226 son importantes en el enlace disulfuro intermolecular entre dos moléculas de LAP.

20 **RGD:** motivo (residuos 245-247) facilita la interacción con integrinas.

Cisteína 33: Es importante para el puente disulfuro con la tercera repetición rica en ocho cisteínas de proteína de unión a TGFβ latente (LTBP).

**Ejemplo 1. Construcción de cortistatina-29 (CST-29) en el extremo C-terminal seguido
25 de GS-MMP-GS y luego fusionada al péptido asociado a latencia (LAP).**

En primer lugar, se diseñó un ADN bicatenario correspondiente con la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal al C-terminal de LAP, GS-MMP-GS y CST-29 de rata (GenBank: EDL81150.1). Este ADN bicatenario se clonó en el plásmido pCDNA3.1+
30 (Invitrogen) digerido con *EcoRI*, usando el kit de clonación In-fusion HD (Clontech). Este clon se denominó **pCDNA3.1+LAP-GS-MMP-GS-CST-29r** (LAP-CST para experimentos

in vivo) y se obtuvieron grandes cantidades de plásmido de ADN recombinante usando columnas de kit de plásmido Endofree (Omega). Se diseñó un plásmido que contenía LAP-GS-MMP-GS, sin secuencia CST-29r (LAP para experimentos *in vivo*), y se usó como control de referencia.

- 5 Se transfectaron plásmidos que codificaban para **pCDNA3.1+LAP-GS-MMP-GS-CST-29r** o **pCDNA3.1+LAP-GS-MMP-GS** en células 293T (ATCC Company) usando reactivo transfectado *in vitro* LipoD293TM (SignaGen Laboratories), y se cultivaron células en DMEM libre de suero durante diferentes períodos de tiempo (24, 48 y 72 h). Se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

10

La cantidad de péptido LAP-MMP-CST-29r en sobrenadantes de cultivo se determinó indirectamente midiendo la concentración de cortistatina-29 en ratas usando un ELISA específico (Phoenix Pharmaceuticals).

- 15 Las células 293T que se transfectaron con **pCDNA3.1+LAP-GS-MMP-GS-CST-29r** produjeron 6,2, 20,3 y 40,2 ng/ml de cortistatina-29 después de 24 h, 48 h y 72 h de cultivo.

Las células 293T que se transfectaron con **pCDNA3.1+LAP-GS-MMP-GS** produjeron niveles indetectables de cortistatina-29 después de 24 h, 48 h y 72 h de cultivo. Esto sugiere
20 que células transfectadas con **pCDNA3.1+LAP-GS-MMP-GS-CST-29r** pueden producir y secretar LAP-CST durante un largo período de tiempo, para que este péptido se pueda producir en grandes cantidades.

Los sobrenadantes de células 293T transfectadas con **pCDNA3.1+LAP-GS-MMP-GS-CST-**
25 **29r** que se recogieron a las 48 h de cultivo se trataron con medio que contenía MMP1 recombinante y la cantidad de cortistatina-29 (midiendo indirectamente LAP-CST) que se recuperó del cultivo se redujo desde 80 ng hasta 20 ng, 12 horas más tarde; esto sugiere que cortistatina-29 se escinde de LAP-CST después de exposición a MMP1.

30 Por otro lado, mientras que la cantidad de cortistatina-29 recombinante disminuyó en un 82% después de 15 minutos a temperatura ambiente, la cantidad de cortistatina-29 en LAP-CST permanece estable durante al menos 7 días. **Esto sugiere que la cortistatina está protegida frente a la degradación cuando está plegada en LAP-CST.**

Ejemplo 2. La inyección local de LAP-CST protege frente a la esclerodermia dérmica.

Se indujo esclerodermia mediante inyección intradérmica de bleomicina (3 veces por semana, durante cuatro semanas) en un área de 1 cm³ en la piel dorsal de ratones C57Bl/6. Se trataron localmente los ratones alrededor de área de la lesión con solución salina (grupo bleomicina), con cortistatina (grupo bleomicina+CST, 3 veces por semana, 10 ng cada vez), con vector de LAP vacío (Bleomicina+LAP, una vez a la semana, 20 pg) o con LAP-CST (Bleomicina+LAP-CST, una vez a la semana, 20 pg). Se usaron animales sin tratar previamente, sin bleomicina, como referencia de control basal. Después de cuatro semanas, se diseccionó el área de piel lesionada y se procesó para su análisis histológico usando tinción tricrómica de Mason. El grosor de piel (desde epidermis hasta hipodermis) se cuantificó usando el programa Image J. Los depósitos fibróticos en la piel se tiñen de azul en secciones.

Estos resultados indican que el tratamiento con LAP-CST es eficaz reduciendo la fibrosis dérmica inducida por bleomicina, en comparación con el tratamiento únicamente con LAP. Además, el tratamiento semanal con LAP-CST fue tan eficaz como el tratamiento repetitivo (3 veces por semana) con cortistatina recombinante usada en concentración 500 veces mayor, sugiriendo que una única inyección de LAP-CST es al menos 1.500 veces más eficaz que la cortistatina recombinante.

20

Ejemplo 3. El tratamiento con LAP-CST protege frente a la fibrosis pulmonar.

Se indujo fibrosis pulmonar mediante inyección intratraqueal de bleomicina (50 µg/kg de peso corporal, disueltos en 50 µl de solución salina) en ratones C57Bl/6. Los ratones se trataron mediante inhalación nasal de solución salina (grupo bleomicina+solución salina), cortistatina (grupo bleomicina+CST, 3 veces por semana, 10 ng cada vez), o LAP-CST (Bleomicina+LAP-CST, una vez a la semana, 20 pg). Después de 18 días, se diseccionaron los pulmones y se procesaron para su análisis histológico usando la tinción tricrómica de Mason y la tinción de rojo sirio. Se cuantificó la fibrosis pulmonar y el daño tisular usando el programa Image J y se puntuó usando un índice clínico establecido de desde 0 hasta 4 en modo ciego. La mortalidad provocada por fibrosis se muestra en la figura 3.

30

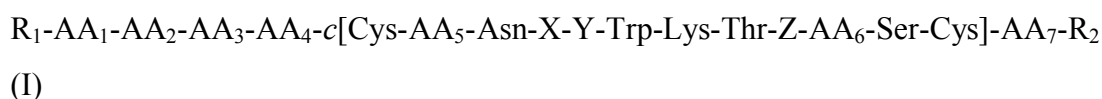
Estos resultados indicaron que la inyección intratraqueal de bleomicina induce fibrosis pulmonar idiopática grave en ratones que provoca el 80% de mortalidad. El tratamiento con

LAP-CST mediante inhalación nasal redujo significativamente la fibrosis y el daño pulmonar y aumentó de manera espectacular la supervivencia. El tratamiento con LAP-CST fue tan eficaz como la inhalación repetitiva de péptido de cortistatina recombinante (3 veces por semana, en una dosis 500 veces mayor).

5

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión heteróloga que comprende (a) una proteína biológicamente activa, fusionada mediante (b) un sitio de escisión proteolítica a (c) un péptido asociado a latencia (LAP) que comprende un dominio precursor de TGF β , en la que dicha proteína biológicamente activa comprende una cortistatina o un análogo de la misma.
2. Proteína de fusión heteróloga según la reivindicación 1, en la que el compuesto análogo es de fórmula general (I),



sus estereoisómeros, mezclas de los mismos y/o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que

- AA₁ es Asp o un enlace
- AA₂ es Arg o un enlace
- AA₃ es Met o Ala o un enlace
- AA₄ es Pro o Gly
- AA₅ es Lys o Arg
- AA₆ es Ser o Thr
- AA₇ es Lys o un enlace
- X, Y, Z son los aminoácidos Phe, Phg, Msa, 3,4,5-trimetilfenilalanina, Msg, 3,4,5-trimetilfenilglicina y/o una dihalogenofenilalanina, diW-Phe;
- W se selecciona del grupo que consiste en F, Cl, Br e I;
- R₁ se selecciona del grupo que consiste en H, un grupo alifático sustituido o no sustituido no cíclico, aliciclilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, un polímero derivado de polietilenglicol, un agente quelante y R₅—CO—;
- R₂ se selecciona del grupo que consiste en —NR₃R₄, —OR₃ y —SR₃;
- R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, un grupo alifático sustituido o no sustituido no cíclico, aliciclilo sustituido o no sustituido,

heterociclilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, y aralquilo sustituido o no sustituido y un polímero;

- R₅ se selecciona del grupo que consiste en H, un grupo alifático sustituido o no sustituido no cíclico, aliciclilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, aralquilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido;

- y con la condición de que:

- Al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es Msa, 3,4,5-trimetilfenilalanina, Msg, 3,4,5-trimetilfenilglicina y/o una dihalogenofenilalanina, diW-Phe;
- Si AA₁ y AA₂ son enlaces, AA₃ es Ala, AA₄ es Gly, AA₅ es Lys, AA₆ es Thr y AA₇ es un enlace, entonces al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es una dihalogenofenilalanina, diW-Phe.

3. Proteína de fusión heteróloga según la reivindicación 2, en la que AA₃ es Met o un enlace y AA₄ es Pro.

4. Proteína de fusión heteróloga según la reivindicación 2, en la que al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es una dihalogenofenilalanina, diW-Phe.

5. Proteína de fusión heteróloga según la reivindicación 2, en la que al menos uno de los aminoácidos X, Y o Z es 3,5-difluorofenilalanina (Dfp).

6. Proteína de fusión heteróloga según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que R₁ es R₅—CO— y R₅ se selecciona del grupo que consiste en radical alquilo C₁-C₂₄ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₂₄ sustituido o no sustituido, alquino C₂-C₂₄ sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃-C₂₄ sustituido o no sustituido, cicloalqueno C₅-C₂₄ sustituido o no sustituido, cicloalquino C₈-C₂₄ sustituido o no sustituido, arilo C₆-C₃₀ sustituido o no sustituido, aralquilo C₇-C₂₄ sustituido o no sustituido, anillo heterociclilo sustituido o no sustituido de 3-10 miembros, y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 24 átomos de carbono y 1 a 3 átomos distinto al carbono donde la cadena de alquilo es de 1 a 6 átomos de carbono.

7. Proteína de fusión heteróloga según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que R₁ se selecciona de H, un polímero derivado de polietilenglicol con un peso

molecular comprendido entre 200 y 35000 Daltons, acetilo, terc-butanoilo, prenilo, hexanoilo, 2-metilhexanoilo, ciclohexanocarboxilo, octanoilo, decanoilo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, behenilo, oleoilo y linoleoilo.

- 5 8. Proteína de fusión heteróloga según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en la que R_2 es $\text{—NR}_3\text{R}_4$ y R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo $C_1\text{--}C_{24}$ sustituido o no sustituido, alquenilo $C_2\text{--}C_{24}$ sustituido o no sustituido, alquinilo $C_2\text{--}C_{24}$ sustituido o no sustituido, cicloalquilo $C_3\text{--}C_{24}$ sustituido o no sustituido, cicloalquenilo $C_5\text{--}C_{24}$ sustituido o no sustituido, cicloalquinilo $C_8\text{--}C_{24}$ sustituido o no sustituido, arilo $C_6\text{--}C_{30}$ sustituido o no sustituido, aralquilo $C_7\text{--}C_{24}$ sustituido o no sustituido, anillo heterociclilo sustituido o no sustituido de 3-10 miembros, y heteroarilalquilo sustituido o no sustituido de 2 a 24 átomos de carbono y 1 a 3 átomos distinto al carbono en el que la cadena de alquilo es de 1 a 6 átomos de carbono y un polímero derivado de polietilenglicol.
- 10
- 15 9. Proteína de fusión heteróloga según la reivindicación 8, en la que R_3 y R_4 se seleccionan del grupo que consiste en H, metilo, etilo, hexilo, dodecilo o hexadecilo.
- 20 10. Proteína de fusión heteróloga según la reivindicación 2, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

Ala-Gly-c[-Cys-Lys-Asn-Phe-Dfp-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]

Ala-Gly-c[Cys-Lys-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]

Ala-Gly-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Dfp-Thr-Ser-Cys]

Ala-Gly-c[Cys-Arg-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Dfp-Ser-Ser-Cys]

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Msa-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Dfp-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Msa-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Arg-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Msa-Thr-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Msa-Ser-Ser-Cys]-Lys

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]

Pro-c[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Dfp-Thr-Ser-Cys]

Met-Pro-c[Cys-Arg-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Ser-Ser-Cys]-Lys

Asp-Arg-Met-Pro-c[Cys-Arg-Asn-Msa-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys

Asp-Arg-Met-Pro-c[Cys-Arg-Asn-Dfp-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys]-Lys.

11. Proteína de fusión heteróloga según la reivindicación 2, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Dfp-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

ES 2 780 274 A1

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Dfp-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Ala-Gly-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Dfp-L-Ser-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Octanoil-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Msa-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Octanoil-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Msa-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Ac-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Dfp-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-NH₂

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Msa-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Msa-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Msa-L-Ser-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-NH₂

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

Octanoil-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Pro-c[L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Dfp-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-OH

H-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Ser-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-L-Asp-L-Arg-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

Miristoil-L-Asp-L-Arg-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Msa-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH

H-Asp-L-Arg-L-Met-L-Pro-c[L-Cys-L-Arg-L-Asn-L-Dfp-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys]-L-Lys-OH.

12. Proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicho LAP comprende el dominio precursor TGFβ-1, 2, 3, 4 o 5.

5

13. Proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho sitio de escisión proteolítica es un sitio de escisión de metaloproteínasa de matriz (MMP).

10

14. Proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicha proteína de fusión es SEQ ID NO 4, o una secuencia que tiene al menos el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% de identidad con una secuencia de LAP de SEQ ID NO 4, usando los parámetros por defecto del programa informático BLAST proporcionado por HGMP.

15

15. Composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20

16. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, para su uso en un método para el tratamiento de fibrosis crónica en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero la proteína de fusión heteróloga de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicha proteína de fusión heteróloga es adecuada para el tratamiento de fibrosis crónica.

17. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 15, en la que dicha proteína de fusión heteróloga se administra a dicho mamífero mediante administración respiratoria, tópica, oral o parenteral de la composición farmacéutica que comprende dicha proteína de fusión heteróloga y un portador farmacéuticamente aceptable.

5

18. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en la que el método es para el tratamiento de fibrosis idiopática.

10

19. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 17 o según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, en la que dicha fibrosis crónica se selecciona de la lista que consiste en fibrosis hepática, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar y esclerodermia.

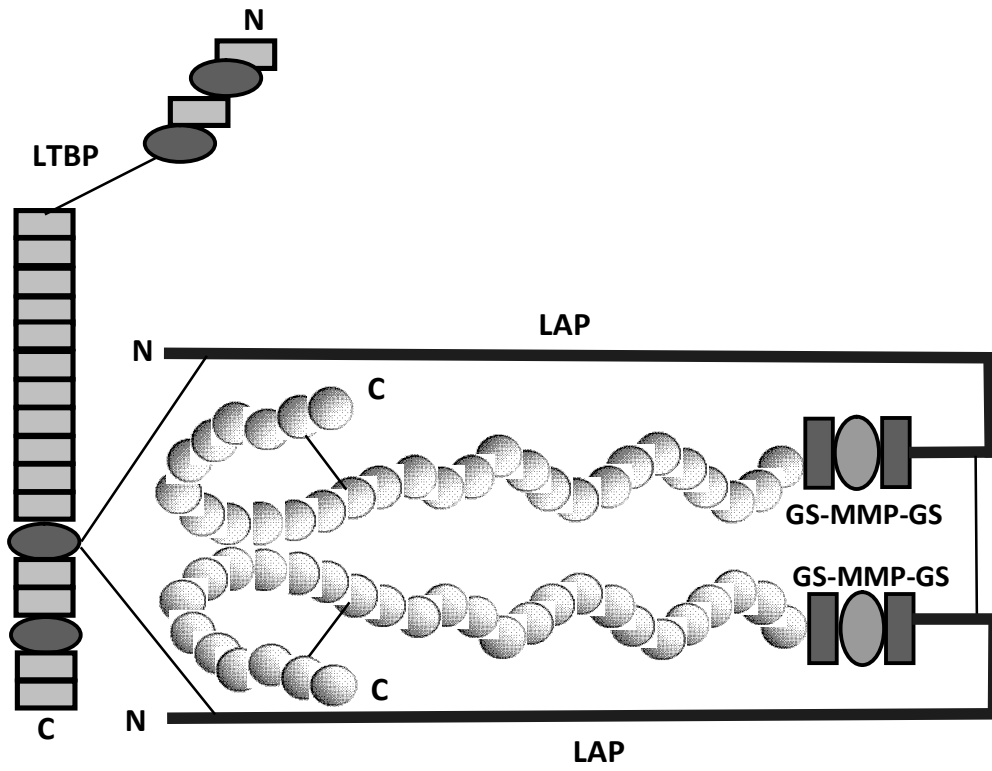


Figura 1

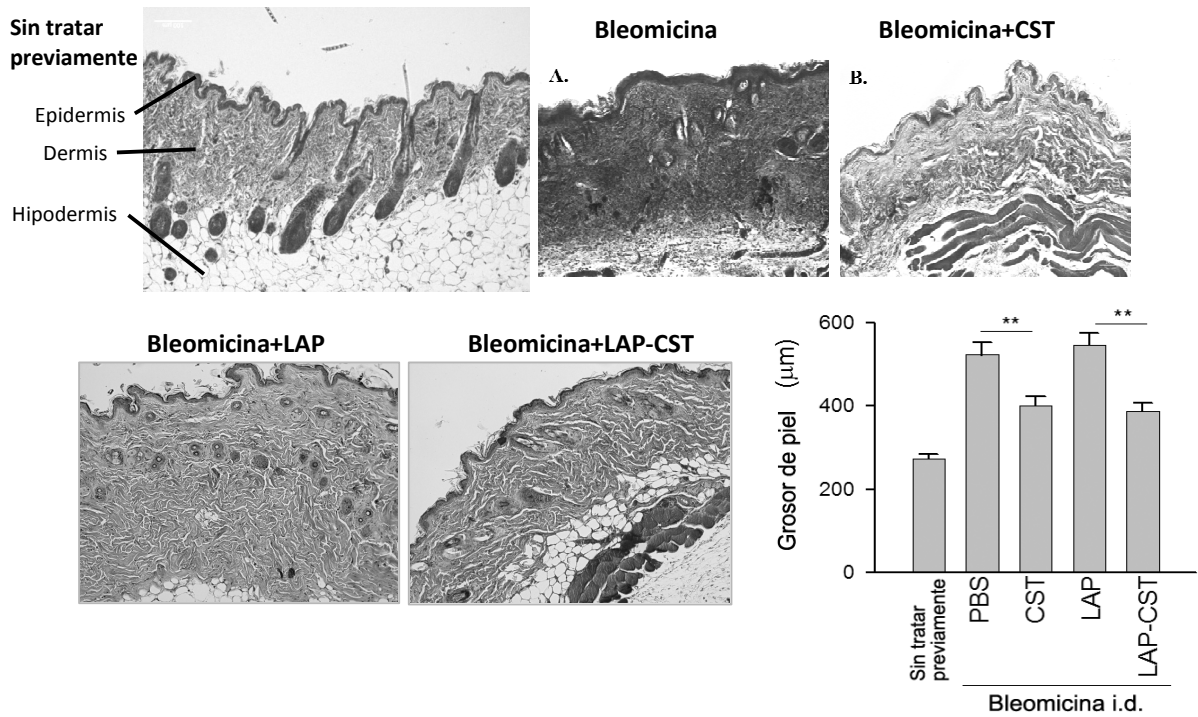
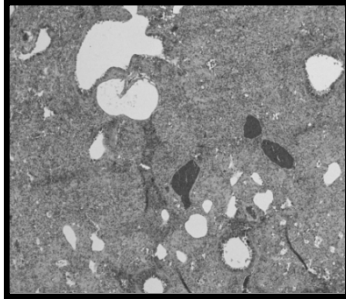


Figura 2

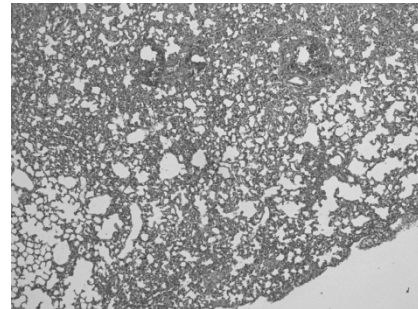
**Bleomicina i.t.
+inhalación de
solución salina**



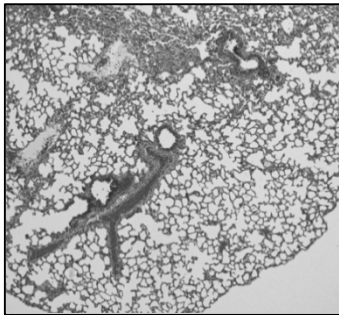
Fibrosis pulmonar idiopática

Mortalidad: 80%
Lesión pulmonar: 3.1 ± 0.3

**Bleomicina i.t.
+ inhalación de LAP-CST**



**Bleomicina i.t.
+ inhalación de CST**



Mortalidad: 0%
Lesión pulmonar: 1.6 ± 0.1

Mortalidad: 10%
Lesión pulmonar: 2.1 ± 0.3

Figura 3



- ②① N.º solicitud: 201930121
②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.02.2019
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K14/47** (2006.01)
A61K38/17 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 02/055098 A2 (QUEEN MARY -WESTFIELD COLLEGE) 18/07/2002, Páginas 1-3, 6-10, 18-21 y reivindicaciones 1-29.	1, 12-13, 15-19
Y		2-11, 14
Y	US 2016/015822 A1 (BCN PEPTIDES S.A.) 30/06/2016 Párrafos 2, 8, 10-14, 53-84 y reivindicaciones 1-10.	2-11, 14
A	GONZALEZ-REY, ELENA; DELGADO, MARIO. Cortistatin as a potential multistep therapeutic agent for inflammatory disorders. Drug news & perspectives, 2006, Vol. 19, Nº 7, Páginas 393-399. Todo el documento.	1-19
A	ANCOCHEA, J.; ANTÓN, E.; CASANOVA, A. Nuevas estrategias terapéuticas en la fibrosis pulmonar idiopática. Arch Bronconeumol, 2004, Vol. 40, Nº 6, Páginas 16-22. Todo el documento.	1-19
A	GONZALEZ-REY, ELENA, et al. Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, Vol. 103, Nº 11, Páginas 4228-4233. Todo el documento.	1-19
A	MOREIRA, LUCIANA DE SOUZA. Acción terapéutica de cortistatina en la encefalomiелitis autoinmune experimental y el efecto paradójico de su ausencia en inflamación y autoinmunidad. 2012. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2012. Todo el documento.	1-19
A	DE LECEA, LUIS. Cortistatin—functions in the central nervous system. Molecular and cellular endocrinology, 2008, Vol. 286, Nº 1-2, Páginas 88-95. Todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 14.10.2019	Examinador M. J. García Bueno	Página 1/2
---	---	----------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBL ALL, STN. INTERNET