

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 794**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010 E 10749982 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2470560**

54 Título: **Análogos de urocortina 2 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

28.08.2009 US 237995 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.09.2015

73 Titular/es:

**RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION
(100.0%)
402 North Division Street
Carson City, NV 89703, US**

72 Inventor/es:

**VALE, WYLIE W.;
VAUGHAN, JOAN;
DONALDSON, CINDY;
FISCHER, WOLFGANG y
RIVIER, JEAN E.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 545 794 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

Análogos de urocortina 2 y usos de los mismos

Descripción

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 61/237.995, presentada el 28 de agosto de 2009.

La presente divulgación se refiere en general a los campos de la química de proteínas, la biología molecular, las composiciones farmacéuticas y los agentes terapéuticos. Más particularmente, la divulgación se refiere a métodos, a composiciones referentes a análogos de urocortina-2 y a ácidos nucleicos que codifican para análogos de urocortina-2.

10 El factor de liberación de corticotropina (CRF) es un péptido de 41 aminoácidos más conocido por su papel indispensable en la iniciación de respuestas hipofisario-suprarrenales frente al estrés, un efecto mediado por receptores de CRF tipo 1. Además, el factor de liberación de corticotropina está ampliamente distribuido en el cerebro, y participa en la movilización de ajustes conductuales y autónomos complementarios frente a una variedad de circunstancias amenazantes. El factor de liberación de corticotropina y su familia relacionada de péptidos desempeñan importantes papeles en la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HHS) en condiciones
15 basales y de estrés. También se cree que el factor de liberación de corticotropina está implicado también en otras respuestas neuroendocrinas y paracrinas en muchos tejidos. Los miembros de la familia de CRF integran respuestas endocrinas, autónomas y conductuales frente a factores de estrés. Estos péptidos también pueden estar implicados en el control del apetito, la excitación sexual y las funciones cognitivas. Pueden producirse graves consecuencias psicológicas y fisiológicas como resultado de los efectos del estrés a largo plazo, tales como trastornos de ansiedad, anorexia nerviosa y depresión melancólica.

Los miembros de la familia del factor de liberación de corticotropina median en sus acciones biológicas mediante unión específica a receptores de CRF con altas afinidades. Los receptores de CRF son receptores acoplados a proteínas G que actúan a través de adenilato ciclasa y están relacionados estructuralmente con la familia de la secretina. Esta familia también incluye GRF, VIP, PTH y el receptor de calcitonina. El receptor CRF-R1 está distribuido por todo el cerebro y se encuentra en sitios de transmisión sensorial y motora. El CRF-R2 α está distribuido en el tabique lateral, hipotálamo ventral medio, núcleo del tracto solitario y el núcleo del rafe dorsal, que son zonas en las que se expresa CRF-R1 muy poco o nada en absoluto. El CRF-R2 β se encuentra principalmente en sitios periféricos incluyendo el corazón, los vasos sanguíneos, el tracto gastrointestinal, el epidídimo, los pulmones y la piel. La farmacología de los dos tipos de receptores difiere en que el factor de liberación de corticotropina tiene una baja afinidad por CRF-R2 pero una alta afinidad por CRF-R1. Otros péptidos relacionados tales como urotensina de carpa, sauvagina de rana y urocortina tienen una alta afinidad por CRF-R2. Los ratones deficientes en CRF-R2 demuestran un aumento de un comportamiento similar a la ansiedad provocado por hipersensibilidad a factores de estrés.

35 Un neuropéptido relacionado con CRF de mamífero, urocortina (Ucn), se une con alta afinidad a ambos tipos conocidos de receptor de CRF, mientras que CRF se une de manera sumamente preferida a CRF-R1. La urocortina administrada de manera central es más potente que CRF en la supresión del apetito pero menos en la generación de efectos similares a la ansiedad agudos y la activación conductual generalizada. Esto se ha tomado como que indica que la urocortina podría mediar en algunos efectos relacionados con el estrés atribuidos inicialmente a CRF, sirviendo al menos en parte como ligando endógeno para CRF-R2. Se ha propuesto la urocortina como agente terapéutico en cardiopatía (véase, por ejemplo, Raddino *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2009).

Se cree que la urocortina 2 (Ucn 2), uno de los miembros de la familia de péptidos de CRF, es un ligando endógeno para el receptor de CRF tipo 2 (CRF-R2). Los papeles de urocortina 2 en el organismo son diversos, e incluyen implicación en trastornos afectivos, estimulación del sistema inmunitario y cardioprotección (Lawrence y Latchman, 2006). La aplicación terapéutica de urocortina 2 es limitada debido a la solubilidad en agua limitada del péptido de urocortina 2. Por tanto, existe la necesidad de análogos activos de urocortina 2 que tengan solubilidad en agua mejorada.

La invención se refiere a las realizaciones definidas en las reivindicaciones. Por tanto, la invención se refiere a los siguientes puntos.

50 1. Un polipéptido de fórmula (I):

Z_1-Z_2 (I)

en la que Z_1 es

(i) un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en R y K o

(ii) una serie consecutiva de 2-20 aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en R y K;

y

Z₂ es SEQ ID NO: 1,

siempre que el extremo carboxi-terminal de Z₁ se una covalentemente al extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1.

2. Un ácido nucleico recombinante que codifica para el polipéptido del punto 1.

5 3. El polipéptido del punto 1 o el ácido nucleico del punto 2, en el que Z₁ es arginina (R).

4. El polipéptido del punto 1 ó 3, en el que el polipéptido se define además como que está amidado en el extremo C-terminal.

5. El polipéptido del punto 4, en el que el polipéptido es SEQ ID NO: 6.

6. Un polipéptido quimérico que comprende:

10 a) una primera secuencia de aminoácidos que es un polipéptido tal como se expone en cualquiera del puntos 1 y 3 a 5; y

b) una segunda secuencia de aminoácidos, en el que la segunda secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos terapéutica.

15 7. El polipéptido quimérico del punto 6, en el que la segunda secuencia de aminoácidos potencia la biodisponibilidad de la primera secuencia de aminoácidos.

8. El polipéptido quimérico del punto 7, en el que la segunda secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en un dominio de unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad de la apolipoproteína B (SEQ ID NO: 20), una secuencia de aminoácidos de Fc o una toxina.

20 9. Un polinucleótido que codifica para un polipéptido quimérico tal como se expone en uno cualquiera de los puntos 6 a 8.

10. Una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y

a) el polipéptido de cualquiera del puntos 1 y 3 a 5 o el ácido nucleico recombinante del punto 2 ó 3; o

b) un polipéptido quimérico de uno cualquiera de los puntos 6 a 8 o un polinucleótido del punto 9.

25 11. El polipéptido de uno cualquiera de los puntos 1 y 3 a 5 o el ácido nucleico del punto 2 ó 3 para su uso en el tratamiento de un estado fisiopatológico en un sujeto, en el que

a) dicho polipéptido o dicho ácido nucleico; y

b) un portador farmacéutico aceptable

va a administrarse al sujeto.

12. El polipéptido o el ácido nucleico para su uso según el punto 11, en el que el sujeto es un mamífero.

30 13. El polipéptido o el ácido nucleico para su uso según el punto 11 ó 12, en el que el estado fisiopatológico se selecciona del grupo que consiste en temperatura corporal elevada, disfunción del apetito, insuficiencia cardiaca congestiva, estrés, ansiedad y niveles indeseablemente bajos de secreción de ACTH.

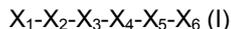
35 14. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico tal como se expone en el punto 2 ó 3, en el que dicho vector comprende además elementos reguladores necesarios para la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico en una célula, preferiblemente un vector viral, seleccionado de un vector adenoviral, un vector lentiviral o un vector de virus adenoasociado.

15. Una célula huésped transfectada con el vector del punto 14, en la que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula vegetal o una célula de insecto.

40 La presente invención se basa en parte en la identificación de análogos de urocortina 2 que tienen la capacidad sorprendente e inesperada para estimular la producción de AMPc intracelular en células de manera similar a urocortina 2, y tienen aún una solubilidad en agua mejorada en comparación con urocortina 2. La solubilidad en agua mejorada conducirá a una mayor aplicación terapéutica de los análogos de urocortina 2 en el tratamiento y la prevención de enfermedades y estados relacionados con la salud que implican el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal.

45 Algunas realizaciones de la presente divulgación incluyen análogos de urocortina que son polipéptidos aislados de

fórmula (I):



5 en la que X_1 o bien está ausente o bien es un polipéptido que tiene 1-200 residuos; X_2 está ausente o tiene 1-20 residuos de aminoácido que se seleccionan cada uno individualmente de o bien arginina (R) o bien lisina (K); X_3 es SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22; X_4 o bien está ausente o bien es G, GH o GHC; X_5 está ausente o tiene 1-20 residuos de aminoácido que se seleccionan cada uno individualmente de o bien arginina (R) o bien lisina (K); X_6 o bien está ausente o bien es un polipéptido que tiene 1-200 residuos.

10 Algunas realizaciones de la presente divulgación incluyen la condición de que si X_3 es SEQ ID NO: 1, X_4 , X_5 , X_6 están todos ausentes, entonces X_2 no está ausente, además de que si X_3 es SEQ ID NO: 19, X_5 está ausente y X_6 está ausente, entonces X_4 es G, GH o GHC. En realizaciones particulares, X_3 es SEQ ID NO: 1. En realizaciones particulares adicionales, X_3 es SEQ ID NO: 19. En realizaciones particulares adicionales, X_2 es arginina (R).

En realizaciones particulares, X_1 y X_2 están ausentes, X_3 es SEQ ID NO: 1, X_4 es glicina y X_6 está ausente.

En otras realizaciones, X_1 está ausente, X_3 es SEQ ID NO: 1, X_4 está ausente, X_5 está ausente, X_6 está ausente y el polipéptido se define además como que está amidado en el extremo C-terminal.

15 En realizaciones adicionales, X_1 y X_2 están ausentes, X_3 es SEQ ID NO: 19, X_4 es glicina y X_6 está ausente.

En otras realizaciones, el polipéptido de fórmula (I) se define además como que está amidado en el extremo C-terminal. La amidación puede ser mediante cualquier método conocido por los expertos habituales en la técnica.

20 X_2 y X_5 puede ser una serie consecutiva de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 aminoácidos que son cualquiera de R y K. En realizaciones particulares, X_2 y/o X_5 incluyen 2 residuos de aminoácido. En realizaciones específicas, el residuo de aminoácido es arginina (R).

Otras realizaciones de la presente divulgación incluyen cualquiera de los péptidos anteriores que están amidados en el extremo C-terminal. Algunas realizaciones incluyen un residuo de C en el extremo N-terminal y un residuo de C en el extremo C-terminal.

25 Otras realizaciones se refieren a urocortina 2 o un péptido derivado de urocortina 2 que está amidado en el extremo C-terminal. Otros análogos de urocortina 2 incluyen cualquier péptido derivado de una prohormona de urocortina 2 que está amidado en el extremo C-terminal. En algunas realizaciones el análogo de urocortina 2 es una prohormona de longitud completa de urocortina 2 que está amidada en el extremo C-terminal. La prohormona de urocortina 2 o urocortina puede proceder de cualquier especie. En realizaciones particulares, la urocortina 2 o prohormona de urocortina 2 procede de ser humano o ratón. En realizaciones específicas, el análogo de urocortina es SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 12.

30 Realizaciones de la presente invención incluyen análogos de urocortina 2 que son polipéptidos aislados de fórmula I: $Z_1 - Z_2$, en la que Z_1 es (i) un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en R y K o (ii) una serie consecutiva de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en R y K; y Z_2 comprende una secuencia de aminoácidos de urocortina 2 o prohormona de urocortina 2. Por ejemplo, en algunas realizaciones Z_2 es IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV (SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22, siempre que el extremo carboxilo-terminal de Z_1 se una covalentemente al extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1. El análogo puede estar opcionalmente amidado en el extremo C-terminal.

40 Otras realizaciones de la presente divulgación incluyen análogos que comprende una secuencia de aminoácidos de urocortina 2 o prohormona de urocortina 2 que incluye G, GH o GHC unido al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de urocortina 2 o prohormona de urocortina 2.

45 Se proporciona una tabla de abreviaturas de aminoácidos a continuación en la memoria descriptiva; se usarán las abreviaturas de una sola letra para los aminoácidos en la totalidad de esta divulgación. Los polipéptidos aislados de la presente divulgación una serie consecutiva de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 aminoácidos o más o cualquier intervalo de aminoácidos derivable de la misma. Por ejemplo, Z_1 puede tener 2-30 aminoácidos consecutivos de longitud, 2-20 aminoácidos consecutivos de longitud, 2-10 aminoácidos consecutivos de longitud o 2-5 aminoácidos consecutivos de longitud. En realizaciones particulares, Z_1 consiste en un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R y K. En una realización específica, Z_1 es R (arginina). Z_2 puede incluir uno o una serie de aminoácidos consecutivos unidos al extremo C-terminal. Por ejemplo, el extremo C-terminal puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o cualquier intervalo de aminoácidos derivable de los mismos. Por ejemplo, puede haber 2-500, 2-400, 2-300, 2-200, 2-100, 2-50, 2-20 o 2-10 aminoácidos consecutivos unidos al extremo C-terminal de SEQ ID NO: 1. En realizaciones específicas, Z_1 es SEQ ID NO: 1 (es decir, sin ningún aminoácido unido al extremo C-terminal de SEQ ID NO: 1). En realizaciones particulares, el polipéptido aislado es SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones, el extremo C-terminal o el extremo N-terminal del polipéptido está protegido.

En realizaciones particulares, el extremo C-terminal de cualquiera de los polipéptidos anteriores está amidado. La unión de cualquier resto conocido para formar una amida cuando se hace reaccionar con el extremo carboxilo-terminal de un polipéptido se contempla por la presente divulgación.

- 5 En algunas realizaciones, el polipéptido aislado de la presente divulgación puede tener un extremo C-terminal protegido o un extremo N-terminal protegido. Por tanto, por ejemplo, puede unirse un grupo protector al extremo N-terminal o extremo C-terminal del polipéptido de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el extremo C-terminal está amidado. En algunas realizaciones, se usa un agente de protección de amino para proteger el extremo N-terminal.
- 10 Algunas realizaciones de la presente divulgación incluyen análogos de urocortina tal como se expone en el presente documento que tienen un extremo N-terminal acilado. Esta acilación proteica puede usarse para unir una molécula tal como ácido graso en el extremo N-terminal de la proteína para proteger el polipéptido frente a la degradación enzimática o para cambiar diversas propiedades de la proteína tales como su hidrofiliidad/hidrofobicidad. Estas modificaciones pueden usarse para alterar la duración o biodisponibilidad de la proteína *in vivo*.
- 15 En algunas realizaciones, los polipéptidos aislados de la presente divulgación pueden conjugarse con agentes complejantes para radionúclidos. Tal como se mencionó, la conjugación entre el agente complejante y los polipéptidos expuestos en el presente documento puede tener lugar mediante cualquier método y unión química conocidos por los expertos en la técnica. Un grupo protector puede eliminarse antes de la conjugación con un agente complejante. El agente complejante puede ser un quelante. El radionúclido puede ser cualquier radionúclido conocido por los expertos habituales en la técnica. En ejemplos no limitativos, el ion de metal puede seleccionarse del grupo que consiste en un ion de tecnecio, un ion de cobre, un ion de indio, un ion de talio, un ion de galio, un ion de arsénico, un ion de renio, un ion de holmio, un ion de itrio, un ion de samario, un ion de selenio, un ion de estroncio, un ion de gadolinio, un ion de bismuto, un ion de hierro, un ion de manganeso, un ion de lutecio, un ion de cobalto, un ion de platino, un ion de calcio y un ion de rodio. Pueden usarse análogos marcados con radionúclidos para la obtención de imágenes tal como gammagrafía.
- 20
- 25

Los polipéptidos aislados de la presente divulgación pueden modificarse para que contengan un marcador, tal como elementos radiactivos, enzimas, productos químicos que fluorescen cuando se exponen a luz ultravioleta, y otros. Se conocen varios materiales fluorescentes y pueden utilizarse como marcadores. Éstos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, rojo Texas, azul AMCA y amarillo Lucifer. Los análogos de urocortina 2 marcados

30 resultantes pueden usarse para identificar células que expresan receptores de CRF para ensayos biológicos. Alternativamente, los polipéptidos expuestos en el presente documento pueden unirse a una molécula de toxina. El conjugado de toxina resultante puede usarse para la destrucción dirigida de células que portan receptor de CRF.

En realizaciones específicas, el polipéptido incluye SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

35

La presente invención también contempla un polipéptido quimérico que incluye una primera secuencia de aminoácidos que es un análogo recombinante de urocortina 2 y una segunda secuencia de aminoácidos, en el que la segunda secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos terapéutica. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de aminoácidos potencia la biodisponibilidad de la primera secuencia de aminoácidos. Por ejemplo la segunda secuencia de aminoácidos puede potenciar la biodisponibilidad a través de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, la segunda secuencia de aminoácidos puede seleccionarse del grupo que consiste en un dominio de unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad de la apolipoproteína B, una secuencia de aminoácidos de Fc o una toxina. Los ejemplos no limitativos de toxinas incluyen gelonina, dodecandrina, tricosantina, tricoquirina, briodina, proteína antiviral de dondiego de noche, proteína de inactivación ribosómica de cebada (BRIP), proteína antiviral de fitolaca (PAP), saporina, lufina, momordina, ricina, abrina, toxina diftérica A, subunidad A de toxina pertussis, subunidad A de toxina de enterotoxina de *E. coli*, toxina colérica (CTX) y extremo C-terminal de toxina de *Pseudomonas*. En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico es una proteína de fusión codificada por un solo polinucleótido. También se contemplan polinucleótidos que codifican para los polipéptidos quiméricos expuestos en el presente documento. También se contemplan métodos de tratamiento de enfermedad, composiciones y kits que emplean los polinucleótidos y polipéptidos quiméricos de la presente divulgación.

40

45

50

Realizaciones adicionales de la presente divulgación incluyen un ácido nucleico recombinante que incluye un segmento de ácido nucleico que codifica para cualquiera de los polipéptidos de la presente divulgación. En realizaciones específicas, el polipéptido incluye SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18. En realizaciones particulares, X₆ es -OH.

55

Otros aspectos de la divulgación se refieren a ácidos nucleicos recombinantes que codifican para cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente. Los ácidos nucleicos pueden codificar opcionalmente para uno o más residuos de aminoácido adicionales. El ácido nucleico puede estar comprendido opcionalmente en un vector. Los

ejemplos no limitativos de vectores incluyen nanopartículas que comprenden un lípido, vectores virales y células. El vector puede incluir además elementos reguladores necesarios para la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico en una célula. En realizaciones particulares, el vector puede ser un vector viral. Por ejemplo, el vector viral puede ser un vector adenoviral, un vector lentiviral o un vector de virus adenoasociado. El vector también incluye células huésped transfectadas con vectores tal como se expone en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de células huésped incluyen una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula vegetal o una célula de insecto. Tal como se usa en el presente documento, el término "huésped" pretende incluir no sólo procariontes sino también eucariotas tales como células de levaduras, vegetales y animales. Una molécula de ADN recombinante o un gen que codifica para un polipéptido de la presente divulgación puede usarse para transformar un huésped usando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los expertos habituales en la técnica. Los huéspedes procariontes pueden incluir *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens* y *B. subtilis*. Los ejemplos no limitativos de huéspedes eucariotas incluyen levaduras tales como *P. pastoris*, células de mamífero y células de insecto.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a composiciones farmacéuticas que incluyen cualquiera de los polipéptidos mencionados anteriormente o ácidos nucleicos recombinantes, y un portador farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitativos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen agua o solución salina normal.

La presente divulgación también se refiere a métodos de tratamiento de un estado fisiopatológico (enfermedad o estado relacionado con la salud) en un sujeto, que implican administrar al sujeto una composición farmacéutica que incluye cualquiera de los polipéptidos, polipéptidos quiméricos o polinucleótidos tal como se expone en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser cualquier sujeto. En realizaciones particulares, el sujeto es un mamífero. Los ejemplos no limitativos de mamíferos incluyen un ser humano, un primate, un caballo, una vaca, una oveja, un cerdo, un perro, un gato, una rata o un ratón. En realizaciones específicas, el mamífero es un ser humano. El ser humano puede ser un paciente con un estado fisiopatológico o que corre el riesgo de desarrollar un estado fisiopatológico. El estado fisiopatológico es cualquier estado fisiopatológico conocido por los expertos habituales en la técnica. En algunas realizaciones, el estado fisiopatológico es una enfermedad o un estado relacionado con la salud que implica el HHS. Los ejemplos no limitativos de estados fisiopatológicos incluyen trastornos afectivos, trastornos de temperatura corporal elevada, disfunción del apetito, obesidad, anomalías del metabolismo de la glucosa, cardiopatía, estrés, ansiedad y niveles indeseablemente bajos de secreción de ACTH. Los ejemplos no limitativos de trastornos afectivos incluyen depresión, enfermedad maníaco-depresiva y esquizofrenia. Los ejemplos no limitativos de trastornos de temperatura corporal elevada incluyen infecciones y tumores malignos. Los ejemplos no limitativos de cardiopatía incluyen insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, angina de pecho y arritmias. Los ejemplos no limitativos de anomalías del metabolismo de la glucosa incluyen alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperglucemia y diabetes.

Se contempla por la presente divulgación el tratamiento de cualquier estado fisiopatológico en el que se sabe o se sospecha que los análogos de urocortina tienen valor. Los ejemplos no limitativos de estados fisiopatológicos incluyen temperatura corporal elevada, disfunción del apetito, insuficiencia cardíaca congestiva, estrés, ansiedad y niveles indeseablemente bajos de secreción de ACTH.

También se contemplan por la presente invención células huésped transfectadas con un vector de la presente invención. Por ejemplo, la célula huésped puede ser una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula vegetal o una célula de insecto.

También se contemplan kits que incluyen un recipiente sellado que incluye una composición farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los polipéptidos o ácidos nucleicos de la presente divulgación. El kit puede incluir cualquier número de componentes adicionales tal como se comenta a continuación en la memoria descriptiva. En realizaciones particulares, el kit incluye además un agente farmacéutico secundario que puede aplicarse en el tratamiento de un estado fisiopatológico.

Se contempla específicamente que cualquier limitación comentada con respecto a una realización de la divulgación puede aplicarse a cualquier otra realización de la divulgación. Además, cualquier composición de la divulgación puede usarse en cualquier método de la divulgación y cualquier método de la divulgación puede usarse para producir o para utilizar cualquier composición de la divulgación.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para que signifique "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas únicamente o como alternativa son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalde una definición que se refiere sólo a alternativas e "y/o".

En la totalidad de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo y/o método que estén empleándose para determinar el valor.

Tal como se usa en el presente documento la memoria descriptiva, "un/o" o "una" pueden significar uno o más, a menos que se indique claramente lo contrario. Tal como se usa en el presente documento en la(s) reivindicación/reivindicaciones, cuando se usan junto con la expresión "que comprende", los términos "un/o" o "una"

pueden significar uno o más de uno. Tal como se usa en el presente documento “otro” puede significar al menos un segundo o más.

Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

5 La presente invención se basa en parte en la identificación de análogos de urocortina 2 que tienen una capacidad similar para estimular la producción de AMPc en células en comparación con urocortina 2, pero que son de manera sorprendente e inesperada más solubles en agua que urocortina 2. Esta solubilidad en agua aumentada permite una aplicación farmacéutica aumentada de estos agentes, y el tratamiento mejorado de una variedad de estados fisiopatológicos que implican el eje HHS.

10 A. Análogos de urocortina 2

La presente invención incluye polipéptidos que son análogos de urocortina 2 tal como se comentó anteriormente. Todas las secuencias de residuos de aminoácido se representan en el presente documento mediante fórmulas cuya orientación a izquierda y derecha es en la dirección convencional del extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal y mediante abreviaturas de una sola letra. La tabla 1 expone una tabla de los aminoácidos comunes y las abreviaturas conocidos por los expertos habituales en la técnica.

Tabla 1. Aminoácidos

Aminoácidos	Abreviatura de 3 letras	Abreviatura de una sola letra
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

Debe observarse que un guión al comienzo o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácido.

20 Se prefiere que los aminoácidos descritos en el presente documento estén en la forma isomérica “L”. Sin embargo, puede sustituirse cualquier residuo de L-aminoácido por residuos en la forma isomérica “D”, siempre que se conserve la propiedad funcional deseada de unión a inmunoglobulina por el polipéptido. NH₂ en el extremo amino-terminal se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino-terminal de un polipéptido. -OH en el extremo carboxilo-terminal se refiere al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo-terminal de un polipéptido. NH₂ en el extremo carboxilo-terminal se refiere a una amida C-terminal presente en el extremo carboxilo-terminal de un polipéptido.

25 Pueden incorporarse aminoácidos no habituales en proteínas mediante modificación química de aminoácidos existente o mediante síntesis artificial de una proteína. Un aminoácido no habitual se refiere a un aminoácido que difiere en la estructura química de los veinte aminoácidos habituales codificados por el código genético. La modificación postraduccional *in vivo* también puede conducir a la presencia de un aminoácido no habitual o derivado en una proteína. Los grupos NH₂ N-terminal y COOH C-terminal de una proteína también pueden modificarse mediante modificación postraduccional natural o artificial de una proteína.

Diversas realizaciones de la presente divulgación se refieren a métodos para tratar o prevenir un estado fisiopatológico en un sujeto que comprende una composición farmacéutica que comprende un polipéptido o ácido nucleico que codifica para un polipéptido de la presente divulgación tal como se expone en el presente documento.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” es un segmento de aminoácidos consecutivos

de más de dos aminoácidos de longitud. Tal como se expone en el presente documento, los polipéptidos de la presente invención comprenden SEQ ID NO: 1. Los polipéptidos expuestos en el presente documento pueden incluir uno o más aminoácidos unidos al extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1, en los que los aminoácidos son aminoácidos hidrófilos tal como se comentó anteriormente. Además, los polipéptidos expuestos en el presente documento pueden incluir uno o más aminoácidos consecutivos unidos al extremo C-terminal de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido que incluye 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 o cualquier número de aminoácidos consecutivos unidos al extremo C-terminal de SEQ ID NO: 1. El polipéptido puede incluir 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100 o más aminoácidos hidrófilos consecutivos unidos al extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1. Un experto habitual en la técnica sabrá cómo generar un polipéptido de la presente invención en vista de la divulgación usando cualquiera de varios métodos experimentales bien conocidos por los expertos en la técnica.

También están englobadas en la presente divulgación variantes de polipéptido de los polipéptidos tal como se expone en el presente documento. Por ejemplo, las variantes de polipéptido pueden incluir una determinada cantidad de identidad de secuencia en comparación con los polipéptidos de la presente divulgación. Por tanto, por ejemplo, las variantes de polipéptido puede ser variantes que tienen una identidad de aminoácidos del 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99% o más, o cualquier intervalo de identidad de aminoácidos derivable de las mismas, con (1) un polipéptido que consiste en SEQ ID NO: 1 con un resto R (arginina) unido al extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1, (2) SEQ ID NO: 2, (3) SEQ ID NO: 3 o (4) SEQ ID NO: 4.

La presente invención puede utilizar polipéptidos purificados de una fuente natural u obtenidos de material producido de manera recombinante. Los expertos habituales en la técnica sabrán cómo producir estos polipéptidos a partir de material producido de manera recombinante. Este material puede usar los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas de manera natural, o uno o más aminoácidos modificados o no habituales. Generalmente, "purificado" se referirá a una composición que se ha sometido a fraccionamiento para retirar diversas otras proteínas, polipéptidos o péptidos. La purificación puede ser sustancial, en la que el polipéptido o equivalente es la especie predominante, o hasta homogeneidad, nivel de purificación que permitirá una secuenciación degradativa exacta.

También están englobados por la presente divulgación mutantes de secuencias de aminoácidos, y están incluidos dentro de la definición de "variantes de polipéptido". Las variantes de secuencias de aminoácidos del polipéptido pueden ser mutantes de sustitución o mutantes de inserción. Los mutantes de inserción implican normalmente la adición de material en un punto no terminal en el péptido. Esto puede incluir la inserción de unos cuantos residuos, o simplemente un solo residuo. El material añadido puede modificarse, tal como mediante metilación, acetilación, y similares. Alternativamente, pueden añadirse residuos adicionales a los extremos N-terminal o C-terminal del péptido.

Las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido, o por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Un análisis del tamaño, la forma y el tipo de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido revela que arginina, lisina e histidina son todos residuos cargados positivamente; que alanina, glicina y serina son todos de tamaño similar; y que fenilalanina, triptófano y tirosina tienen todos una forma generalmente similar. Por tanto, basándose en estas consideraciones, arginina, lisina e histidina; alanina, glicina y serina; y fenilalanina, triptófano y tirosina; se definen en el presente documento como equivalentes biológicamente funcionales.

B. Proteínas quiméricas

La presente divulgación también se refiere a proteínas quiméricas que incluyen una primera secuencia de aminoácidos que es un análogo de urocortina 2 y una segunda secuencia de aminoácidos unida al extremo N-terminal o C-terminal del análogo de urocortina 2. La segunda secuencia de aminoácidos puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que incluye 2 o más residuos de aminoácido. En algunas realizaciones, la segunda secuencia de aminoácidos es un péptido o polipéptido terapéutico. Los ejemplos incluyen secuencias de aminoácidos que potencian la actividad biológica del análogo de urocortina 2. Los ejemplos incluyen secuencias de aminoácidos que facilitan la penetración del análogo de urocortina 2 a través de la barrera hematoencefálica. Un ejemplo es el dominio de unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad de la apolipoproteína B (Spencer y Verma, 2007). En realizaciones específicas, se usa un sistema de vector lentiviral para suministrar una proteína de fusión que incluye un análogo de urocortina 2 fusionado a un dominio de unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad de la apolipoproteína A. La secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad de la apolipoproteína A incluye los aminoácidos 3371-3409 de ApoB humana (número de registro de GenBank AAH51278), en el presente documento tras SEQ ID NO: 20. Otros ejemplos específicos de secuencias de aminoácidos terapéuticas que facilitan la translocación de secuencias de aminoácidos a través de membranas celulares incluyen la secuencia TAT de VIH (Nagahara *et al.*, 1998), la tercera hélice del homeodominio Antennapedia (Antp) (Derossi *et al.*, 1994) y la proteína estructural de VHS-1, VP22 (Elliott y O'Hare, 1997). En otras realizaciones, la segunda secuencia de aminoácidos es un agente que aumenta la duración de acción del polipéptido de urocortina-2. Un ejemplo no limitativo es una secuencia de aminoácidos que codifica para Fc o un fragmento de la misma. Otra clase de posibles segundas secuencias de aminoácidos incluyen agentes que pueden destruir células. Por ejemplo, la segunda secuencia de aminoácidos puede ser una toxina, tal como gelonina, dodecandrina, tricosantina, tricoquirina, briodina, proteína antiviral de dondiego de noche, proteína de inactivación

ribosómica de cebada (BRIP), proteínas antivirales de fitolaca (PAP), saporinas, lufinas, momordinas, ricina, abrina, toxina diftérica A, subunidad A de toxina pertussis, subunidad A de toxina de enterotoxina de *E. coli*, toxina colérica (CTX) y extremo C-terminal de toxina de *Pseudomonas*.

5 Los dos restos de la proteína quimérica producidos mediante métodos sintéticos o recombinantes pueden conjugarse mediante ligadores según métodos bien conocidos en la técnica (Brinkmann y Pastan, 1994). Tal como se usa en el presente documento, un "ligador" es un componente químico o péptido o polipéptido que une una primera secuencia de aminoácidos con una segunda secuencia de aminoácidos. Los ejemplos no limitativos de ligadores incluyen poliligadores flexibles, tales como uno que se compone de un pentámero de cuatro residuos de glicina consecutivos con un residuo de serina en el extremo C-terminal. Un ligador de este tipo puede repetirse 1 o más veces. Se contempla por la presente divulgación cualquier otros ligador conocido por los expertos habituales en la técnica.

10 Se contempla que pueden implementarse agentes de reticulación para fusionar la primera secuencia de aminoácidos y la segunda secuencia de aminoácidos. Se usan reactivos de reticulación para formar puentes moleculares que unen entre sí grupos funcionales de dos moléculas diferentes. Para unir dos polipéptidos diferentes de manera gradual, pueden usarse agentes de reticulación heterobifuncionales que eliminan la formación no deseada de homopolímeros. Los reactivos de reticulación bifuncionales se han usado extensamente para una variedad de fines incluyendo la preparación de matrices de afinidad, la modificación y estabilización de diversas estructuras, la identificación de sitios de unión y estudios estructurales.

15 En algunas realizaciones, la proteína quimérica se define además como una proteína de fusión. Una "proteína de fusión" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido codificado por un solo polinucleótido recombinante que codifica para la proteína quimérica. Los polipéptidos quiméricos expuestos en el presente documento pueden comprender una secuencia de cualquier número de residuos de aminoácido adicionales o bien en el extremo N-terminal o bien en extremo C-terminal del polipéptido quimérico.

20 "Derivado químico" se refiere a un polipéptido objeto que tiene uno o más residuos derivatizados químicamente mediante reacción de un grupo funcional lateral. Tales polipéptidos derivatizados incluyen, por ejemplo, aquéllos en los que se han derivatizado grupos amino libres para formar amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carboxilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Pueden derivatizarse grupos carboxilo libres para formar sales, ésteres metílicos o etílicos u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los derivados químicos pueden incluir aquellos péptidos que contienen uno o más aminoácidos que se producen de manera natural derivados de los veinte aminoácidos habituales. Por ejemplo, puede sustituirse serina por 4-hidroxi prolina; y puede sustituirse lisina por ornitina. Los péptidos abarcados por la presente divulgación también incluyen péptidos que tienen una o más adiciones y/o deleciones de residuos con relación al péptido específico cuya secuencia se muestra en el presente documento, siempre que el péptido modificado mantenga la actividad biológica requerida.

25 Puede hallarse información adicional referente a urocortina 2 y urocortinas en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.ºs 20080161235, 20070191592, 20070042954, 20050191650 y 20030032587, y las patentes estadounidenses 7.507.794, 7.488.865, 7.459.427, 7.223.846, 7.141.546, 6.838.274, 6.353.152 y 6.214.797.

C. Polinucleótidos que codifican para análogos de urocortina 2

30 En determinadas realizaciones, la presente divulgación se refiere a polinucleótidos que codifican para urocortina 2 o análogos de urocortina 2, y a usos de tales polinucleótidos en métodos tal como se expone en el presente documento.

El polinucleótido puede incluir secuencias de ácido nucleico adicionales que no codifican para un análogo de urocortina 2. Los polinucleótidos pueden derivarse de ADN genómico, por ejemplo, clonarse directamente a partir del genoma de un organismo particular. El polinucleótido puede ser un ADN o un ARN.

35 En algunas realizaciones, los polinucleótidos pueden ser ADN complementario (ADNc). ADNc es ADN preparado usando ARN mensajero (ARNm) como molde. Por tanto, un ADNc no contiene ninguna secuencia codificante interrumpida y habitualmente contiene casi exclusivamente la(s) región/es codificante(s) para la proteína correspondiente. En otras realizaciones, el polinucleótido puede producirse de manera sintética.

40 Puede resultar ventajoso combinar partes del ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar constructos específicos. Por ejemplo, cuando se desea que haya un intrón en el constructo final, será necesario usar un clon genómico. Pueden derivarse intrones de otros genes además de urocortina 2. El ADNc o un polinucleótido sintetizado puede proporcionar sitios de restricción más convenientes para la parte restante del constructo y, por tanto, se usaría para el resto de la secuencia.

45 Los polinucleótidos que codifican para análogos de urocortina 2 pueden ser secuencias de polinucleótido homólogas que se producen de manera natural de otros organismos. Un experto habitual en la técnica entenderá que pueden usarse técnicas experimentales comúnmente disponibles para identificar o sintetizar polinucleótidos que codifican para análogos de urocortina. La presente divulgación también engloba mutantes sintetizados químicamente de estas

secuencias.

Otra clase de variante de secuencia resulta de la variación de codones. Debido a que existen varios codones para la mayor parte de los 20 aminoácidos normales, muchos ADN diferentes pueden codificar para un análogo de urocortina 2. Un experto habitual en la técnica conocerá estas variantes.

- 5 Permitiendo la degeneración del código genético, secuencias que tienen entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 75%, o entre aproximadamente el 76% y aproximadamente el 99% de nucleótidos que son idénticos a los de urocortina 2 pueden considerarse como análogos de urocortina 2 de la presente divulgación. Secuencias que están dentro del alcance de los polinucleótidos usados en los métodos expuestos en el presente documento son aquéllas que pueden producir apareamiento de bases con un segmento de polinucleótido expuesto
- 10 anteriormente en condiciones intracelulares.

Tal como se estableció anteriormente, los polinucleótidos empleados en los métodos expuestos en el presente documento pueden ser copias de ADNc o genómicas de longitud completa, o grandes fragmentos de los mismos. La presente divulgación también puede emplear oligonucleótidos más cortos. Sólo deben aparecer secuencias de 12 bases de largo una vez en el genoma humano y, por tanto, basta con especificar una secuencia diana única.

- 15 En determinadas realizaciones, se desea emplear constructos que incluyen otros elementos, por ejemplo, aquéllos que incluyen propino-pirimidinas C-5. Se ha mostrado que los oligonucleótidos que contienen análogos de propino C-5 de uridina y citidina se unen a ARN con alta afinidad (Wagner y cols., 1993).

Para los análogos de urocortina 2 con una amida C-terminal, la secuencia de ácido nucleico correspondiente sería una secuencia de ácido nucleico que codifica para Gly-X o Gly-X-X, en las que X es o bien Arg o bien Lys.

- 20 En algunas realizaciones, los polinucleótidos expuestos en el presente documento codifican para una proteína quimérica que incluye una primera secuencia de aminoácidos que es un análogo de urocortina 2 y una segunda secuencia de aminoácidos, tal como se comentó anteriormente.

D. Productos farmacéuticos y métodos para el tratamiento de enfermedad

- 25 En realizaciones adicionales, la presente divulgación se refiere a la formulación de uno o más de los polinucleótidos y/o polipéptidos dados a conocer en el presente documento en portadores farmacéuticamente aceptables para la administración a una célula, un tejido, animal, paciente o sujeto o bien solos, o bien en combinación con una o más de otras modalidades de terapia.

- 30 Las composiciones farmacéuticas acuosas de la presente divulgación tendrán una cantidad eficaz de un polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación. Tales composiciones se disolverán o dispersarán generalmente en un portador farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Una "cantidad eficaz", para fines de terapia, se define como la cantidad que provoca una diferencia medible clínicamente en el estado del sujeto. Esta cantidad variará dependiendo de la sustancia, el estado del paciente, el tipo de tratamiento, etc.

- 35 Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción significativa adversa, alérgica o no deseada de otro modo cuando se administran a un animal o ser humano. Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los principios activos, se contempla su uso en las
- 40 composiciones terapéuticas.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tales como aquéllos para inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación programada; y cualquier otra forma usada actualmente, incluyendo cremas, lociones, inhalantes y similares.

- 45 Los compuestos activos de la presente divulgación se formularán con frecuencia para la administración parenteral, por ejemplo, se formularán para inyección por las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea o incluso intraperitoneal. La preparación de una composición acuosa que contiene un polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación solo o en combinación con un agente terapéutico convencional como principios activos lo conocerán los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación. Normalmente, tales composiciones pueden
- 50 prepararse como inyectables, o bien como disoluciones o bien como suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su uso para preparar disoluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

- 55 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En muchos casos, la forma debe ser

estéril y debe ser fluida hasta el grado de que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones para la fabricación y el almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

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

15 Se preparan disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones mediante la incorporación de los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado a vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución esterilizada por filtración anteriormente del mismo.

Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad de modo que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pudiendo emplearse cápsulas de liberación uniforme de fármaco y similares.

25 La composición puede administrarse al sujeto usando cualquier método conocido por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse una cantidad farmacéuticamente eficaz de la composición por vía intravenosa, por vía intracerebral, por vía intracraneal, por vía intratecal, en la sustancia negra o la región de la sustancia negra, por vía intradérmica, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intratraqueal, por vía intranasal, por vía tópica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía oral, localmente, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o mediante otro método o cualquier combinación de los anteriores tal como conocerá por un experto habitual en la técnica (Remington's, 1990).

35 En realizaciones particulares, la composición se administra a un sujeto usando un dispositivo de administración de fármacos. Se contempla cualquier dispositivo de administración de fármacos para su uso en la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación.

40 Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido volverse isotónico en primer lugar con suficiente solución salina, manitol o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que pueden emplearse en vista de la presente divulgación. Por ejemplo, podría disolverse una dosificación en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y o bien añadirse a 1000 ml de fluido para hipodermoclasia o bien inyectarse en un sitio de infusión propuesto (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" (1980)). Se producirá necesariamente cierta variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto que esté tratándose. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

50 En determinados aspectos de los métodos de la divulgación, la vía por la que se administra la composición terapéutica puede ser mediante administración parenteral. La administración parenteral puede ser inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intramedular, ingestión o una combinación de las mismas. En determinados aspectos, la composición que comprende un polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación se administra en desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 microgramos/kg/peso corporal por dosis. En determinados aspectos, la composición se administra en desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 microgramos/kg/peso corporal por dosis. En determinados aspectos, la composición se administra en desde aproximadamente 1,2 hasta aproximadamente 3,6 microgramos/kg/peso corporal por dosis. En determinados aspectos, la composición se administra en desde aproximadamente 1,2 hasta aproximadamente 2,4 microgramos/kg/peso corporal por dosis. En aspectos preferidos, la cantidad de polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación administrada por dosis puede ser de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, aproximadamente 1,0, aproximadamente 1,1, aproximadamente 1,2, aproximadamente 1,3, aproximadamente 1,4, aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6,

aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,1, aproximadamente 2,2, aproximadamente 2,3, aproximadamente 2,4, aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,1, aproximadamente 9,2, aproximadamente 9,3, aproximadamente 9,4, aproximadamente 9,5, aproximadamente 9,6, aproximadamente 9,7, aproximadamente 9,8, aproximadamente 9,9, aproximadamente 10,0 microgramos/kg/peso corporal o más.

Los expertos en la técnica conocen bien la formulación de disoluciones de portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables, como también el desarrollo de regímenes de tratamiento y dosificación adecuados para el uso de las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

El término "administración digestiva" se refiere a la administración, directamente o de otro modo, a una parte del tubo digestivo de un animal. El término "tubo digestivo" se refiere al paso tubular en un animal que funciona en la digestión y la absorción de alimentos y la eliminación de los restos de alimentos, que discurre desde la boca hasta el ano, y todas y cada una de sus partes o segmentos, por ejemplo, la cavidad oral, el esófago, el estómago, el intestino delgado y grueso y el colon, así como partes compuestas del mismo tales como, por ejemplo, el tracto gastrointestinal. Por tanto, el término "tubo digestivo" engloba varias vías de administración incluyendo, pero sin limitarse a, administración oral, rectal, endoscópica y sublingual/bucal. Un requisito común de estos modos de administración es la absorción a lo largo de cierta parte o de todo el tracto digestivo y la necesidad de una penetración mucosa eficaz del agente así administrado.

En determinadas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en el presente documento pueden administrarse mediante administración oral a un animal, paciente o sujeto. Como tal, estas composiciones pueden formularse con un diluyente inerte o con un portador comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o pueden someterse a compresión para dar comprimidos, o pueden incorporarse directamente con los alimentos de la dieta.

Los componentes activos pueden incorporarse incluso con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares (Matiowitz *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998; patentes estadounidenses n.ºs 5.641.515; 5.580.579 y 5.792.451).

Los comprimidos, trociscos, pastillas, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, como goma tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes, tales como fosfato de dicalcio; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante, tal como estearato de magnesio; y puede añadirse un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente aromatizante, tal como menta piperita, aceite de gaulteria o aromatizante de cereza. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un portador líquido. Diversos otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, comprimidos, pastillas o cápsulas pueden recubrirse como goma laca, azúcar, o ambos. Un jarabe de elixir puede contener el componente activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y aromatizante, tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma unitaria de dosificación debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, los compuestos activos pueden incorporarse en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Normalmente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente el 0,1% del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del/de los principio(s) activo(s) puede variarse, por supuesto, y puede ser convenientemente de entre aproximadamente el 1 o el 2% y aproximadamente el 60% o el 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de compuesto(s) activo(s) en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Se contemplarán factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, término de caducidad del producto, así como otras consideraciones farmacológicas por un experto en la técnica de preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y como tal, puede ser deseable una

variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Los agentes terapéuticos administrados por vía oral pueden administrarse a menudo alternativamente por la vía enteral inferior, por ejemplo, a través del orificio anal hacia el recto o intestino delgado. Pueden usarse supositorios rectales, enemas de retención o catéteres rectales para este fin y pueden preferirse cuando el cumplimiento del paciente podría ser de otro modo difícil de lograr (por ejemplo, en aplicaciones pediátricas y geriátricas, o cuando el paciente está vomitando o inconsciente). La administración rectal puede dar como resultado niveles en sangre más rápidos y elevados que la vía oral, pero también puede ser cierto lo contrario (Harvey, 1990). Dado que aproximadamente el 50% del agente terapéutico que se absorbe desde el recto sorteará el hígado, la administración por esta vía reduce significativamente el potencial de metabolismo de primer paso (Benet *et al.*, 1996).

El término "administración parenteral" se refiere a la administración de un agente terapéutico de la divulgación a un animal, paciente o sujeto de manera distinta a a través del tubo digestivo. Se conocen en la técnica medios de preparación y administración de composiciones farmacéuticas parenterales (véase, por ejemplo, Avis, 1990).

La administración intraluminal, para la administración directa de un agente terapéutico a una parte aislada de un órgano o tejido tubular (por ejemplo, tal como una arteria, vena, uréter o uretra), puede desearse para el tratamiento de pacientes con enfermedades o estados que afectan a la luz de tales órganos o tejidos. Para efectuar este modo de administración, se introduce quirúrgicamente un catéter o una cánula por medios apropiados. Tras el aislamiento de una parte del órgano o tejido tubular para el que se busca tratamiento, se infunde una composición que comprende un agente terapéutico de la divulgación a través de la cánula o el catéter en el interior del segmento aislado. Tras la incubación durante desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 120 minutos, tiempo durante el cual se capta el agente terapéutico o está en contacto con las células de la luz interior del vaso, se retira la cánula o el catéter de infusión y se restaura el flujo dentro del órgano o tejido tubular mediante la retirada de las ligaduras que efectuaron el aislamiento de un segmento del mismo (Morishita *et al.*, 1993). También pueden combinarse composiciones terapéuticas de la divulgación con una matriz biocompatible, tal como un material de hidrogel, y aplicarse directamente a tejido vascular *in vivo*.

Puede desearse la administración intraventricular, para la administración directa de un agente terapéutico al cerebro de un paciente, para el tratamiento de pacientes con enfermedades o estados que afectan al cerebro. Un método para efectuar este modo de administración, un catéter de silicio se introduce quirúrgicamente en un ventrículo del cerebro de un paciente humano, y se conecta a una bomba de infusión subcutánea (Medtronic Inc., Minneapolis, Minn.) que se implantado quirúrgicamente en la región abdominal (Zimm *et al.*, 1984; Shaw, 1993). La bomba se usa para inyectar el agente terapéutico y permite ajustes de dosificación precisos y la variación de los programas de dosificación con la ayuda de un dispositivo de programación externo. La capacidad de depósito de la bomba es de 18-20 ml y las velocidades de infusión pueden oscilar entre 0,1 ml/h y 1 ml/h. Dependiendo de la frecuencia de administración, que va de diaria a mensual, y la dosis de fármaco que haya que administrar, que oscila entre 0,01 - 100 microgramos por kg de peso corporal, el depósito de bomba puede rellenarse a intervalos de 3-10 semanas. Puede lograrse el relleno de la bomba mediante punción percutánea del septo de autosellado de la bomba.

Puede desearse la administración de fármaco intratecal, para la introducción de un agente terapéutico en la columna vertebral de un paciente para el tratamiento de pacientes con enfermedades del sistema nervioso central. Para efectuar esta vía de administración, puede implantarse quirúrgicamente un catéter de silicio en el espacio intervertebral lumbar L3-4 de un paciente humano, y se conecta a una bomba de infusión subcutánea que se ha implantado quirúrgicamente en la región abdominal superior (Luer y Hatton, 1993; Ettinger *et al.*, 1978; Yaida *et al.*, 1995). La bomba se usa para inyectar el agente terapéutico y permite ajustes de dosificación precisos y variaciones de los programas de dosis con la ayuda de un dispositivo de programación externo. La dosis administrada puede ser similar a la usada para administración intraventricular.

Para efectuar la administración a zonas distintas al cerebro o la columna vertebral a través de este método, el catéter de silicio está configurado para conectar la bomba de infusión subcutánea, por ejemplo, a la arteria hepática, para la administración al hígado (Kemeny *et al.*, 1993).

La administración vaginal proporciona tratamiento local y evita el metabolismo de primer paso, la degradación por enzimas digestivas y posibles efectos secundarios sistémicos. Pueden usarse supositorios vaginales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., 1990) o pomadas tópicas para efectuar este modo de administración.

En determinadas realizaciones, los inventores contemplan el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente divulgación en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente divulgación pueden formularse para la administración o bien encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula o similar.

Tales formulaciones pueden preferirse para la introducción de formulaciones farmacéuticamente aceptables de los ácidos nucleicos o constructos dados a conocer en el presente documento. La formación y el uso de liposomas se conocen generalmente por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Couvreur *et al.*, 1977; Lasic, 1998; que describe el uso de liposomas y nanocápsulas en la terapia con antibióticos dirigida para enfermedades e infecciones

bacterianas intracelulares). Recientemente, se desarrollaron liposomas con estabilidad sérica y semividas de circulación mejoradas (Gabizon y Papahadjopoulos, 1988; Allen y Choun, 1987; patente estadounidense n.º 5.741.516).

5 Además, se han revisado diversos métodos de preparaciones de liposomas y componentes similares a liposomas como posibles portadores de fármacos (Takakura, 1998; Chandran *et al.*, 1997; Margalit, 1995; patentes estadounidenses n.ºs 5.567.434; 5.552.157; 5.565.213; 5.738.868 y 5.795.587).

10 Se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas con bicapas concéntricas multilaminares (también denominadas vesículas multilaminares (VML). Las VML tienen generalmente diámetros de desde 25 hasta 4 μm . La sonicación de las VML da como resultado la formación de vesículas unilaminares pequeñas (VUP) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 ANG, que contienen una disolución acuosa en el núcleo.

15 El destino y la disposición de liposomas inyectados por vía intravenosa dependen de sus propiedades físicas, tales como el tamaño, la fluidez y la carga de superficie. Pueden persistir en tejidos durante horas o días, dependiendo de su composición, y las semividas en sangre oscilan entre minutos y varias horas. Los liposomas más grandes, tales como VML y VUP, se captan rápidamente por células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, pero la fisiología del sistema circulatorio limita la salida de tales especies grandes en la mayoría de los sitios. Sólo pueden salir en lugares en los que existen grandes aberturas o poros en el endotelio capilar, tales como los sinusoides del hígado o el bazo. Por tanto, estos órganos son el sitio de captación predominante. Por otra parte, las VUP muestran una distribución tisular más amplia pero todavía se secuestran altamente en el hígado y el bazo. En general, este comportamiento *in vivo* limita el posible direccionamiento de liposomas sólo a aquellos órganos y tejidos accesibles por su gran tamaño. Éstos incluyen la sangre, el hígado, el bazo, la médula ósea y los órganos linfoides.

20 Alternativamente, la divulgación prevé formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las composiciones de la presente divulgación. Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de manera estable y reproducible (Baszkin *et al.*, 1987; Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Douglas *et al.*, 1987). Para evitar los efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (dimensionadas en aproximadamente 0,1 μm) deben diseñarse usando polímeros que puedan degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo) biodegradables que satisfacen estos requisitos para su uso en la presente divulgación. Tales partículas pueden prepararse fácilmente, tal como se describe (Couvreur *et al.*, 1980; 1988; zur Muhlen *et al.*, 1998; Zambaux *et al.* 1998; Pinto-Alphandry *et al.*, 1995 y patente estadounidense n.º 5.145.684).

E. Tratamiento de estados fisiopatológicos

1. Definiciones

35 Un "estado fisiopatológico" se define en el presente documento para referirse a una enfermedad o un estado relacionado con la salud. "Tratamiento" y "tratar" tal como se usan en el presente documento se refieren a la administración o aplicación de un agente terapéutico a un sujeto o a la realización de un procedimiento o modalidad en un sujeto con el fin de obtener un beneficio terapéutico de una enfermedad o un estado relacionado con la salud. Por ejemplo, un polipéptido terapéutico de la presente divulgación puede administrarse con el fin de reducir la temperatura en un paciente con temperatura corporal elevada o reducir los síntomas de insuficiencia cardiaca congestiva en un paciente con insuficiencia cardiaca congestiva.

40 El término "beneficio terapéutico" o "terapéuticamente eficaz" tal como se usa en la totalidad de este documento se refiere a cualquier cosa que promueva o potencie el bienestar del sujeto con respecto al tratamiento médico de este estado. Éste incluye, pero no se limita a, una reducción en la frecuencia o la intensidad de los signos o síntomas de una enfermedad.

45 "Prevención" y "prevenir" se usan según su significado habitual y sencillo para significar "actuar antes" o una acción de este tipo. En el contexto de una enfermedad o un estado relacionado con la salud particular, esos términos se refieren a la administración o aplicación de un agente, fármaco o remedio a un sujeto o a la realización de un procedimiento o modalidad en un sujeto con el fin de bloquear la aparición de una enfermedad o un estado relacionado con la salud.

2. Estados fisiopatológicos que van a tratarse o prevenirse

50 Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente divulgación pueden aplicarse en el tratamiento o la prevención de cualquier enfermedad o estado relacionado con la salud. La enfermedad o el estado relacionado con la salud puede ser cualquier enfermedad o estado relacionado con la salud para el que se sabe o se sospecha que la administración de los polipéptidos o polinucleótidos de la presente divulgación tiene valor. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, temperatura corporal elevada, disfunción del apetito, insuficiencia cardiaca congestiva, estrés, ansiedad y niveles indeseablemente bajos de secreción de ACTH.

3. Tratamiento secundario

Determinadas realizaciones de la presente divulgación prevén la administración o aplicación de una o más formas secundarias de terapias para el tratamiento o la prevención de un estado fisiopatológico.

La forma secundaria de terapia puede ser la administración de uno o más agentes farmacológicos secundarios que pueden aplicarse en el tratamiento o la prevención de un estado fisiopatológico.

- 5 Si la terapia secundaria es un agente farmacológico, éste puede administrarse antes de, de manera concurrente o tras la administración del polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación.

El intervalo entre el polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación y la terapia secundaria puede ser cualquier intervalo según lo determinen los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, el intervalo puede ser de minutos a semanas. En realizaciones en las que los agentes se administran por separado, se garantizaría generalmente que no pase un periodo de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de tal manera que cada agente terapéutico todavía debería poder ejercer un efecto combinado ventajosamente sobre el sujeto. Por ejemplo, el intervalo entre agentes terapéuticos puede ser de aproximadamente 12 h a aproximadamente 24 h entre sí y, más preferiblemente, en el plazo de aproximadamente 6 h a aproximadamente 12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable ampliar el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente, sin embargo, transcurriendo de varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8) entre las administraciones respectivas. En algunas realizaciones, el momento de la administración de un agente terapéutico secundario se determina basándose en la respuesta del sujeto al polipéptido o polinucleótido de la presente divulgación.

F. Kits y diagnóstico

20 En diversos aspectos de la divulgación, se prevé un kit que contiene uno o más polipéptidos o polinucleótidos de la presente divulgación. En algunas realizaciones, la presente divulgación contempla un kit para preparar y/o administrar una terapia de la divulgación. El kit puede comprender uno o más viales sellados que contienen cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación. En algunas realizaciones, el kit también puede comprender un medio de recipiente adecuado, que es un recipiente que no reaccionará con componentes del kit, tal como un tubo Eppendorf, una placa de ensayo, una jeringa, un frasco o un tubo. El recipiente puede estar compuesto por materiales esterilizables tales como plástico o vidrio.

El kit puede incluir además una hoja de instrucciones que expone brevemente uno o más métodos de la divulgación, y se seguirán sustancialmente los mismos procedimientos descritos en el presente documento o conocidos por los expertos habituales. La información de instrucciones puede estar en un medio legible por ordenador que contiene instrucciones legibles por máquina que, cuando se ejecutan usando un ordenador, provocan la visualización de un procedimiento real o virtual de administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente terapéutico.

G. Animales transgénicos no humanos

Los animales transgénicos no humanos y las líneas celulares derivadas de tales animales pueden encontrar uso en determinados experimentos de prueba. En una realización de la divulgación, se producen animales transgénicos no humanos que contienen un transgén funcional que codifica para un polipéptido de la presente divulgación. Tales animales transgénicos no humanos pueden ser útiles en métodos para identificar aplicaciones terapéuticas adicionales de los polipéptidos reivindicados. Los animales transgénicos no humanos de la presente divulgación también puede usarse como modelos para estudiar indicaciones.

En una realización de la divulgación, se introduce un transgén en un huésped no humano para producir un animal transgénico que expresa un polipéptido de la presente divulgación. Se producen los animales transgénicos no humanos mediante la integración del transgén en el genoma de manera que permite la expresión del transgén. Se describen generalmente métodos para producir animales transgénicos en Wagner y Hoppe (patente estadounidense n.º 4.873.191), Brinster *et al.* (1985) y en "Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual" (1994)).

Pueden producirse animales transgénicos no humanos mediante cualquier método conocido por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse a partir de los óvulos fecundados de varios animales incluyendo, pero sin limitarse a reptiles, anfibios, aves, mamíferos y peces. Dentro de una realización particular, se generan ratones transgénicos que sobreexpresan un polipéptido de la presente divulgación.

H. Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar realizaciones preferidas de la divulgación. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas dadas a conocer en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

EJEMPLO 1 Identificación de polipéptidos de urocortina 2 biológicamente activos

Se sobreexpresaron precursores de urocortina 2 en diversas líneas celulares, y se evaluó su función. Se infectaron

5 líneas celulares de páncreas y piel con lentivirus con urocortina 2 de ratón (mUcn 2). La secuencia de aminoácidos de urocortina 2 de ratón se proporciona como SEQ ID NO: 10. Se encontró que las células secretaban un precursor y una zona procesada más pequeña que contenía un péptido de urocortina: R⁰mUcn 2 (SEQ ID NO: 11) que estaba amidado en el extremo C-terminal. Se sintetizó el péptido y se determinó su bioactividad mediante la estimulación de la acumulación de AMPc en células A7r5, que expresan CRFR2. Se encontró que el péptido R⁰mUcn 2 era equipotente a mUcn 2(1-38), con CE₅₀ de 0,05 (0,028-0,1)² nM y 0,07 (0,03 - 0,15)¹¹ nM, respectivamente. Es posible que R⁰mUcn 2 pudiera procesarse adicionalmente por aminopeptidasas para dar mUcn 2(1-38). Se representa con un superíndice el número de ensayos.

10 Se sintetizó el análogo humano correspondiente, R⁰hUcn 2. Se encontró que este péptido era equipotente a hUcn 2(1-38) en la capacidad para estimular la acumulación de AMPc en células A7r5, con CE₅₀ de 0,027 (0,023-0,031)² nM y 0,11 (0,058-0,21)¹¹ nM, respectivamente.

15 Un péptido extendido con un residuo hidrófilo de arginina tal como R⁰hUcn 2 es probablemente más soluble, y por tanto, un mejor agente farmacéutico, que hUcn 2(1-38). Como prueba del aumento de la solubilidad, la HPLC de fase inversa de QC usando un sistema de disolventes de ácido trifluoroacético/acetonitrilo mostró que el tiempo de retención de hUcn 2(1-38) era de 16,9 minutos mientras que el tiempo de retención de R⁰hUcn 2 era de 13,9 minutos, demostrando una hidrofiliidad aumentada significativamente para el análogo extendido con arginina. La tabla 2 proporciona información de secuencia de secuencias de Ucn 2 seleccionadas.

Tabla 2. Información de secuencia

Péptido	Identificador de secuencia	Secuencia
hUcn 2-OH	SEQ ID NO: 1	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV
hUcn 2-G-OH	SEQ ID NO: 2	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV G
hUcn 2-GH-OH	SEQ ID NO: 3	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV GH
hUcn 2-GHC-OH	SEQ ID NO: 4	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV GHC
hUcn 2	SEQ ID NO: 5	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV- NH ₂ (amidado en el extremo C-terminal)
R ⁰ -hUcn	SEQ ID NO: 6	RIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILAR V-NH ₂ (amidado en el extremo C-terminal)
SRP (HPGSR-hUcn 2)	SEQ ID NO: 7	HPGSRIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARI LARV-NH ₂ (amidado en el extremo C-terminal)
[Cys ^{1,51} (Acm)]-hUcn 2(1-51)- OH	SEQ ID NO: 8	CSPTRHPGSRIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQAT TNARILARVGH
Prohormona de hUcn 2	SEQ ID NO: 9	IPTFQLRPQNSPQTTPRPAASESPSAAPTWPWAAQSHC SPTRHPGSRIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATT NARILARV-NH ₂ (amidado en el extremo C-terminal)
mUcn2 - OH	SEQ ID NO: 21	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV
mUcn 2	SEQ ID NO: 10	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV (amidado en el extremo C-terminal)
R ⁰ -mUcn 2	SEQ ID NO: 11	RVILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAH V (amidado en el extremo C-terminal)
prohormona de mUcn 2 -OH	SEQ ID NO: 22	RVILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAH V
prohormona de mUcn 2	SEQ ID NO: 12	TPIPTFQLLPQNSLETPSSVTSESSSGTTTGPSASWSNS KASPYLDTRVILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAA TNAQILAHV (amidado en el extremo C-terminal)

R ⁰ -hUcn 2 - G-OH	SEQ ID NO: 13	RIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILAR VG
R ⁰ - hUcn 2-GH-OH	SEQ ID NO: 14	RIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILAR VGH
R ⁰ - hUcn 2-GHC-OH	SEQ ID NO: 15	RIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILAR VGHC
prohormona de hUcn 2 - G-OH	SEQ ID NO: 16	IPTFQLRPQNSPQTTPRPAASESPSAAPTWPWAAQSHC SPTRHPGSRIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATT NARILARVG
prohormona de hUcn 2 - GH-OH	SEQ ID NO: 17	IPTFQLRPQNSPQTTPRPAASESPSAAPTWPWAAQSHC SPTRHPGSRIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATT NARILARVGH
prohormona de hUcn 2 - GHC-OH	SEQ ID NO: 18	IPTFQLRPQNSPQTTPRPAASESPSAAPTWPWAAQSHC SPTRHPGSRIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATT NARILARVGHC
prohormona de hUcn 2 -OH	SEQ ID NO: 19	IPTFQLRPQNSPQTTPRPAASESPSAAPTWPWAAQSHC SPTRHPGSRIVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATT NARILARV

La tabla 3 muestra una comparación de secuencias de aminoácidos y bioactividad de análogos de péptidos de Ucn 2 humanos o humanos sintéticos seleccionados. Se calcularon las CE₅₀ basándose en la determinación de proteína mediante inmunoensayo y la altura del pico cromatográfico.

Tabla 3. Bioactividad de análogos/péptidos de Ucn 2 de ratón o ser humano sintéticos seleccionados

Péptido	IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	AMPc A7r5 (CE ₅₀ , nM) [Número de ensayos]
hUcn2-OH	SEQ ID NO: 1	90,4 (47-172) [3]
hUcn 2-G-OH	SEQ ID NO: 2	6,3 (3,4-11,5) [2]
hUcn 2-GH-OH	SEQ ID NO: 3	2,9 (0,93-9,1) [2]
hUcn 2-GHC-OH	SEQ ID NO: 4	13,9 (11,3-17) [2]
hUcn 2	SEQ ID NO: 5	0,11 (0,058-0,21) [11]
R ⁰ - hUcn 2	SEQ ID NO: 6	0,027 (0,023-0,031) [2]
SRP (HPGSR-hUcn 2)	SEQ ID NO: 7	0,09 (0,033-0,22) [2]
[Cys1,51 (Acm)]-hUcn 2(1-51)-OH	SEQ ID NO: 8	9,5 (3,3-26,8) [3]
Prohormona de hUcn 2	SEQ ID NO: 9	2,3 (1,8 - 3) [2]
mUcn 2	SEQ ID NO: 10	0,07 (0,03 - 0,15) [11]
R ⁰ -mUcn 2	SEQ ID NO: 11	0,05 (0,03 - 0,1) [2]
Prohormona de mUcn 2	SEQ ID NO: 12	0,53 (0,4 - 0,8) [2]

- 5 Todos los métodos dados a conocer y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin excesiva experimentación en vista de la presente divulgación.

Resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a los métodos descritos en el presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, resultará evidente que pueden sustituirse los agentes descritos en el presente documento por determinados agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente a la vez que podrán lograrse resultados iguales o similares. Se considera que todos de tales sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

10

Bibliografía

- Patente estadounidense 4.659.774
- Patente estadounidense 4.682.195
- Patente estadounidense 4.683.202
- 5 Patente estadounidense 4.816.571
- Patente estadounidense 4.873.191
- Patente estadounidense 4.879.236
- Patente estadounidense 4.959.463
- Patente estadounidense 5.141.813
- 10 Patente estadounidense 5.145.684
- Patente estadounidense 5.264.566
- Patente estadounidense 5.428.148
- Patente estadounidense 5.552.157
- Patente estadounidense 5.554.744
- 15 Patente estadounidense 5.565.213
- Patente estadounidense 5.567.434
- Patente estadounidense 5.574.146
- Patente estadounidense 5.580.579
- Patente estadounidense 5.602.244
- 20 Patente estadounidense 5.641.515
- Patente estadounidense 5.645.897
- Patente estadounidense 5.705.629
- Patente estadounidense 5.738.868
- Patente estadounidense 5.741.516
- 25 Patente estadounidense 5.792.451
- Patente estadounidense 5.795.587
- Patente estadounidense 5.871.986
- Patente estadounidense 6.214.797
- Patente estadounidense 6.353.152
- 30 Patente estadounidense 6.838.274
- Patente estadounidense 7.141.546
- Patente estadounidense 7.223.846
- Patente estadounidense 7.459.427
- Patente estadounidense 7.488.865
- 35 Patente estadounidense 7.507.794
- Publicación de patente estadounidense 20030032587
- Publicación de patente estadounidense 20050191650

- Publicación de patente estadounidense 20070042954
- Publicación de patente estadounidense 20070191592
- Publicación de patente estadounidense 20080161235
- Allen y Choun, *FEBS Lett.*, 223(1):42-46, 1987.
- 5 Avis, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., Gennaro (Ed.), Mack Publishing Co., Pa., 84:1545-1569, 1990.
- Baichwal y Sugden, En: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, NY, 117-148, 1986.
- Baszkin *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 39(12):973-977, 1987.
- Benet *et al.*, En: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman *et al.* (Eds.), McGraw-Hill, NY, cap. 1, 9ª ed., 1996.
- 10 Benvenisty y Neshif, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(24):9551-9555, 1986.
- Brinster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(13):4438-4442, 1985.
- Chandran *et al.*, *Indian J. Exp. Biol.*, 35(8):801-809., 1997.
- Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Coffin, en: *Virology*, Campos *et al.* (Eds.), Raven Press, NY, 1437-1500, 1990.
- 15 Coupar *et al.*, *Gene*, 68:1-10, 1988.
- Couvreur *et al.*, *FEBS Lett.*, 84(2):323-326, 1977.
- Couvreur *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 69(2):199-202, 1980.
- Couvreur, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 5(1):1-20, 1988.
- Davidson *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 77(2):141-50, 2009.
- 20 Derossi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(14):10444-10450, 1994.
- Douglas *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 3(3):233-61, 1987.
- Dubensky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984
- Elliott y O'Hare, *Cell*, 88(2):223-233, 1997.
- Documento EP 266.032
- 25 Documento EPO 0273085.
- Ettinger *et al.*, *Cancer*, 41:1270, 1978.
- Fechheimer *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- 30 Freshner, 1992 *Friedmann*, *Science*, 244:1275-1281, 1989.
- Froehler *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 14:5399-5407, 1986.
- Gabizon y Papahadjopoulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(18):6949-6953, 1988.
- Ghosh y Bachhawat, en: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- 35 Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham y Prevec, *Biotechnology*, 20:363-390, 1992.

- Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36(1):59-74, 1977.
- Grunhaus y Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- Grunhaus y Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.
- 5 Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Harvey, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a ed., Gennaro Ed.), Mack Publishing Co., Pa., 35:711, 1990.
- Hermonat y Muzycska, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.
- Herz y Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.
- Horwich *et al.* *J. Virol.*, 64:642-650, 1990.
- 10 Hsu y Hsueh, *Nat. Med.*, 7605-611, 2001.
- Hwang *et al.*, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 15(3):243-284, 1998.
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kemeny *et al.*, *Cancer*, 71:1964, 1993.
- 15 Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987.
- Lasic, *Trends Biotechnol.*, 16(7):307-321, 1998.
- Lawrence y Latchman, *Mini Rev. Med. Chem.*, 6(10):1119-26, 2006.
- Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259:988-990, 1993.
- Levrero *et al.*, *Gene*, 101:195-202, 1991.
- 20 Luer y Hatton, en: *The Annals of Pharmacotherapy*, 27:912, 1993. *Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual*, 2^a Ed., Hogan *et al.*, (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994
- Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983.
- Margalit, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 12(2-3):233-261, 1995.
- Matiowitz *et al.*, *Nature*, 386(6623):410-414, 1997.
- 25 Morishita *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8474, 1993.
- Nagahara *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 275(4 Pt 1):G740-G748, 1998.
- Nagahara *et al.*, *Nat. Med.*, 4(12):1449-1452, 1998
- Nicolas y Rubenstein, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, págs. 494-513, 1988.
- 30 Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Paskind *et al.*, *Virology*, 67:242-248, 1975.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Pinto-Alphandary *et al.*, *J. Drug Target*, 3(2):167-169, 1995.
- 35 Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Quintanar-Guerrero *et al.*, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24(12):1113-28, 1998.
- Raddino *et al.*, *G. Ital. Cardiol (Rome)*, 8(4):236-245, 2007

- Ragot *et al.*, *Nature*, 361:647-650, 1993.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed., 33:624-652, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- 5 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Gennaro (Ed.), MachPublishing Co., Block, capítulo 87:1609-1614, 1990.
- Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
- Ridgeway, en: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez *et al.* (Eds.), Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- 10 Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252:431-434, 1991.
- Rosenfeld, *et al.*, *Cell*, 68:143-155, 1992.
- Sambrook *et al.*, en: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Shaw, *Cancer*, 72(11):3416, 1993.
- 15 Stratford-Perricaudet y Perricaudet, en: *Human Gene Transfer*, Eds, Cohen-Haguenaer y Boiron, John Libbey Eurotext, Francia, 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1:241-256, 1990.
- Takakura, *Nippon Rinsho.*, 56(3):691-695, 1998.
- Temin, en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- 20 Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu y Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- 25 Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Yaida *et al.*, *Regul. Pept.*, 59:193, 1995.
- Yang y Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- Yang *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-4148, 1990.
- Zambaux *et al.*, *J. Control Release*, 50(1-3):31-40, 1998.
- 30 Zelenin *et al.*, *FEBS Lett.*, 287(1-2):118-120, 1991.
- Zimm *et al.*, *Cancer Research*, 44:1698, 1984.
- zur Muhlen *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 45(2):149-155, 1998.

Lista de secuencias

- <110> VALE, JR., WILIE W.
- 35 VAUGHAN, JOAN
- DONALDSON, CINDY
- FISCHER, WOLFGANG
- RIVIER, JEAN E.

<120> ANÁLOGOS DE UROCORTINA 2 Y USOS DE LOS MISMOS

<130> CLFR.P0343WO

<140> DESCONOCIDO

<141> 27-08-2010

5 <150> Documento 61/237.995

<151> 28-08-2009

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <400> 1

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala
20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Val
35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala
20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Val Gly
35

25 <210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5 <400> 3

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala
20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Val Gly His
35 40

<210> 4

<211> 41

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala
20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Val Gly His Cys
35 40

15 <210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

<223> AMIDACIÓN

25 <400> 5

ES 2 545 794 T3

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu
 1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala
 20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Val
 35

<210> 6

<211> 39

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

10 <221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> AMIDACIÓN

<400> 6

Arg Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn
 20 25 30

Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val
 35

15 <210> 7

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (43)..(43)

<223> AMIDACIÓN

25 <400> 7

His Pro Gly Ser Arg Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Ile Leu Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln
 20 25 30

Ala Thr Thr Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val
 35 40

<210> 8

<211> 51

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 8

Cys Ser Pro Thr Arg His Pro Gly Ser Arg Ile Val Leu Ser Leu Asp
 1 5 10 15

Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg
 20 25 30

Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val
 35 40 45

Gly His Cys
 50

10 <210> 9

<211> 85

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (85)..(85)

<223> AMIDACIÓN

20 <400> 9

ES 2 545 794 T3

Ile Pro Thr Phe Gln Leu Arg Pro Gln Asn Ser Pro Gln Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Pro Ala Ala Ser Glu Ser Pro Ser Ala Ala Pro Thr Trp Pro Trp
20 25 30

Ala Ala Gln Ser His Cys Ser Pro Thr Arg His Pro Gly Ser Arg Ile
35 40 45

Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu Glu
50 55 60

Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala Arg
65 70 75 80

Ile Leu Ala Arg Val
85

<210> 10

<211> 38

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (38)..(38)

<223> AMIDACIÓN

<400> 10

Val Ile Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Arg Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Arg Asn Gln Ala Ala Thr Asn Ala
20 25 30

Gln Ile Leu Ala His Val
35

<210> 11

15 <211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> AMIDACIÓN

5 <400> 11

Arg Val Ile Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Arg Ile Leu
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Arg Asn Gln Ala Ala Thr Asn
20 25 30

Ala Gln Ile Leu Ala His Val
35

<210> 12

<211> 87

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

15 <222> (87)..(87)

<223> AMIDACIÓN

<400> 12

Thr Pro Ile Pro Thr Phe Gln Leu Leu Pro Gln Asn Ser Leu Glu Thr
1 5 10 15

Thr Pro Ser Ser Val Thr Ser Glu Ser Ser Ser Gly Thr Thr Thr Gly
20 25 30

Pro Ser Ala Ser Trp Ser Asn Ser Lys Ala Ser Pro Tyr Leu Asp Thr
35 40 45

Arg Val Ile Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Arg Ile Leu
50 55 60

Leu Glu Gln Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Arg Asn Gln Ala Ala Thr Asn
65 70 75 80

Ala Gln Ile Leu Ala His Val
85

<210> 13

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido sintético

<400> 13

Arg Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn
20 25 30

Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val Gly
35 40

<210> 14

<211> 41

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 14

Arg Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn
20 25 30

Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val Gly His
35 40

<210> 15

<211> 42

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 15

ES 2 545 794 T3

Arg Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn
20 25 30

Ala Arg Ile Leu Ala Arg Val Gly His Cys
35 40

<210> 16

<211> 86

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 16

Ile Pro Thr Phe Gln Leu Arg Pro Gln Asn Ser Pro Gln Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Pro Ala Ala Ser Glu Ser Pro Ser Ala Ala Pro Thr Trp Pro Trp
20 25 30

Ala Ala Gln Ser His Cys Ser Pro Thr Arg His Pro Gly Ser Arg Ile
35 40 45

Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu Glu
50 55 60

Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala Arg
65 70 75 80

Ile Leu Ala Arg Val Gly
85

10 <210> 17

<211> 87

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 17

ES 2 545 794 T3

Ile Pro Thr Phe Gln Leu Arg Pro Gln Asn Ser Pro Gln Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Pro Ala Ala Ser Glu Ser Pro Ser Ala Ala Pro Thr Trp Pro Trp
20 25 30

Ala Ala Gln Ser His Cys Ser Pro Thr Arg His Pro Gly Ser Arg Ile
35 40 45

Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu Glu
50 55 60

Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala Arg
65 70 75 80

Ile Leu Ala Arg Val Gly His
85

<210> 18

<211> 88

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 18

Ile Pro Thr Phe Gln Leu Arg Pro Gln Asn Ser Pro Gln Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Pro Ala Ala Ser Glu Ser Pro Ser Ala Ala Pro Thr Trp Pro Trp
20 25 30

Ala Ala Gln Ser His Cys Ser Pro Thr Arg His Pro Gly Ser Arg Ile
35 40 45

Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu Glu
50 55 60

Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala Arg
65 70 75 80

Ile Leu Ala Arg Val Gly His Cys
85

10

<210> 19

<211> 85

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 19

Ile Pro Thr Phe Gln Leu Arg Pro Gln Asn Ser Pro Gln Thr Thr Pro
1 5 10 15

Arg Pro Ala Ala Ser Glu Ser Pro Ser Ala Ala⁴ Pro Thr Trp Pro Trp
20 25 30

Ala Ala Gln Ser His Cys Ser Pro Thr Arg His Pro Gly Ser Arg Ile
35 40 45

Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu Glu
50 55 60

Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala Arg
65 70 75 80

Ile Leu Ala Arg Val
85

5 <210> 20

<211> 825

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Asp Pro Pro Arg Pro Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Gly Ala Arg Ala Glu Glu Glu Met Leu Glu Asn Val
20 25 30

Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala Thr Arg Phe Lys His Leu Arg Lys
35 40 45

Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Ala Glu Ser Ser Ser Gly Val Pro Gly Thr
50 55 60

Ala Asp Ser Arg Ser Ala Thr Arg Ile Asn Cys Lys Val Glu Leu Glu
65 70 75 80

10

ES 2 545 794 T3

Val Pro Gln Leu Cys Ser Phe Ile Leu Lys Thr Ser Gln Cys Ile Leu
85 90 95

Lys Glu Val Tyr Gly Phe Asn Pro Glu Gly Lys Ala Leu Leu Lys Lys
100 105 110

Thr Lys Asn Ser Glu Glu Phe Ala Ala Ala Met Ser Arg Tyr Glu Leu
115 120 125

Lys Leu Ala Ile Pro Glu Gly Lys Gln Val Phe Leu Tyr Pro Glu Lys
130 135 140

Asp Glu Pro Thr Tyr Ile Leu Asn Ile Lys Arg Gly Ile Ile Ser Ala
145 150 155 160

Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys Gln Val Leu Phe Leu
165 170 175

Asp Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe Thr Val Lys Thr Arg
180 185 190

Lys Gly Asn Val Ala Thr Glu Ile Ser Thr Glu Arg Asp Leu Gly Gln
195 200 205

Cys Asp Arg Phe Lys Pro Ile Arg Thr Gly Ile Ser Pro Leu Ala Leu
210 215 220

Ile Lys Gly Met Thr Arg Pro Leu Ser Thr Leu Ile Ser Ser Ser Gln
225 230 235 240

Ser Cys Gln Tyr Thr Leu Asp Ala Lys Arg Lys His Val Ala Glu Ala
245 250 255

Ile Cys Lys Glu Gln His Leu Phe Leu Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Lys
260 265 270

Tyr Gly Met Val Ala Gln Val Thr Gln Thr Leu Lys Leu Glu Asp Thr
275 280 285

Pro Lys Ile Asn Ser Arg Phe Phe Gly Glu Gly Thr Lys Lys Met Gly
290 295 300

Leu Ala Phe Glu Ser Thr Lys Ser Thr Ser Pro Pro Lys Gln Ala Glu
305 310 315 320

Ala Val Leu Lys Thr Leu Gln Glu Leu Lys Lys Leu Thr Ile Ser Glu
325 330 335

Gln Asn Ile Gln Arg Ala Asn Leu Phe Asn Lys Leu Val Thr Glu Leu

ES 2 545 794 T3

			340						345							350
Arg	Gly	Leu	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Thr	Ser	Leu	Leu	Pro	Gln	Leu	Ile	
		355					360					365				
Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Ile	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	Val	Gln	Cys	Gly	Gln	
	370					375					380					
Pro	Gln	Cys	Ser	Thr	His	Ile	Leu	Gln	Trp	Leu	Lys	Arg	Val	His	Ala	
385					390					395					400	
Asn	Pro	Leu	Leu	Ile	Asp	Val	Val	Thr	Tyr	Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Pro	
				405					410					415		
Glu	Pro	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Arg	Glu	Ile	Phe	Asn	Met	Ala	Arg	Asp	
			420					425					430			
Gln	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ser	His	Ala	Val	Asn	Asn	
		435					440					445				
Tyr	His	Lys	Thr	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Gln	Glu	Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	
	450					455					460					
Asn	Tyr	Leu	Met	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Asp	Cys	Thr	Gly	Asp	Glu	Asp	
465					470					475					480	
Tyr	Thr	Tyr	Leu	Ile	Leu	Arg	Val	Ile	Gly	Asn	Met	Gly	Gln	Thr	Met	
				485					490					495		
Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Glu	Leu	Lys	Ser	Ser	Ile	Leu	Lys	Cys	Val	Gln	
			500					505					510			
Ser	Thr	Lys	Pro	Ser	Leu	Met	Ile	Gln	Lys	Ala	Ala	Ile	Gln	Ala	Leu	
		515					520					525				
Arg	Lys	Met	Glu	Pro	Lys	Asp	Lys	Asp	Gln	Glu	Val	Leu	Leu	Gln	Thr	
	530					535					540					
Phe	Leu	Asp	Asp	Ala	Ser	Pro	Gly	Asp	Lys	Arg	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	
545					550					555					560	
Met	Leu	Met	Arg	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Asp	Ile	Asn	Lys	Ile	Val	Gln	
				565					570					575		
Ile	Leu	Pro	Trp	Glu	Gln	Asn	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Phe	Val	Ala	Ser	
			580					585					590			
His	Ile	Ala	Asn	Ile	Leu	Asn	Ser	Glu	Glu	Leu	Asp	Ile	Gln	Asp	Leu	
		595					600					605				

ES 2 545 794 T3

Lys Lys Leu Val Lys Glu Ala Leu Lys Glu Ser Gln Leu Pro Thr Val
610 615 620

Met Asp Phe Arg Lys Phe Ser Arg Asn Tyr Gln Leu Tyr Lys Ser Val
625 630 635 640

Ser Leu Pro Ser Leu Asp Pro Ala Ser Ala Lys Ile Glu Gly Asn Leu
645 650 655

Ile Phe Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Met Leu Lys Thr
660 665 670

Thr Leu Thr Ala Phe Gly Phe Ala Ser Ala Asp Leu Ile Glu Ile Gly
675 680 685

Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu Ala Leu Phe Gly Lys
690 695 700

Gln Gly Phe Phe Pro Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Tyr Trp Val Asn
705 710 715 720

Gly Gln Val Pro Asp Gly Val Ser Lys Val Leu Val Asp His Phe Gly
725 730 735

Tyr Thr Lys Asp Asp Lys His Glu Gln Asp Met Val Asn Gly Ile Met
740 745 750

Leu Ser Val Glu Lys Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Lys Glu Val Pro
755 760 765

Glu Ala Arg Ala Tyr Leu Arg Ile Leu Gly Glu Glu Leu Gly Phe Ala
770 775 780

Ser Leu His Asp Leu Gln Leu Leu Gly Lys Leu Leu Leu Met Asp Arg
785 790 795 800

Pro Asp Ser Leu Thr Ile Pro Ala Ala Gln Ala Arg Lys Asp Ala Cys
805 810 815

Thr Phe Phe Arg Asp Gly Gly Leu Pro
820 825

<210> 21

<211> 38

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 21

Val Ile Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Arg Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Arg Asn Gln Ala Ala Thr Asn Ala
20 25 30

Gln Ile Leu Ala His Val
35

5 <210> 22

<211> 39

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético

<400> 22

Arg Val Ile Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Arg Ile Leu
1 5 10 15

Leu Glu Gln Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Arg Asn Gln Ala Ala Thr Asn
20 25 30

Ala Gln Ile Leu Ala His Val
35

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de fórmula (I):
 Z_1-Z_2 (I)
en la que Z_1 es
 - 5 (i) un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en R y K o
 - (ii) una serie consecutiva de 2-20 aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en R y K;
y
 Z_2 es SEQ ID NO: 1,
10 siempre que el extremo carboxi-terminal de Z_1 se una covalentemente al extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1.
2. Ácido nucleico recombinante que codifica para el polipéptido según la reivindicación 1.
3. Polipéptido según la reivindicación 1 o ácido nucleico según la reivindicación 2, en el que Z_1 es arginina (R).
4. Polipéptido según la reivindicación 1 ó 3, en el que el polipéptido se define además como que está amidado en el extremo C-terminal.
- 15 5. Polipéptido según la reivindicación 4, en el que el polipéptido es SEQ ID NO: 6.
6. Polipéptido quimérico que comprende:
 - a) una primera secuencia de aminoácidos que es un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5; y
 - 20 b) una segunda secuencia de aminoácidos, en el que la segunda secuencia de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos terapéutica.
7. Polipéptido quimérico según la reivindicación 6, en el que la segunda secuencia de aminoácidos potencia la biodisponibilidad de la primera secuencia de aminoácidos.
8. Polipéptido quimérico según la reivindicación 7, en el que la segunda secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en un dominio de unión al receptor de lipoproteínas de baja densidad de la apolipoproteína B (SEQ ID NO: 20), una secuencia de aminoácidos de Fc o una toxina.
- 25 9. Polinucleótido que codifica para un polipéptido quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y
 - 30 a) el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5 o el ácido nucleico recombinante según la reivindicación 2 ó 3; o
 - b) un polipéptido quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 o un polinucleótido según la reivindicación 9.
11. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5 o ácido nucleico según la reivindicación 2 ó 3 para su uso en el tratamiento de un estado fisiopatológico en un sujeto, en el que
 - 35 a) dicho polipéptido o dicho ácido nucleico; y
 - b) un portador farmacéutico aceptable
va a administrarse al sujeto.
12. Polipéptido o ácido nucleico para su uso según la reivindicación 11, en el que el sujeto es un mamífero.
13. Polipéptido o ácido nucleico para su uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que el estado fisiopatológico se selecciona del grupo que consiste en temperatura corporal elevada, disfunción del apetito, insuficiencia cardiaca congestiva, estrés, ansiedad y niveles indeseablemente bajos de secreción de ACTH.
- 40 14. Vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho vector comprende además elementos reguladores necesarios para la expresión de dicha secuencia de

ácido nucleico en una célula, preferiblemente un vector viral, seleccionado de un vector adenoviral, un vector lentiviral o un vector de virus adenoasociado.

15. Célula huésped transfectada con el vector según la reivindicación 14, en la que dicha célula se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula vegetal o una célula de insecto.

5