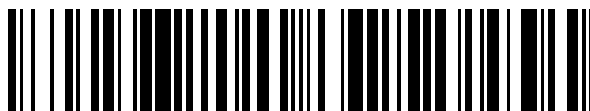


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 634**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2008 E 08853261 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2225272**

54 Título: **Péptidos derivados de NCAM (FGLs)**

30 Prioridad:

28.11.2007 DK 200701691

18.12.2007 DK 200701813

29.02.2008 US 32683 P

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

15.02.2016

73 Titular/es:

ENKAM PHARMACEUTICALS A/S (50.0%)

Fruebjergvej 3

2100 Copenhagen, DK y

COPENHAGEN UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

BEREZIN, VLADIMIR;

BOCK, ELISABETH;

EBDRUP, SØREN y

KLEMENTIEV, BORIS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

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

ES 2 559 634 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

Péptidos derivados de NCAM (FGLs).

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos que comprenden como máximo 13 restos contiguos de aminoácido derivados del módulo II de fibronectina tipo 3, de la molécula de adhesión de células neurales (NCAM), o una variante o fragmento del mismo, capaz de interactuar con un FGFR y de ese modo los compuestos son capaces de inducir diferenciación, modular la proliferación, estimular la regeneración, la plasticidad neuronal y/o la supervivencia de las células. Además, la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos para la producción de un medicamento para el tratamiento de afecciones y enfermedades, donde NCAM y/o FGFR desempeñan un papel prominente.

15 Antecedentes de la invención

NCAM es una glucoproteína de superficie celular que pertenece a la superfamilia de Ig de CAM (para una revisión véase Kiselyov *et al.*, 2005). NCAM puede expresarse como tres isoformas principales (A, B y C) con diferencias en el dominio citoplasmático. La parte extracelular de NCAM es idéntica para las tres isoformas y consiste en cinco módulos tipo Ig y dos de fibronectina tipo III (F3). NCAM se expresa ampliamente durante el desarrollo embrionario, mientras que en el organismo adulto se encuentra principalmente en tejidos de origen neural. NCAM desempeña un papel principal durante el desarrollo del sistema nervioso, mediando la adhesión entre células neurales y estimulando la extensión de neuritas y la fasciculación, promoviendo la supervivencia celular y la plasticidad sináptica (Cremer *et al.*, 1997; Berezin *et al.*, 2000; Bruses y Rutishauser, 2001; Rougon y Hobert, 2003; Walmod *et al.*, 2004). NCAM media la adhesión célula-célula a través de unión homófila y regula la extensión de neuritas mediante FGFR (Doherty y Walsh, 1996; Kiselyov *et al.*, 2003 y 2005). El sitio FGFR implicado en la unión a NCAM se ha mapeado en el módulo Ig3, y el sitio correspondiente en NCAM - en el segundo módulo F3 (Kiselyov *et al.*, 2003). Esta interacción conduce a la activación de cascadas de señalización intracelular que median la diferenciación y supervivencia celular.

El fragmento de NCAM identificado que tiene la secuencia EYVVAENQQGKSKA (péptido FGL) implicado en la interacción directa entre NCAM y FGFR se ha sugerido recientemente como un nuevo compuesto candidato para el tratamiento de una diversidad de trastornos patológicos donde la estimulación de la actividad de FGFR puede desempeñar el papel clave (documento WO 03/016351). Está localizado en F3, II y se une a y activa los receptores de FGF 1 y 2, promueve la neurogénesis, y la supervivencia de células neuronales *in vitro* (Kiselyev *et al.*, 2003; Neiiendam *et al.*, 2004) y mejora la memoria a largo plazo en ratas (Cambon *et al.*, 2004). El péptido FGL también ha demostrado promover la supervivencia neuronal y rescatar el déficit cognitivo en un modelo de rata de neurotoxicidad inducida por péptido amiloide-beta. (Klementiev *et al.* 2007).

40 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto que comprende como máximo 13 aminoácidos derivados del módulo II de fibronectina tipo 3, de la molécula de adhesión de células neurales (NCAM), capaz de interactuar con un FGFR.

Un compuesto de la invención es capaz de inducir diferenciación, modular la proliferación, estimular la regeneración, la plasticidad neuronal y/o la supervivencia de células.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de la invención como medicamentos y para la preparación de medicamentos para el tratamiento de una afección o enfermedad donde FGFR y/o NCAM desempeñan un papel en la patología o recuperación de una enfermedad.

Además, la presente invención describe una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la invención.

También, en otro aspecto puede usarse un compuesto de la invención para la producción de un anticuerpo.

Descripción de los dibujos

60 Figura 1. Efecto dependiente de dosis de FGLs sobre la activación del FGFR. Se transfectaron de forma estable células Trex293 (Invitrogen) con FGFR1 humano, variante de ajuste IIIc, con una marca C-terminal EstrepII. Para la determinación de la fosforilación, se privaron 2×10^6 células durante una noche en medio sin suero. Después del tratamiento con FGLs, a concentración entre 1 y 500 μ g/ml, o FGF1 (10 ng/ml) durante 20 minutos, las células se lisaron y se obtuvieron fosfo-proteínas purificadas mediante el uso de anticuerpos acoplados a agarosa anti-fosfotirosina. Las proteínas purificadas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno. Se realizó inmunotransferencia usando anticuerpos de conejo contra la marca EstrepII

recombinante. Los complejos inmunes se desarrollaron y después se visualizaron y cuantificaron usando el software de análisis de imágenes SynGene Gene Tool. Los resultados se dan como valores medios \pm DTM a partir de al menos tres experimentos independientes y se ilustran como el porcentaje de valores de control. * $p < 0,05$ en comparación con el control por ensayo t para muestras dependientes.

5
10
15
20
25
30
35

Figura 2. Efectos de FGLs sobre la extensión de neuritas de neuronas cerebelosas de rata postnatal prematura. Se prepararon CGC a partir de ratas Wistar de 7 días de edad y se sembraron en cámara Lab-Tek® de ocho pocillos no recubiertos. El péptido se añadió al medio inmediatamente después de la siembra, y las células se mantuvieron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 24 h. Los cultivos CGC se fijaron en 4 % y después se inmunotñieron frente a GAP-43 de rata. La extensión de neuritas se determinó por análisis de imágenes de 200 \pm 20 neuronas en cada experimento individual. La longitud de los procesos neuronales por célula se estimó de forma estereológica. Los resultados se dan como valores medios \pm DTM a partir de al menos tres experimentos independientes y se ilustran como el porcentaje de valores de control. * $p < 0,05$ en comparación con el control por ensayo t para muestras dependientes.

Figura 3. Efectos de una única administración de vehículo o de FGLs sobre la memoria social a corto plazo evaluada en el ensayo de reconocimiento social (SRT). Se administró s.c. FGLs (8,0 mg/kg) o vehículo (agua estéril, 4,0 ml/kg) y las ratas se ensayaron dos veces con el ensayo inicial de SRT realizado 1 h y 73 h después de la administración. La rata juvenil se presentó dos veces con un intervalo inter-ensayo de 2 horas. En cada grupo experimental se obtuvieron datos de 9 a 11 ratas. Los resultados se muestran como la media y DTM de la proporción de reconocimiento (RR). Un valor RR significativamente por debajo de 0,5 indica memoria social. Se realizaron comparaciones de valores RR con un valor hipotético de 0,50 usando ensayo t de una muestra. ** $P < 0,01$.

Figura 4. Efectos de una única administración de vehículo o de FGLs sobre la memoria social a corto plazo evaluada en el ensayo de reconocimiento social (SRT). Se administró s.c. FGLs (1,0, 2,0, 4,0 y 8,0 mg/kg) o vehículo (agua estéril, 4,0 ml/kg) y las ratas se ensayaron dos veces con el ensayo inicial de SRT realizado 1 h y 24 h después de la administración. La rata juvenil se presentó dos veces con un intervalo inter-ensayo de 2 horas. En cada grupo experimental se obtuvieron datos de 9 a 11 ratas. Los resultados se muestran como la media y DTM de la proporción de reconocimiento (RR). Un valor RR significativamente por debajo de 0,5 indica memoria social. Se realizaron comparaciones de valores RR con un valor hipotético de 0,50 usando ensayo t de una muestra. ** $P < 0,01$.

Figura 5. Efectos de la administración subcutánea de FGLs, FGL_L y VEB1 (2 administraciones a las dosis indicadas) sobre la memoria social a corto plazo evaluada en el ensayo de reconocimiento social (SRT). Los resultados se muestran como la media y DTM de la proporción de reconocimiento (RR). Un valor RR significativamente por debajo de 0,5 indica memoria social. Se realizaron comparaciones de valores RR con un valor hipotético de 0,50 usando ensayo t de una muestra.

A: El gráfico ilustra los resultados obtenidos en el SRT 5 horas después de la última administración. En cada grupo experimental se obtuvieron resultados de 7 a 10 ratas. Se detectaron efectos significativos potenciadores de la memoria en todos los grupos de péptido * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

B: El gráfico ilustra los resultados obtenidos en el SRT 77 horas después de la última administración. En cada grupo experimental se obtuvieron datos de 8 a 10 ratas. Se detectaron efectos significativos potenciadores de la memoria para los grupos de péptido FGLs, y FGL_L ** $P < 0,01$.

Figura 6. Efectos de FGLs sobre el aprendizaje espacial en laberinto acuático de Morris. Las ratas recibieron FGLs o vehículo por vía subcutánea como una única dosis de 2,5 mg/kg 5, 3 y 1 día antes del primer ensayo (ensayos 1-4 en el gráfico anterior). El segundo ensayo (ensayos 5-8 en el gráfico anterior) tuvo lugar el día después del primer ensayo. Los resultados se analizaron usando análisis de la varianza (ANOVA) y ensayo t de Student. Los datos son el tiempo de espera medio de escape (s) (\pm DTM) para encontrar la plataforma durante los 2 días de entrenamiento (t1-t4). * $p < 0,05$, en comparación con el grupo de vehículo/control en el mismo punto temporal.

Figura 7. Efectos de la administración subcutánea de FGL_L, FGLs, y VEB1 (2 administraciones con un intervalo de 19 horas, a 8 mg/kg) sobre la amnesia social inducida por escopolamina evaluada en el ensayo de reconocimiento social (SRT). Las ratas se ensayaron con el ensayo inicial de SRT realizado 5 h después de la última administración de péptido/vehículo y 30 minutos después de la administración de escopolamina (0,01 mg/kg s.c.). La rata juvenil se presentó dos veces con un intervalo inter-ensayo de 15 minutos.

A-Proporciones de reconocimiento (RR) de ratas tratadas con escopolamina y vehículo (Veh) o escopolamina y uno de los tres péptidos como se ha detallado anteriormente. Los resultados se muestran como la media y DTM de la proporción de reconocimiento (RR). Un valor RR significativamente por debajo de 0,5 indica memoria social. Se realizaron comparaciones de valores RR con un valor hipotético de 0,50 usando ensayo t de una muestra. En cada grupo experimental se obtuvieron datos de 10 ratas. Se detectaron efectos significativos frente a amnesia social inducida por escopolamina para los grupos de péptido FGL_L, y FGLs * $P < 0,05$.

B-Tiempo acumulativo de investigación (T1, en segundos) durante el primer ensayo del SRT de ratas tratadas con escopolamina y vehículo (Veh) o escopolamina y uno de los tres péptidos como se ha detallado anteriormente. Los resultados se muestran como la media y DTM de T1. Se realizaron comparaciones entre grupos por ANOVA seguido de ensayo de comparación múltiple de Dunnett. En cada grupo experimental se obtuvieron datos de 10 ratas. Las

ratas de los grupos de péptido FGL_L, y FGLs mostraron un T1 significativamente más largo que las ratas tratadas con vehículo. *P<0,05.

Figura 8. El efecto de FGLs (administrado por vía subcutánea a las dosis indicadas), o vehículo sobre el desarrollo la alteración cognitiva (déficit en memoria social a corto plazo) y neurodegeneración después de neurointoxicación con fragmento (25-35) β-amiloide (A-β). Se realizaron comparaciones de valores RR con un valor hipotético de 0,50 usando ensayo t de una muestra. Se realizaron comparaciones intergrupo entre grupos Aβ usando ANOVA de un factor y ensayo post-hoc de Newman-Keuls y comparación entre vehículo A-β y animales operados de forma simulada por un-ensayo t para muestras dependientes.

A: El efecto de la administración de FGLs sobre el déficit inducido por neurotoxicidad por β-amiloide sobre el rendimiento en el ensayo de reconocimiento social. Los resultados se muestran como la media y DTM de la proporción de reconocimiento (RR). 10-12 animales por grupos. Un valor RR significativamente por debajo de 0,5 indica memoria social. *p<0,05, **p<0,01 en comparación con el grupo A-β/V.

B: El efecto de la administración de FGLs sobre la disminución en la densidad de neuronas intactas inducida por neurotoxicidad por β-amiloide en la corteza cingulada. 7-8 ratas por grupo. +/*p<0,05 en comparación con el grupo Aβ/V.

C: El efecto de la administración de FGLs sobre el aumento en la densidad de neuronas dañadas inducido por neurotoxicidad por β-amiloide en la corteza cingulada. 7-8 ratas por grupo. **p<0,01 +++/**p<0,001 en comparación con el grupo A-β/V.

D: El efecto de la administración de FGLs sobre el aumento de carga amiloide inducida por neurotoxicidad por β-amiloide (% de valor del control A-β/V) en la corteza cingulada. 7-8 ratas por grupo. Ni la lesión, ni el péptido tuvieron efectos significativos.

Figura 9. Efectos de la administración intranasal de FGLs sobre el déficit inducido por neurotoxicidad por β-amiloide sobre el rendimiento en el ensayo de reconocimiento social. Las ratas recibieron una administración intranasal de FGLs a las dosis indicadas o vehículo diariamente en los días 7 a 21 después de administración i.c.v. del fragmento (25-35) β-amiloide (A-β). 8-10 animales por grupo. Los resultados se expresan como las medias y DTM de la proporción de reconocimiento y se analizaron por ensayo t de una muestra: **p<0,05.

Figura 10. Concentración de FGLs en plasma sanguíneo de rata después de administración intranasal de FGLs a 0,2, 0,8 o 3,2 mg/kg diariamente en los días 7 a 21, después de administración i.c.v. del fragmento (25-35) β-amiloide (A-β). Se obtuvieron muestras de sangre 30 min y 60 min después de la última administración y se midió la concentración de FGLs.

Figura 11. Aspecto visual de FGL_L y FGLs. Se diluyeron 100 mg de FGL_L y FGLs, respectivamente en 1 ml de agua a temperatura ambiente para inspección visual.

Figura 12. Imagen de microscopía óptica de FGL_L y FGLs diluidos en agua y PBS. Se diluyeron 5 mg de FGL_L y FGLs respectivamente en 1 ml de agua o PBS a temperatura ambiente. A. 5 mg/ml de FGL_L en agua, B. 5 mg/ml de FGL_L en PBS, C. 5 mg/ml de FGLs en agua, D. 5 mg/ml FGLs en PBS.

Figura 13. Espectros de dispersión de luz de 90 ° de 100 mg/ml de FGL_L, FGLs en agua. A. FGL_L, B. FGLs, C. agua.

Figura 14. Concentración de FGLs en plasma sanguíneo de rata después de administración de péptido. Se administró a las ratas 1,25 mg/kg i.v. o 2,5 mg/kg s.c. Se tomaron muestras de sangre en diferentes puntos temporales después de la administración y se midió la concentración de FGLs.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe formas truncadas de FGL_L con un efecto mejorado, que es más soluble y de ese modo más fácil de formular. Los nuevos compuestos de acuerdo con la invención comprenden como máximo 13 aminoácidos derivados del mismo motivo en el módulo II de F3 que FGL_L.

La eliminación de aminoácidos de FGL_L desde el extremo N-terminal conduce a un péptido más soluble que no muestra potencial para la agregación, que permite formularlo para y administrarse por vía tanto intranasal como subcutánea.

Un compuesto de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos contiguos de como máximo 13 aminoácidos que se obtiene del módulo II de fibronectina tipo 3, de NCAM, o una variante o fragmento del mismo.

En una realización preferida, los compuestos de acuerdo con la invención pueden comprender una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende como máximo 13 aminoácidos que se obtiene de NCAM. Por consiguiente,

en esta realización la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención puede seleccionarse entre las siguientes secuencias de aminoácidos:

5 VAENQQGKSKA SEC ID N.º 1

EVVAENQQGKSKA SEC ID N.º 2

NVVAENQQGKSKA SEC ID N.º 3

10 NSVAENQQGKSKA SEC ID N.º 4.

En el presente contexto se aplica el código convencional de una letra para los restos de aminoácido así como el código convencional de tres letras. Las abreviaturas para los aminoácidos son de acuerdo con las recomendaciones en la IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature Eur. J. Biochem, 1984, vol. 184, pág. 9-37. Durante toda la descripción y reivindicaciones se usa el código de tres letras o el código de una letra para aminoácidos naturales. Cuando no se ha especificado la forma L o D debe entenderse que el aminoácido en cuestión tiene la forma natural L, cf. Pure & Appl.Chem. Vol. (56(5) pág. 595-624 (1984) o la forma D, de modo que los péptidos formados pueden estar constituidos de aminoácidos de forma L, forma D, o una secuencia de formas L y formas D mixtas.

20 Cuando no se especifica nada debe entenderse que el aminoácido C-terminal de un péptido para su uso de acuerdo con la invención existe como el ácido carboxílico libre, esto también puede especificarse como "-OH". Sin embargo, el aminoácido C-terminal de un péptido para su uso de acuerdo con la invención puede ser un derivado amidado, que se indica como "-NH₂". Cuando no se indica nada más, el aminoácido N-terminal de un polipéptido comprende un grupo amino libre, esto puede especificarse también como "H-".

Un péptido, fragmento, homólogo o variante del mismo de acuerdo con la invención también puede comprender uno o varios aminoácidos no naturales.

30 Un péptido preferido de acuerdo con la invención es una secuencia peptídica contigua aislada que comprende como máximo 13 restos de aminoácido del módulo II de fibronectina tipo 3, de NCAM. Se entiende que todos los péptidos de acuerdo con la invención comprenden al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias SEC ID N.º 1-4 o un fragmento, variante u homólogo de las mismas.

35 Por tanto, algunas realizaciones de la invención pueden referirse a un péptido que comprende un fragmento de una secuencia seleccionada entre las SEC ID N.º 1-4. Otra realización puede referirse a variantes de las SEC ID N.º 1-4. Una realización adicional puede referirse a homólogos de las SEC ID N.º 1-4.

40 Una variante de acuerdo con la invención de una secuencia de aminoácido seleccionada entre las secuencias SEC ID N.º 1-4 puede ser

45 i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad con una secuencia seleccionada, tal como un 76-80 % de identidad, por ejemplo un 81-85 % de identidad, tal como un 86-90 % de identidad, por ejemplo un 91-95 % de identidad, tal como un 96-99 % de identidad, donde la identidad se define como un porcentaje de aminoácidos idénticos en dicha secuencia cuando se coteja con la secuencia seleccionada. La identidad entre secuencias de aminoácidos puede calcularse usando algoritmos bien conocidos tales como BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, BLOSUM 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, o BLOSUM 90;

50 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de coincidencias positivas de aminoácidos con una secuencia seleccionada, tal como un 76-80 % de coincidencias positivas de aminoácidos, por ejemplo un 81-85 % de coincidencias positivas de aminoácidos, tal como un 86-90 % de coincidencias positivas de aminoácidos, por ejemplo un 91-95 % de coincidencias positivas de aminoácidos, tal como un 96-99 % de coincidencias positivas de aminoácidos, donde la coincidencia positiva de aminoácido se define como la presencia en la misma posición en dos secuencias comparadas de restos de aminoácido que tiene propiedades físicas y/o químicas similares. Las coincidencias positivas de aminoácidos preferidas de la presente invención son K a R, E a D, L a M, Q a E, I a V, I a L, A a S, Y a W, K a Q, S a T, N a S y Q a R;

60 iii) una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia seleccionada, o tiene al menos un 75 % de identidad con dicha secuencia, tal como un 76-80 % de identidad, por ejemplo un 81-85 % de identidad, tal como un 86-90 % de identidad, por ejemplo un 91-95 % de identidad, tal como un 96-99 % de identidad, o tiene al menos un 75 % de coincidencias positivas de aminoácidos con la secuencia seleccionada, tal como un 76-80 % de coincidencias positivas de aminoácidos, por ejemplo un 81-85 % de coincidencias positivas de aminoácidos, tal como un 86-90 % de coincidencias positivas de aminoácidos, por ejemplo un 91-95 % de coincidencias positivas de aminoácidos, tal como un 96-99 % de coincidencias positivas de aminoácidos, y comprende otros restos químicos, por ejemplo, restos fosforilo, azufre, acetilo, glucosilo.

La expresión "variante de una secuencia peptídica" también significa que la secuencia peptídica puede estar modificada, por ejemplo por sustitución de uno o más de los restos de aminoácido. Pueden usarse tanto L-aminoácidos como D-aminoácidos. Otra modificación puede comprender derivados tales como ésteres, azúcares, etc., por ejemplo ésteres de metilo y acetilo, así como modificaciones con polietilenglicol.

5 Además, un grupo amina del péptido puede convertirse en amidas, donde la parte ácida de la amida es un ácido graso.

10 En otro aspecto, las variantes de las secuencias de aminoácidos de acuerdo con la invención pueden comprender, dentro de la misma variante, o fragmentos de la misma o entre diferentes variantes, o fragmentos de las mismas, al menos una sustitución, tal como una pluralidad de sustituciones introducidas independientemente entre ellas. Las variantes del complejo, o fragmentos de las mismas por tanto pueden comprender sustituciones conservativas independientemente entre ellas, donde al menos una glicina (Gly) de dicha variante, o fragmentos de la misma está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Ala, Val, Leu, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de los mismos, donde al menos una alanina (Ala) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Val, Leu, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una valina (Val) de dicha variante, o fragmentos de la misma está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Leu, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una leucina (Leu) de dicha variante, o fragmentos de la misma está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Val, e Ile, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una isoleucina (Ile) de dicha variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Gly, Ala, Val y Leu, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas donde al menos un ácido aspártico (Asp) de dicha variante, o fragmentos de la misma está sustituido con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Glu, Asn, y Gln, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una asparagina (Asn) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, y Gln, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una glutamina (Gln) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, y Asn, y donde al menos una fenilalanina (Phe) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Tyr, Trp, His, Pro, y preferiblemente seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Tyr y Trp, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una tirosina (Tyr) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Phe, Trp, His, Pro, preferiblemente un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Phe y Trp, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una arginina (Arg) de dicho fragmento está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Lys e His, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una lisina (Lys) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Arg e His, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, y donde al menos una prolina (Pro) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Phe, Tyr, Trp, e His, e independientemente de los mismos, variantes, o fragmentos de las mismas, donde al menos una cisteína (Cys) de dichas variantes, o fragmentos de las mismas está sustituida con un aminoácido seleccionado entre el grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, y Tyr.

50 Por tanto de lo anterior se desprende que la misma variante de un fragmento peptídico, o fragmento de dicha variante puede comprender más de una sustitución conservativa de aminoácido entre más de un grupo de aminoácidos conservativos como se ha definido anteriormente en este documento. La expresión "sustitución conservativa de aminoácido" se usa como sinónimo en este documento de la expresión "sustitución homóloga de aminoácido".

55 Los grupos de aminoácidos conservativos son los siguientes:

A, G (neutros, débilmente hidrófobos),

60 Q, N, S, T (hidrófilos, no cargados)

E, D (hidrófilos, ácidos)

10 H, K, R (hidrófilos, básicos)

65 L, P, I, V, M, F, Y, W (hidrófobos, aromáticos)

C (formación de uniones cruzadas)

Las sustituciones conservativas pueden introducirse en cualquier posición de un péptido predeterminado preferido para su uso de acuerdo con la invención o fragmento del mismo. Sin embargo, también puede ser deseable introducir sustituciones no conservativas, particularmente, una sustitución no conservativa en una cualquiera o más posiciones.

Una sustitución no conservativa que conduzca a la formación de un fragmento variante del péptido para su uso de acuerdo con la invención diferiría, por ejemplo, sustancialmente en la polaridad, por ejemplo un resto con una cadena lateral no polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe o Met) sustituido en el lugar de un residuo con una cadena lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, o Gln o un aminoácido cargado tal como Asp, Glu, Arg, o Lys, o la sustitución de un resto cargado o polar en el lugar de uno no polar; y/o ii) diferiría sustancialmente en su efecto sobre la orientación de la estructura del péptido tal como la sustitución de o en el lugar de Pro o Gly por otro resto; y/o iii) diferiría sustancialmente en la carga eléctrica, por ejemplo la sustitución de un resto cargado negativamente tal como Glu o Asp en el lugar de un resto cargado positivamente tal como Lys, His o Arg (y viceversa); y/o iv) diferiría sustancialmente en el volumen estérico, por ejemplo la sustitución de un resto voluminoso tal como His, Trp, Phe o Tyr en el lugar de uno que tiene una cadena lateral pequeña, por ejemplo Ala, Gly o Ser (y viceversa).

La sustitución de aminoácidos puede hacerse, en una realización, en base a sus valores de hidrofobicidad e hidrofiliidad y la similitud relativa con los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, incluyendo la carga, el tamaño.

Ejemplos de variantes son:

EX1a-X2b-VAENQQGKSKA DX1a-X2a-VAENQQGKSKA

Donde X1a es F, A, C, G, Q, L, M, N, S, Y, T, I, P, V, más preferido X1a es A, G, L, M, V, P, I.

Y X2b es Q, N, S, T, G o está deletado

Ejemplos no limitantes específicos de variantes son:

EVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 2)
 NVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 3)
 NSVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 4)
 AVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 5)
 GVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 6)
 LVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 7)
 MVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 8)
 VVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 9)
 PVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 10)
 IVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 11)
 QVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 12)
 QGVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 13)
 QLVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 14)
 QMVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 15)
 QVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 16)
 QPVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 17)
 QIVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 18)
 NAVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 19)
 NGVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 20)
 NLVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 21)
 NMVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 22)
 NVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 23)
 NPVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 24)
 NIVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 25)
 SAVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 26)
 SGVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 27)
 SLVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 28)
 SMVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 29)
 SVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 30)
 SPVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 31)
 SIVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 32)
 TAVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 33)
 TGVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 34)

TLVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 35)
 TMVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 36)
 TVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 37)
 TPVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 38)
 5 TIVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 39)
 GAVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 40)
 GGVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 41)
 GLVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 42)
 GMVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 43)
 10 GVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 44)
 GPVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 45)
 GIVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 46)

En otra realización, la variante tiene la siguiente fórmula

15 X3a-X3b-X3c-VAENQQGKSKA

Donde X3a es F, A, C, G, Q, L, M, N, S, Y, T, I, P, V o está deletado, o más preferido X3a es A, G, L, M, V, P, I o está deletado, y X3b es D o E, y X3c es A, G, L, M, V, P, I o está deletado.

20 Con la condición de que X3a y X3c no puedan estar ambos deletados.

Ejemplos de variantes específicas son:

25 DAVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 47)
 DGVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 48)
 DLVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 49)
 DMVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 50)
 DVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 51)
 30 DPVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 52)
 DIVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 53)
 EAVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 54)
 EGVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 55)
 ELVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 56)
 35 EMVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 57)
 EVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 2)
 EPVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 58)
 EIVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 59)
 ADVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 64)
 40 GDVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 61)
 LDVAEMQQGKSKA (SEC ID N.º 62)
 MDVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 63)
 VDVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 64)
 PDVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 65)
 45 IDVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 66)
 AEVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 67)
 GEVAEMQQGKSKA (SEC ID N.º 68)
 LEVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 69)
 MEVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 70)
 50 VEVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 71)
 PEVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 72)
 IEVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 73)

En otra realización más la variante tiene la fórmula

55 X2a-X2b-VAENQQGKSKA

Donde X2a es F, A, C, G, Q, L, M, N, S, Y, T, I, P, V, o más preferido X2a es A, G, L, M, V, P, I.

60 Y X2b es D, E.

Tanto los fragmentos como las variantes de secuencias de aminoácidos de acuerdo con la invención son los equivalentes funcionales de dichas secuencias.

65 Por la expresión "equivalente funcional" de una secuencia de aminoácidos se entiende, en el presente contexto, una molécula que cumple los criterios para una variante o un fragmento de dicha secuencia de aminoácidos descrita

anteriormente y que es capaz de una o más actividades funcionales de dicha secuencia o un compuesto que comprende dicha secuencia. En una realización preferida, el equivalente funcional de una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la invención es capaz de unirse a y modular la actividad de FGFR.

5 La invención se refiere tanto a péptidos aislados de acuerdo con la invención como a proteínas de fusión que comprenden péptidos de acuerdo con la invención.

10 En una realización, el péptido de acuerdo con la invención es un péptido aislado. Por la expresión "péptido aislado" se entiende que el péptido de acuerdo con la invención es un compuesto individual y no una parte de otro compuesto. El péptido aislado puede producirse mediante el uso de cualquier método de tecnología recombinante o síntesis química y separarse de otros compuestos, o puede separarse de un polipéptido más largo o proteína mediante un método de escisión enzimática o química y separarse adicionalmente de otros fragmentos proteicos.

15 Un péptido aislado de acuerdo con la invención puede comprender, en otra realización, un fragmento de NCAM que comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de NCAM, seleccionada entre las SEC ID N.º 1-4 o variante de las mismas. En otra realización, el péptido aislado puede consistir en una o más de las secuencias SEC ID N.º 1-4.

20 Grupo lipófilo

En una realización, el compuesto de acuerdo con la invención se proporciona con al menos un grupo lipófilo, tal como un ácido graso.

25 El grupo lipófilo puede unirse al péptido tal cual o a un enlazador o espaciador conectado al péptido o péptidos.

En una realización de la invención, un grupo amino de un espaciador forma un enlace amida con un grupo carboxilo del sustituyente lipófilo.

30 En una realización de la invención, el sustituyente lipófilo comprende un esqueleto de ciclopentanofenantreno parcial o completamente hidrogenado.

En una realización de la invención, el sustituyente lipófilo es un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado. En una realización de la invención, el sustituyente lipófilo es el grupo acilo de un ácido graso de cadena lineal o ramificado.

35 En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{6-40}-CH_3$. El * especifica el punto de unión.

40 En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-26}-CH_3$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-20}-CH_3$. El * especifica el punto de unión.

45 En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_mCH_3$. El * especifica el punto de unión, y m es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende ácidos dicarboxílicos lineales o ramificados.

50 En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende ácidos dicarboxílicos lineales o ramificados de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{6-40}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende ácidos dicarboxílicos lineales o ramificados de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-26}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

55 En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende ácidos dicarboxílicos lineales o ramificados de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-20}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

60 En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende ácidos dicarboxílicos lineales o ramificados de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-18}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

65 En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende ácidos dicarboxílicos lineales o ramificados de fórmula $*C(C=O)-(CH)_n-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18.

Producción de secuencias peptídicas

Las secuencias peptídicas de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método sintético convencional, tecnologías de ADN recombinante, escisión enzimática de proteínas de longitud completa de las que se derivan las secuencias peptídicas, o una combinación de dichos métodos.

5 Preparación recombinante

Por tanto, en una realización los péptidos de la invención se producen mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante.

10 La secuencia de ADN que codifica un péptido o la correspondiente proteína de longitud completa a partir de la cual se origina el péptido puede prepararse de forma sintética mediante métodos convencionales establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidina descrito por Beaucage y Caruthers, 1981, *Tetrahedron Lett.* 22:1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., 1984, *EMBO J.* 3:801-805. De acuerdo con el método de fosfoamidina, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo en un sintetizador automático de ADN, se purifican, hibridan, ligan y clonan en vectores adecuados.

15 La secuencia de ADN que codifica un péptido también puede prepararse por fragmentación de las secuencias de ADN que codifican la correspondiente proteína de longitud completa de origen peptídico, usando ADNasa I de acuerdo con un protocolo convencional (Sambrook et al., *Molecular cloning: A Laboratory manual.* 2ª ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). La presente invención se refiere a proteínas de longitud completa seleccionadas entre los grupos de proteínas identificados anteriormente. El ADN que codifica las proteínas de longitud completa de la invención puede fragmentarse, como alternativa, usando endonucleasas de restricción específicas. Los fragmentos de ADN se purifican adicionalmente usando procedimientos convencionales descritos en Sambrook et al., *Molecular cloning: A Laboratory manual.* 2ª ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

20 La secuencia de ADN que codifica una proteína de longitud completa también puede ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo obtenido por preparación de una biblioteca genómica o de ADNc y selección de secuencias de ADN que codifican todo o parte de la proteína de longitud completa por hibridación usando sondas oligonucleotídicas sintéticas de acuerdo con técnicas convencionales (cf. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989). La secuencia de ADN también puede prepararse por reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4.683.202 o Saiki et al., 1988, *Science* 239:487-491.

25 La secuencia de ADN después se inserta en un vector de expresión recombinante, que puede ser cualquier vector, que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante. La elección de vector a menudo dependerá de la célula hospedadora en que tiene que introducirse. Por tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en que se ha integrado.

30 En el vector, la secuencia de ADN que codifica un péptido o una proteína de longitud completa debe estar conectada de forma funcional a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección y pueda derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula hospedadora. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN codificante en células de mamífero son el promotor de SV 40 (Subramani et al., 1981, *Mol. Cell Biol.* 1:854-864), el promotor de MT-1 (gen de la metalotioneína) (Palmiter et al., 1983, *Science* 222: 809-814) o el promotor tardío principal de adenovirus 2. Un promotor adecuado para su uso en células de insecto es el promotor de la polihedrina (Vasudevan et al., 1992, *FEBS Lett.* 311:7-11). Los promotores adecuados para su uso en células hospedadoras de levadura incluyen promotores de genes glucolíticos de levadura (Hitzeman et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255:12073-12080; Alber y Kawasaki, 1982, *J. Mol. Appl. Gen.* 1: 419-434) o genes de alcohol deshidrogenasa (Young et al., 1982, en *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, Hollaender et al., eds., Plenum Press, Nueva York), o los promotores TPI1 (documento US 4.599.311) o ADH2-4c (Russell et al., 1983, *Nature* 304:652-654). Son promotores adecuados para su uso en célula hospedadoras de hongos filamentosos, por ejemplo, el promotor de ADH3 (McKnight et al., 1985, *EMBO J.* 4:2093-2099) o el promotor de tpiA.

35 La secuencia de ADN codificante también puede estar conectada de forma funcional a un terminador adecuado, tal como el terminador de la hormona de crecimiento humana (Palmiter et al., op. cit.) o (para hospedadores fúngicos) los promotores TPI1 (Alber y Kawasaki, op. cit.) o ADH3 (McKnight et al., op. cit.). El vector puede comprender adicionalmente elementos tales como señales de poliadenilación (por ejemplo, de SV 40 o la región Elb de adenovirus 5), secuencias potenciadoras transcripcionales (por ejemplo, el potenciador de SV 40) y secuencias potenciadoras traduccionales (por ejemplo, las que codifican ARN VA de adenovirus).

60 El vector de expresión recombinante puede comprender adicionalmente una secuencia de ADN que posibilite que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión. Un ejemplo de dicha secuencia (cuando la célula

hospedadora es una célula de mamífero) es el origen de replicación de SV 40. El vector también puede comprender un marcador de selección, por ejemplo un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula hospedadora, tal como un gen que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo neomicina, hidromicina o metotrexato.

Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican los péptidos o proteínas de longitud completa, el promotor y el terminador, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos para los expertos en la materia (cf., por ejemplo, Sambrook et al., op.cit.).

Para obtener péptidos recombinantes de la invención, las secuencias de ADN codificantes pueden fusionarse de forma útil con una segunda secuencia codificante de péptido y una secuencia codificante de un sitio de escisión con proteasa, dando una construcción de ADN que codifica la proteína de fusión, donde la secuencia codificante el sitio de escisión con proteasa se posiciona entre el fragmento HBP y el segundo ADN codificante de péptido, se inserta en un vector de expresión recombinante, y se expresa en células hospedadoras recombinantes. En una realización, dicho segundo péptido se selecciona entre el grupo que comprende la glutatión-S-reductasa, timosina de ternero, tiorredoxina bacteriana o variantes naturales o sintéticas de ubiquitina humana, o péptidos de las mismas. En otra realización, una secuencia peptídica que comprende un sitio de escisión por proteasa puede ser el sitio de escisión del Factor Xa, con la secuencia de aminoácidos IEGR, enteroquinasa, con la secuencia de aminoácidos DDDDK, trombina, con la secuencia de aminoácidos LVPR/GS, o *Acharombacter lyticus*, con la secuencia de aminoácidos XKX.

La célula hospedadora en que se introduce el vector de expresión puede ser cualquier célula que tenga capacidad de expresión de los péptidos o proteínas de longitud completa, y es preferiblemente una célula eucariota, tal como células de invertebrado (insecto) o células de vertebrado, por ejemplo ovocitos de *Xenopus laevis* o células de mamífero, en particular células de insecto y mamífero. Ejemplos de líneas celulares adecuadas de mamífero son las líneas celulares HEK293 (ATCC CRL-1573), COS (ATCC CRL-1650), BHK (ATCC CRL-1632, ATCC CCL-10) o CHO (ATCC CCL-61). Se describen métodos para transfectar células de mamífero y expresar secuencias de ADN introducidas en las células en, por ejemplo, Kaufman y Sharp, *J. Mol. Biol.* 159, 1982, pág. 601-621; Southern y Berg, 1982, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341; Loyter et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 422-426; Wigler et al., 1978, *Cell* 14:725; Corsaro y Pearson, 1981, en *Somatic Cell Genetics* 7, pág. 603; Graham y van der Eb, 1973, *Viral.* 52:456; y Neumann et al., 1982, *EMBO J.* 1:841-845.

Como alternativa, pueden usarse células fúngicas (incluyendo células de levadura) como células hospedadoras. Ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen células de *Saccharomyces* spp. o *Schizosaccharomyces* spp., en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Ejemplos de otras células fúngicas son células de hongos filamentosos, por ejemplo *Aspergillus* spp. o *Neurospora* spp., en particular cepas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. El uso de *Aspergillus* spp. para la expresión de proteínas se describe en, por ejemplo, el documento EP 238 023.

El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar células de mamífero, tal como un medio que contiene suero o libre de suero que contiene suplementos apropiados, o un medio adecuado para cultivar células de insecto, levadura o fúngicas. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con fórmulas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection).

Los péptidos o proteínas de longitud completa producidas de forma recombinante por las células después pueden recuperarse del medio de cultivo por procedimientos convencionales que incluyen separación de las células hospedadoras del medio por centrifugación o filtración, precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación mediante una diversidad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo HPLC, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

Preparación sintética

Los métodos para producción sintética de péptidos son bien conocidos en la técnica. Pueden encontrarse descripciones detalladas así como consejos prácticos para la producción de péptidos sintéticos en *Synthetic Peptides: A User's Guide (Advances in Molecular Biology)*, Grant G. A. ed., Oxford University Press, 2002, o en: *Pharmaceutical Formulation: Development of Peptides and Proteins*, Frokjaer y Hovgaard eds., Taylor y Francis, 1999.

Los péptidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando química de Fmoc y con cisteínas protegidas con Acm. Después de purificación por HPLC en fase inversa, los péptidos pueden procesarse adicionalmente para obtener por ejemplo isoformas cíclicas o modificadas en C- o N-terminal. Los métodos para la ciclación y modificación terminal son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle en los manuales citados anteriormente.

En una realización preferida, las secuencias peptídicas de la invención se producen de forma sintética, en particular, por el método de síntesis peptídica asistida por secuencia (SAPS).

5 Los péptidos pueden sintetizarse por lotes en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración o en la versión de flujo continuo del método en fase sólida de poliamida (Dryland, A. y Sheppard, R.C., (1986) J.Chem. Soc. Perkin Trans. I, 125 - 137.) en un sintetizador peptídico completamente automatizado usando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) o terc-butiloxycarbonilo, (Boe) como grupo protector de N- α -amino y grupos adecuados de protección comunes para la funcionalidad de la cadena lateral.

10 Compuesto multimérico

Una secuencia peptídica aislada de la invención puede conectarse a otra secuencia peptídica aislada por un enlace químico en una proteína de fusión o las secuencias de aminoácidos pueden conectarse entre sí a través de un grupo enlazador. En algunas realizaciones, una secuencia peptídica de la invención puede formularse como un oligómero (multímero) de monómeros, donde cada monómero es como una secuencia peptídica definida anteriormente. Particularmente, los péptidos multiméricos tales como dendrímeros pueden formar determinantes conformacionales o grupos debido a la presencia de múltiples monómeros peptídicos flexibles. En una realización, el compuesto es un dímero, en otra realización el compuesto es un trímero o un tetramero. La polimerización tal como secuencias repetitivas o unión a diversos vehículos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo estructuras de lisina, tales como dendrímeros de lisina que portan 4 péptidos, 8 péptidos, 16 péptidos, o 32 péptidos. Otros vehículos pueden ser dendrímeros lipófilos, o vehículos tipo micela formados por derivados lipófilos, o conjugados poliméricos de cadena de carbono estrellados (tipo estrella).

25 Por tanto, de acuerdo con la invención una compuesto multimérico puede ser un polímero que comprende dos o más secuencias peptídicas idénticas o diferentes de la invención, donde en una realización preferida, al menos una de las dos o más secuencias de aminoácidos se selecciona entre una secuencia de un péptido de acuerdo con esta invención.

30 En algunas realizaciones, el compuesto puede comprender dos secuencias idénticas de aminoácidos o el compuesto puede comprender cuatro copias idénticas de una secuencia de aminoácidos.

35 En otras realizaciones, el compuesto puede comprender dos o más secuencias diferentes de aminoácidos, donde al menos una de las dos secuencias de aminoácidos es una secuencia seleccionada entre las secuencias peptídicas mostradas en este documento, o fragmentos o variantes de las mismas. Más preferiblemente dos o más secuencias se seleccionan entre las secuencias mostradas en este documento.

Ejemplos de compuestos de la invención son:

40 Z-L-Z,

Z-Z-L,

Z-L-L,

45

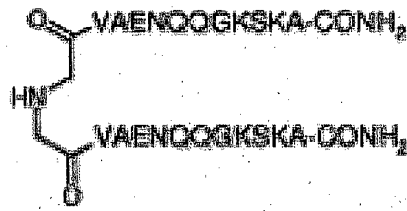


Z-L-Z-L,

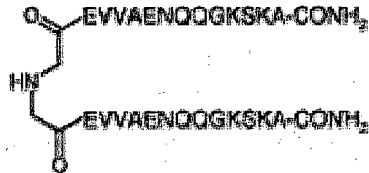
50



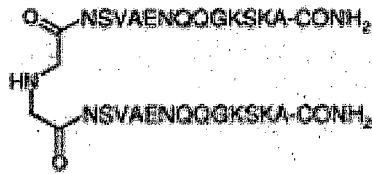
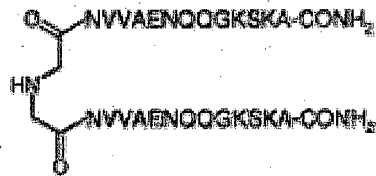
Un compuesto multimérico preferido de la invención es un compuesto donde las secuencias de aminoácidos están conectadas entre sí a través de un enlazador o un grupo enlazador, tal como



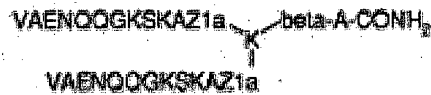
FGLs



5



10



15 Donde

Z1a es uno de dos aminoácidos seleccionados entre el grupo F, A, G, Q, L, M, N, S, Y, T, I, P, V.

Más preferido:

20

Z1a es uno o dos aminoácidos seleccionados entre el grupo A, G, Q, L, N, S, T, I, P, V.

Incluso más preferido:

25

Z1a es uno o dos aminoácidos seleccionados entre A, G, S, N
Z1a es un aminoácido seleccionado entre el grupo F, A, G, Q, L, M, N, S, Y, T, I, P, V.

Más preferido:

30

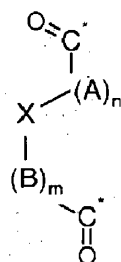
Z1a es un aminoácido seleccionado entre el grupo A, G, Q, L, N, S, T, I, P, V.

Incluso más preferido:

35

Z1a es un aminoácido seleccionado entre A, G, S, N.

En una realización, dos secuencias peptídicas individuales de un compuesto están co-unidas por un enlazador. Una molécula enlazadora puede seleccionarse, de acuerdo con la invención, entre ácidos di-, tri- o tetracarboxílicos aquirales, teniendo dichos ácidos la fórmula general



5



El compuesto puede producirse por el método de LPA como se describe en el documento WO 00/18791.

10

En una realización

n y m son independientemente un entero de 1 a 20,

15

X es HN, H₂N(CR₂)_pCR, RHN(CR₂)_pCR, HO(CR₂)_pCR, HS(CR₂)_pCR, halógeno-(CR₂)_pCR, HOOC(CR₂)_pCR, ROOC(CR₂)_pCR, HCO(CR₂)_pCR, RCO(CR₂)_pCR, [HOOC(A)_n][HOOC(B)_m]CR(CR₂)_pCR, H₂N(CR₂)_pCR, RHN(CR₂)_pCR, HO(CR₂)_pCR, HS(CR₂)_pCR, halógeno-(CR₂)_pCR, HOOC(CR₂)_pCR, ROOC(CR₂)_pCR, HCO(CR₂)_pCR, RCO(CR₂)_pCR, o [HOOC(A)_n][HOOC(B)_m](CR₂)_pCR, donde p es 0 o entero de 1 a 20,

20

A y B son independientemente un alquilo C₁₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un alquenilo C₂₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

25

Según el término alquilo C₁₋₁₀ se entiende grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen 1-10 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, isopropilo, butilo, y terc-butilo.

Según el término alquenilo C₂₋₁₀ se entiende grupo alquenilo de cadena lineal o ramificada que tienen 2-10 átomos de carbono, por ejemplo etinilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, y terc-butenilo.

30

Según el término resto cíclico se entiende ciclohexano, y ciclopentano.

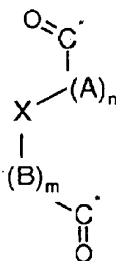
Según el término resto aromático se entiende fenilo.

35

El enunciado "A y B forman un resto cíclico, heterocíclico o aromático" indica un ciclohexano, piperidina, benceno, y piridina.

En una realización, los ácidos di-, tri- o tetracarboxílicos aquirales adecuados a usarse en la presente invención tienen la fórmula general

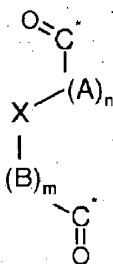
40



45

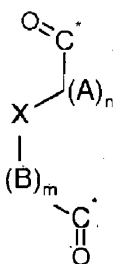
donde n y m son independientemente un entero de 1 a 20, X es HN, A y B son independientemente un alquilo C₁₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un alquenilo C₂₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

En otra realización, los ácidos di-, tri- o tetracarboxílicos aquirales adecuados a usarse en el presente método tienen la fórmula general



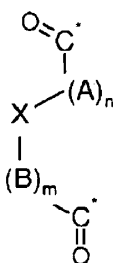
10 donde n y m son 0 o un entero de 1 a 20, X es $H_2N(CR_2)_pCR$, o $RHN(CR_2)_pCR$, donde p es 0 o entero de 1 a 20, donde cada R es H, un alquilo C_{1-10} sustituido o sin sustituir, un alquenilo C_{2-10} sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

15 En otra realización más los ácidos di-, tri- o tetracarboxílicos aquirales adecuados a usarse en el presente método tienen la fórmula general



25 donde n y m son 0 o un entero de 1 a 20, X es $HO(CR_2)_pCR$, $HS(CR_2)_pCR$, halógeno- $(CR_2)_pCR$, $HOOC(CR_2)_pCR$, $ROOC(CR_2)_pCR$, $HCO(CR_2)_pCR$, $RCO(CR_2)_pCR$, o $[HOOC(A)_n][HOOC(B)_m]CR(CR_2)_pCR$, donde p es 0 o entero de 1 a 20, cada R independientemente es H o un alquilo C_{1-10} sustituido o sin sustituir, un alquenilo C_{2-10} sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

30 En otra realización los ácidos di-, tri- o tetracarboxílicos aquirales adecuados a usarse en el presente método tienen la fórmula general



40 donde n y m son 0 o un entero de 1 a 20, X es $H_2N(CR_2)_pP$, $RHN(CR_2)_pP$, $HO(CR_2)_pP$, $HS(CR_2)_pP$, halógeno- $(CR_2)_pP$, $HOOC(CR_2)_pP$, $ROOC(CR_2)_pP$, $HCO(CR_2)_pP$, $RCO(CR_2)_pP$, o $HOOC(A)_n[HOOC(B)_m](CR_2)_pP$, donde p es 0 o entero de 1 a 20, cada R independientemente es H o un alquilo C_{1-10} sustituido o sin sustituir, un alquenilo C_{2-10} sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

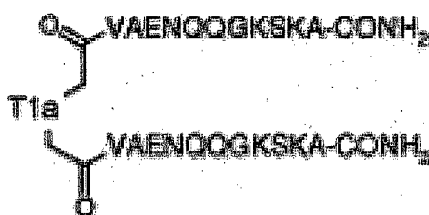
Los ácidos di-, tri- y tetracarboxílicos favorables para proporcionar la estructura de anillo pueden seleccionarse entre ácido imino diacético, ácido 2-amino malónico, ácido 3-amino glutámico, ácido 3-metilamino glutámico, ácido 3-cloro glutámico, ácido 3-metoxi-carbonil glutámico, ácido 3-acetil glutámico, ácido glutámico, ácido tricarbálico, ácido 3,4-bis-carboximetil adípico, ácido 4-(2-carboxietil)-pimélico, ácido (3,5-bis-carboximetil-fenil)-acético, ácido 3,4-bis-carboximetil-adípico, ácido benceno-1,2,4,5-tetra carboxílico, ácido 4-(3-carboxi-alilamino)-but-2-enoico, ácido 4,4-imino-dibenzoico, ácido 1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxílico, ácido 5-amino isoftálico, ácido 2-cloro malónico, ácido 3-hidroxi glutámico, y ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico.

El acoplamiento de fragmentos (acoplamiento de fragmentos o condensación de fragmentos) puede realizarse de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo como se describe en Peptide Synthesis protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 35, Capítulo 15, 303-316, Nyfeler R, Pennington MW y Dunne BM Eds., Humana Press, 1994. Por consiguiente, los fragmentos pueden sintetizarse en una fase sólida, escindir de la fase sólida con conservación completa de grupos protectores, purificarse y caracterizarse como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos adecuados también pueden obtenerse por otras técnicas descritas anteriormente.

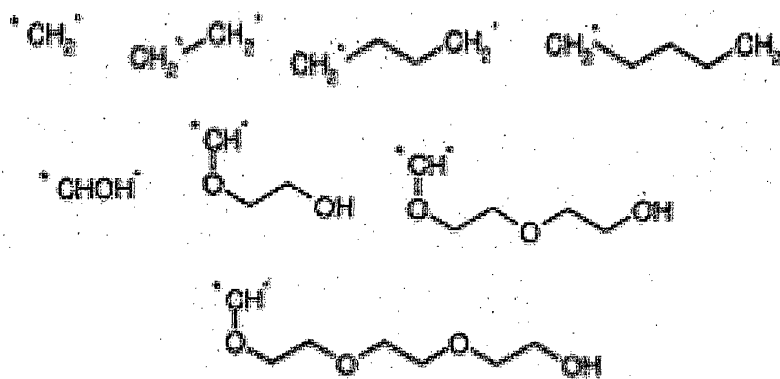
De acuerdo con la invención, se conectan dos secuencias peptídicas individuales que comprenden dos o más de las secuencias de aminoácidos definidas anteriormente entre sí de modo que una de estas dos secuencias peptídicas se una covalente a uno de dos grupos carboxílicos de una molécula enlazadora seleccionada entre las moléculas definidas anteriormente y otra de las secuencias peptídicas se una covalentemente a otro grupo carboxílico de dicha molécula enlazadora. Las secuencias peptídicas se unen covalentemente al enlazador a través de sus grupos amino o carboxi del resto de aminoácido N- o C-terminal, respectivamente. Por consiguiente, un compuesto de la invención tiene la fórmula

COOH/CONH₂-secuencia peptídica-NH-CO-enlazador-CO-NH-secuencia peptídica-COOH/CONH₂ o NH₂-secuencia peptídica-CO-NH-enlazador-NH-CO-secuencia peptídica-NH₂.

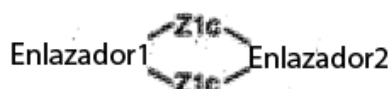
En una realización, el compuesto de acuerdo con la invención se ejemplifica por la siguiente fórmula:



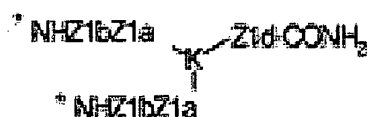
Donde T1a se selecciona entre el grupo que consiste en, donde * es el punto de unión



En otro compuesto multimérico preferido de la invención, dos secuencias peptídicas individuales se conectan entre sí a través de dos enlazadores o grupos enlazadores individuales, tales como



Enlazador2 puede tener la siguiente estructura donde * indica el punto de unión al extremo C-terminal de la secuencias de aminoácidos Z1c o Enlazador2 está ausente y el grupo C-terminal es un ácido acídico o amida (amida sin sustituir mostrada en la estructura):



Donde Z1 a es uno o dos aminoácidos independientemente seleccionados entre el grupo que consiste en F, A, G, Q, L, M, N, S, Y, T, I, P; V o está ausente.

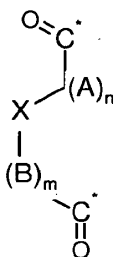
Z1b es un aminoácido seleccionado entre el grupo que consiste en F, A, G, Q, L, M, N, S, Y, T, I, P, V o está ausente.

Z1d es un beta aminoácido como por ejemplo beta-alanina.

Cada Z1c se selecciona independientemente entre una de las secuencias peptídicas mostradas en este documento.

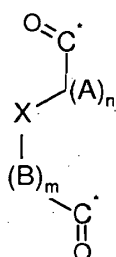
La amida C-terminal podría estar mono o disustituida con un grupo alquilo C1-20 ramificado o no ramificado. El grupo alquilo podría estar sustituido con uno o más grupos funcionales como por ejemplo un grupo hidroxilo, grupo ácido carboxílico, un grupo amida o un grupo halógeno.

Enlazador1 puede ser, en una realización, un ácido di-, tri- o tetracarboxílico aquiral adecuado que tiene la fórmula general:



donde * indica el punto de unión a la parte N-terminal de las secuencias de aminoácidos Z1c o Enlazador1 está ausente y el grupo amino N-terminal es un grupo NH₂, donde n y m son independientemente un entero de 1 a 20, X es HN, A y B son independientemente un alquilo C₁₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un alqueno C₂₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

En otra realización Enlazador1 es un ácido di-, tri- o tetracarboxílico aquiral adecuado que tiene la fórmula general:



donde * indica el punto de unión de la parte N-terminal de la secuencia de aminoácidos Z1c, donde n y m son independientemente un entero de 1 a 20, X es Y1 b-Y1 a-N, A y B son independientemente un alquilo C₁₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un alqueno C₂₋₁₀ sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

Donde Y1a es un espaciador.

Donde Y1b es un sustituyente lipófilo que comprende un grupo acilo de un ácido graso de cadena lineal o ramificado o un ácido dicarboxílico lineal o ramificado.

En una realización de la invención, el espaciador es un grupo ácido dicarboxílico que tiene de 1 a 7 grupos metileno, tal como dos grupos metileno formando dicho espaciador un puente entre el grupo amino al que Y1a está unido y un grupo amino del sustituyente lipófilo.

En una realización de la invención, el espaciador se selecciona entre la lista que consiste en beta-alanina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), ácido gamma-glutámico, Lys, Asp, Glu, un dipéptido que contiene Asp, un dipéptido que contiene Glu, o un dipéptido que contiene Lys. En una realización de la invención, el espaciador es beta-alanina. En una realización de la invención, el espaciador es ácido gamma-aminobutírico (GABA). En una realización de la invención, el espaciador es ácido cuadratura-glutámico.

En una realización de la invención, el grupo amino al que Y1a está unido forma un enlace amida con un grupo carboxílico de un espaciador, y un grupo amino del espaciador forma un enlace amida con un grupo carboxilo del sustituyente lipófilo.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{6-40}-CH_3$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-26}-CH_3$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-20}-CH_3$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo es un grupo acilo de fórmula $*C(C=O)-(CH)_mCH_3$. El * especifica el punto de unión.

m es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende un ácido dicarboxílico lineal o ramificado.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende un ácido dicarboxílico lineal o ramificado de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{6-40}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende un ácido dicarboxílico lineal o ramificado de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-26}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

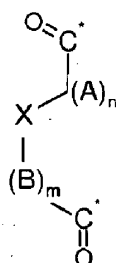
En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende un ácido dicarboxílico lineal o ramificado de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-20}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende un ácido dicarboxílico lineal o ramificado de fórmula $*C(C=O)-(CH)_{8-18}-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

En una realización preferida adicional, el sustituyente lipófilo comprende un ácido dicarboxílico lineal o ramificado de fórmula $*C(C=O)-(CH)_n-C(O)OH$. El * especifica el punto de unión.

n es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18.

En otra realización, Enlazador1 es un ácido di-, tri- o tetracarboxílico aquiral adecuado que tiene la fórmula general



donde * indica el punto de unión de la parte N-terminal de la secuencia de aminoácidos Z1c, donde n y m son 0 o un entero de 1 a 20, X es $H_2N(CR_2)_pCR$, o $RHN(CR_2)_pCR$, donde p es 0 o entero de 1 a 20, donde cada R es H, un alquilo C_{1-10} sustituido o sin sustituir, un alqueno C_{2-10} sustituido o sin sustituir, un resto cíclico sustituido o sin sustituir, un resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, un resto aromático sustituido o sin sustituir, o A y B juntos forman un resto cíclico sustituido o sin sustituir, resto heterocíclico sustituido o sin sustituir, resto aromático sustituido o sin sustituir.

En otra realización, Enlazador1 es un ácido di-, tri- o tetracarboxílico aquiral adecuado que tiene la estructura general



Según el término alquilo C₁₋₁₀ se entiende grupos alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen 1-10 átomos de carbono, por ejemplo metilo, etilo, isopropilo, butilo, y terc-butilo.

5 Según el término alqueno C₂₋₁₀ se entiende grupos alqueno de cadena lineal o ramificada que tienen 2-10 átomos de carbono, por ejemplo etilo, propeno, isopropeno, buteno, y terc-buteno.

10 Según el término resto cíclico se entiende ciclohexano, y ciclopentano.

Según el término resto aromático se entiende fenilo.

15 El enunciado "A y B forman un resto cíclico, heterocíclico o aromático" indica ciclohexano, piperidina, benceno, y piridina.

Mediante reacción con un ácido carboxílico, se obtiene una construcción del tipo X(CO-secuencia)₂-fase sólida, donde X es como se ha definido anteriormente.

20 Por el término "secuencia" se entiende, en el presente contenido, un péptido que comprende aminoácidos de origen natural y/o de origen no natural, una PNA-secuencia, o peptidomimético. Por "aminoácidos de origen natural" se entiende formas L y D de los 20 ácidos encontrados en la naturaleza. Los aminoácidos de origen no natural son, por ejemplo, aminoácidos de origen natural modificados. El término secuencia pretende adicionalmente comprender una o más de dichas secuencias. Se describen ejemplos de peptidomiméticos adecuados en Marshall G.R., (1993) Tetrahedron, 49:3547-3558. La expresión "restos químicos" indica una entidad que potencia la solubilidad o actividad biológica del LPA, y la entidad para dirigir el LPA a su diana o un marcador. Anteriormente se han descrito realizaciones preferidas para las secuencias.

30 El grupo X permite directamente o indirectamente la síntesis por etapas continuada o un acoplamiento de fragmentos de la misma secuencia, o de una o más secuencias y/o restos diferentes. La orientación de los fragmentos peptídicos (N a C o C a N) en LPA se define según se desee: En una realización, la presente invención destaca LPA con orientación N a C, en otra realización se refiere a los compuestos con presentación simultánea N a C y C a N de las secuencias, y en otra realización más, las secuencias tienen orientación C a N.

35 En el caso donde X comprende una función amino temporalmente protegida, las síntesis o acoplamiento puede realizarse directamente después de la protección. La activación adecuada de todos los grupos que contienen carboxilo que proporcionan formación eficaz del sistema de anillo (en la etapa (c), véase anteriormente) puede asegurarse usando ácido carboxi semi-equivalente. En el caso de ácidos tri- o tetracarboxílicos, el grupo carboxi activado puede derivatizarse adicionalmente con una diamina tal como etilendiamina o una amina adecuadamente funcionalizada para reacciones adicionales tales como grupo mercapto, oxi, oxo o carboxilo. En el caso de diamina, la síntesis de péptidos o acoplamiento de fragmentos puede continuarse directamente de acuerdo con la secuencia deseada o resto químico. En una realización preferida, se usa la estrategia de protección con Fmoc, pero puede usarse cualquier grupo de protección de amino dependiendo de la estrategia de síntesis o acoplamiento. Ejemplos son la estrategia con el grupo de protección Boe.

45 Como la síntesis por etapas continuada o acoplamiento de fragmentos se realiza con uno o en el caso de un resto químico bifuncional tal como lisina con dos grupos de aminoácido, se ha descubierto sorprendentemente que puede obtenerse un resto mucho mejor en comparación con dendrímeros convencionales lisina tetramérica obtenidos por la síntesis de MAP. Además, pueden usarse procedimientos óptimos de síntesis de péptidos o procedimientos de acoplamiento para las cadenas individuales unidas a la fase sólida, y su homogeneidad puede verificarse antes de formar el LPA. La escisión de la fase sólida y la desprotección simultánea de la cadena lateral puede realizarse por procedimientos convencionales de síntesis de péptidos (descritos anteriormente). Por tanto puede obtenerse un producto final que tenga composición óptima y bien definida. También puede realizarse fácilmente purificación por métodos convencionales de cromatografía tales como HPLC o filtración en gel, si se desea o necesita.

55 Los favorables ácidos di-, tri- y tetracarboxílicos para proporcionar la estructura de anillo pueden seleccionarse entre ácido imino diacético, ácido 2-amino malónico, ácido 3-amino glutárico, ácido 3-metilamino glutárico, ácido 3-cloro glutámico, ácido 3-metoxi-carbonil glutámico, ácido 3-acetil glutámico, ácido glutámico, ácido tricarbálico, ácido 3,4-bis-carboximetil adípico, ácido 4-(2-carboxietil)-pimélico, ácido (3,5-bis-carboximetil-fenil)-acético, ácido 3,4-bis-carboximetil-adípico, ácido benceno-1,2,4,5-tetra carboxílico, ácido 4-(3-carboxi-alilamino)-but-2-enoico, ácido 4,4-imino-dibenzoico, ácido 1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxílico, ácido 5-amino isoftálico, ácido 2-cloro malónico, ácido 3-hidroxi glutámico, y ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico.

60

El acoplamiento de fragmentos (acoplamiento de fragmentos o condensación de fragmentos) puede realizarse de acuerdo con procedimientos convencionales, por ejemplo como se describe en Peptide Synthesis protocols, Methods in Molecular Biology Vol. 35, Capítulo 15, 303-316, Nyfeler R, Pennington MW y Dunne BM Eds., Humana Press, 1994. Por consiguiente, pueden sintetizarse fragmentos en una fase sólida, escindirlos de la fase sólida con conservación completa de los grupos protectores, purificarse y caracterizarse como se ha descrito anteriormente. Los fragmentos adecuados también pueden obtenerse por otras técnicas descritas anteriormente.

Es una realización preferida de la invención el uso del método anterior de LPA para la producción de un compuesto de la invención.

Medicamento

Un objetivo de la invención es proporcionar un compuesto capaz de modular la actividad de NCAM, estando referido dicho compuesto por la invención como medicamento para el tratamiento de enfermedades, donde la modulación de la señalización de FGFR puede considerarse como una condición esencial para la cura.

Por consiguiente, la invención se refiere al uso de uno o más de los péptidos que comprenden una secuencia correspondiente a NCAM o un fragmento de la misma o una variante para la fabricación de un medicamento.

En una realización, el medicamento de la invención comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEC ID N.º 1-4 o fragmentos o variantes de dichas secuencias. En otra realización, el medicamento de la invención comprende un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo que comprende NCAM o un fragmento de la misma o un fragmento o variante de dicho anticuerpo.

El medicamento puede prevenir, en un aspecto, la muerte de células in vitro o in vivo, donde la composición se administra a un sujeto, in vitro o in vivo en una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos descritos anteriormente o una composición como se describe a continuación.

El medicamento de la invención comprende una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos definidos anteriormente, o una composición que comprende el compuesto definido anteriormente, en combinación con aditivos farmacéuticamente aceptables. Dicho medicamento puede formularse adecuadamente para administración oral, percutánea, intramuscular, intravenosa, intracraneal, intratecal, intracerebroventricular, intranasal o pulmonar.

Las estrategias en el desarrollo de formulaciones de medicamentos y composiciones basadas en los péptidos de la presente invención generalmente corresponden a estrategias de formulación para cualquier otro producto de fármaco basado en proteína. Los problemas potenciales y las directrices requeridas para superar estos problemas se tratan en varios libros de texto, por ejemplo "Therapeutic Peptides and Protein Formulation. Processing and Delivery Systems", Ed. A.K. Banga, Technomic Publishing AG, Basilea, 1995.

Habitualmente se preparan inyectables como soluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de su inyección. La preparación también puede emulsionarse. El ingrediente activo a menudo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la preparación puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, o que potencian la eficacia o transporte de la preparación.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto de acuerdo con la presente invención por técnicas convencionales, por ejemplo como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985 o en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir, formulación que comprende agua. Dicha formulación es típicamente una solución o una suspensión. En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que comprende al menos un 50% p/p de agua. Asimismo, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que comprende al menos un 50% p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que comprende al menos un 50% p/p de agua.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención que está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, tal como de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml. El pH puede ser de 2,0 a 10,0, tal como de 7,0 a 8,5. La formulación puede comprender adicionalmente un sistema tamponante, conservante(s), agente(s) de isotonicidad, agente(s) quelante, estabilizantes y tensioactivos. En otra realización de la invención, el pH de la formulación se selecciona entre la lista que consiste en 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9,

8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, y 10,0. Preferiblemente, el pH de la formulación es al menos 1 unidad de pH desde el punto isoeléctrico del compuesto de acuerdo con la presente invención, incluso más preferiblemente el pH de la formulación es al menos 2 unidades de pH desde el punto isoeléctrico del compuesto de acuerdo con la presente invención.

5 En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación secada por congelación, a la que el médico o el paciente añade disolventes y/o diluyentes antes de su uso, para obtener, por ejemplo, las concentraciones mencionadas anteriormente.

10 En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación secada (por ejemplo, secada por congelación o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna disolución previa.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un compuesto de acuerdo con la presente invención, y un tampón, donde dicho compuesto está presente en una concentración de 0,1 mg/ml o por encima, y donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una solución acuosa de un compuesto de acuerdo con la presente invención, y un tampón, donde dicho compuesto está presente en una concentración de 0,1 mg/ml o por encima, y donde dicha formulación tiene un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5.

25 El tampón puede seleccionarse entre el grupo que consiste en acetato sódico, carbonato sódico, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, dihidrogenofosfato sódico, hidrogenofosfato disódico, fosfato sódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, hepes, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.

30 La formulación puede comprender adicionalmente un conservante farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional de la invención, el conservante se selecciona entre el grupo que consiste en fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-feniletanol, alcohol bencílico, etanol, clorobutanol, y timerosal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorohexidina, deshidroacetato sódico, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de benzetonio, clorfenesina (3p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 30 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 5 mg/ml a 10 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el conservante está presente en una concentración de 10 mg/ml a 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

45 En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un agente isotónico. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico se selecciona entre el grupo que consiste en una sal (por ejemplo, cloruro sódico), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ejemplo, L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ejemplo, glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol), polietilenglicol (por ejemplo, PEG400), o mezclas de los mismos. Puede usarse cualquier azúcar tal como mono-, di-, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización, el aditivo de azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galacititol, dulcitol, xilitol, y arabitol. En una realización, el aditivo de alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcar mencionados anteriormente pueden usarse de forma individual o en combinación. No existe límite fijo a la cantidad usada, siempre que el azúcar o alcohol de azúcar sea soluble en la preparación líquida y no afecte de forma adversa a los efectos estabilizantes conseguidos usando los métodos de la invención. En una realización, la concentración de azúcar o alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 1 mg/ml a 7 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 24 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente isotónico está presente en una concentración de 25 mg/ml a 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un agente quelante. En una realización adicional de la invención, el agente quelante se selecciona entre sales de ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido cítrico, y ácido aspártico, y mezclas de los mismos. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 0,1 mg/ml a 2 mg/ml. En una realización adicional de la invención, el agente quelante está presente en una concentración de 2 mg/ml a 5 mg/ml. Cada uno de estos agentes quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que posiblemente muestra formación de agregados durante almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas. Por "formación de agregados" se pretende una interacción física entre las moléculas de polipéptido que provoca la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o agregados visibles grandes que precipitan en la solución. Por "durante almacenamiento" se pretende una composición o formulación farmacéutica líquida que una vez preparada, no se administra inmediatamente a un sujeto. En su lugar, después de la preparación, se envasa para almacenamiento, en una forma líquida, en un estado congelado, o en una forma secada para posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma adecuada para administración a un sujeto. Por "forma secada" se pretende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca por secado por congelación (es decir, liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 38:48-59), secado por pulverización (véase Masters (1991) en *Spray-Drying Handbook* (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, R.U.), pág. 491-676; Broadhead et al. (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; y Mumenthaler et al. (1994) *Pharm. Res.* 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) *Cryobiology* 25:459-470; y Roser (1991) *Biopharm.* 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar de forma adversa a la actividad biológica de ese polipéptido, provocando la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas tales como bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando se administra la composición farmacéutica que contiene polipéptido usando un sistema de infusión.

La expresión "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con estabilidad física aumentada, estabilidad químicas aumentada o estabilidad física y química aumentada.

La expresión "estabilidad física" de la formulación de proteína como se usa en este documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con superficies de contacto y superficies que son desestabilizantes, tales como superficies y superficies de contacto hidrófobas. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteína se evalúa mediante inspección visual y/o mediciones de turbidez después de exponer la formulación llenada en recipientes adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales) a tensión mecánica/física (por ejemplo, agitación) a diferentes temperaturas durante diversos periodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz centrada y nítida con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por clasificación en valor visual del grado de turbidez, por ejemplo, en una escala de 0 a 3 (una formulación que no muestra turbidez corresponde a un valor visual 0, y una formulación que muestra turbidez visual a la luz del día corresponde a valor visual 3). Una formulación se clasifica físicamente inestable con respecto a la agregación de proteínas cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Como alternativa, la turbidez de la formulación puede evaluarse por mediciones simples de turbidez bien conocidas para los expertos. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteína también puede evaluarse usando un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferiblemente una molécula pequeña que se une preferentemente a un confórmero no nativo de la proteína. Un ejemplo de una sonda espectroscópica molecular pequeña de la estructura proteica es Tioflavina T. La Tioflavina T es un colorante fluorescente que se ha usado ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas, y quizás otras configuraciones proteicas también, la Tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación a aproximadamente 450 nm y emisión potenciada a aproximadamente 482 nm cuando se une a una forma proteica de fibrilla. La Tioflavina T no unida es esencialmente no fluorescente a las longitudes de onda.

Otras moléculas pequeñas pueden usarse como sondas de los cambios en la estructura proteica desde estados nativos a estados no nativos. Por ejemplo, las sondas de "parche hidrófobo" que se unen preferentemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos generalmente están enterrados dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado nativo, pero llegan a exponerse según una proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Ejemplos de estas sondas espectroscópicas moleculares pequeñas son colores aromáticos hidrófobos, tales como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son

complejos de metal-aminoácido, tales como complejos con metal cobalto de aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina, y valina, o similares.

5 La expresión "estabilidad química" de la formulación de proteína como se usa en este documento se refiere a
 10 cambios covalentes químicos en la estructura proteica que conducen a la formación de productos de degradación
 química con potencial potencia biológica menor y/o potenciales propiedades inmunogénicas aumentadas en
 comparación con la estructura proteica nativa. Pueden formarse diversos productos de degradación química
 dependiendo del tipo y naturaleza de la proteína nativa y el entorno al que se expone la proteína. La eliminación de
 15 la degradación química muy probablemente no pueda evitarse completamente y a menudo se observan cantidades
 crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y uso de la formulación de proteína
 como es bien sabido por los expertos en la materia. La mayoría de las proteínas son propensas a desamidación, un
 proceso en que el grupo amida de la cadena lateral en restos glutaminilo o asparaginilo se hidroliza para formar un
 20 ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto
 peso molecular donde dos o más moléculas proteicas se unen covalentemente entre sí a través de transamidación
 y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación productos diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos
 covalentemente de degradación (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T. J. y Manning M. C., Plenum Press,
 Nueva York 1992). La oxidación (de por ejemplo restos de metionina) puede mencionarse como otra variante de
 degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteína puede evaluarse midiendo la cantidad de
 25 los productos de degradación química en diversos puntos temporales después de exposición a diferentes
 condiciones ambientales (la formación de productos de degradación a menudo puede acelerarse, por ejemplo,
 aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto individual de degradación a menudo se determina por
 separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño y/o carga de la molécula usando diversas
 técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

25 Por tanto, como se ha resumido anteriormente, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con
 estabilidad física aumentada, estabilidad química aumentada o estabilidad física y química aumentada. En general,
 una formulación debe ser estable durante su uso y almacenamiento (de conformidad con las condiciones
 recomendadas de uso y almacenamiento) hasta alcanzar la fecha de caducidad.

30 En una realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la
 presente invención es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la
 presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

35 En una realización adicional de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo
 con la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de
 almacenamiento.

40 En una realización adicional más de la invención, la formulación farmacéutica que comprende el compuesto es
 estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento. Las composiciones
 farmacéuticas de la invención pueden comprender adicionalmente una cantidad de una base de aminoácido
 suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición.
 Por "base de aminoácido" se pretende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, donde cualquier
 45 aminoácido dado está presente en su forma de base libre o en su forma salina. Cuando se usa una combinación de
 aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar
 presentes en sus formas salinas, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros
 están presentes en sus formas salinas. En una realización, los aminoácidos usados para preparar las composiciones
 de la invención son aquellos que portan una cadena lateral cargada, tal como arginina, lisina, ácido aspártico, y
 50 ácido glutámico. En una realización, el aminoácido usado para preparar las composiciones de la invención es glicina.
 Puede estar presente cualquier estereoisómero (es decir L o D) de un aminoácido particular (por ejemplo, metionina,
 histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y mezclas de los mismos) o
 combinaciones de estos estereoisómeros, en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el
 aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o su forma salina. En una realización se usa el
 55 estereoisómero L. Las composiciones de la invención también pueden formularse con análogos de estos
 aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se pretende un derivado del aminoácido de origen natural que consigue
 el efecto deseado de disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante almacenamiento de las
 composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos adecuados de arginina incluyen, por ejemplo,
 aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos adecuados de metionina incluyen etionina y butionina
 60 y los análogos adecuados de cisteína incluyen S-metil-L cisteína. Como con los otros aminoácidos, los análogos de
 aminoácido se incorporan en las composiciones en su forma de base libre o su forma salina. En una realización
 adicional de la invención, los aminoácidos o análogos de aminoácido se usan en una concentración que es
 suficiente para evitar o retardar la agregación de la proteína.

65 En una realización adicional de la invención, puede añadirse metionina (u otros aminoácidos o análogos de
 aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de restos de metionina en sulfóxido de metionina cuando el

polipéptido que actúa como agente terapéutico es un polipéptido que comprende al menos un resto de metionina susceptible a dicha oxidación. Por "inhibir" se pretende la acumulación mínima de especies oxidadas de metionina en el tiempo. La inhibición de la oxidación de metionina provoca mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Puede usarse cualquier estereoisómero de metionina (L, D o una mezcla de los mismos). La cantidad a añadir debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los restos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para las agencias reguladoras. Típicamente, esto significa que la composición contiene no más de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto puede conseguirse añadiendo metionina de modo que la relación de metionina añadida a los restos de metionina varíe de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1000:1, tal como de 10:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un estabilizante seleccionado entre el grupo de polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular. En una realización adicional de la invención, el estabilizante se selecciona entre polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3350), poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o derivados de la misma (por ejemplo, HPC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltioetanol, y diferentes sales (por ejemplo, cloruro sódico). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes estabilizantes adicionales, que potencian adicionalmente la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo en las mismas. Los agentes estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, aunque sin limitación, metionina y EDTA, que protegen el polipéptido contra la oxidación de metionina, y un tensioactivo no iónico, que protege el polipéptido contra la agregación asociada con congelación-descongelación o rotura mecánica.

En una realización adicional de la invención, la formulación comprende adicionalmente un tensioactivo. En una realización adicional de la invención, el tensioactivo se selecciona entre un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de ácido graso de sorbitán, polímeros de bloque de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros tales como Pluronic.RTM. F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán, PEO con forma de estrella, polioxietileno y derivados de polietileno tales como derivados alquilados y alcoxilados (tweens, por ejemplo Tween-20, Tween-40, Tween-80 y Brij-35), hidroxistearato de polioxietileno, monoglicéridos o derivados etoxilados de los mismos, diglicéridos o derivados de polioxietileno de los mismos, alcoholes, glicerol, lecitinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfatídico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y derivados alquilo, alcoxilo (éster de alquilo), alcoxi(alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo derivados lauroilo y miristoilo de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y los positivamente cargados DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), glicero glucolípidos (por ejemplo, galactopiranosido), esfingoglucolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina de huevo de gallina, derivados de ácido fusídico -- (por ejemplo, tauro-dihidrofusidato sódico, etc.), ácidos grasos de cadena larga y sales de los mismos y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato sódico, desoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes aniónicos (alquil-aril-sulfonatos), tensioactivos zwitteriónicos (por ejemplo, N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato), tensioactivos catiónicos (bases de amonio cuaternario) (por ejemplo, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, Dodecil .beta.-D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, Tetronic), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo puede seleccionarse entre el grupo de derivados de imidazolina, o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una realización alternativa de la invención.

El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido para los expertos. Por conveniencia, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

Es posible que puedan estar presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica de péptido de la presente invención. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de volumen, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos,

proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar de forma adversa a la estabilidad global de la formulación farmacéutica de la presente invención.

5 Las composiciones de la invención puede componerse adicionalmente en, o unirse a, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un vehículo de fármaco, sistema de suministro de fármaco y sistema avanzado de suministro de fármaco para potenciar adicionalmente la estabilidad del compuesto, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir cronoterapia bien conocida para los expertos en la materia, y aumentar la conformidad del paciente o cualquier combinación de los mismos.
 10 Ejemplos de vehículos, sistemas de suministro de fármaco y sistemas avanzados de suministro de fármaco incluyen, aunque sin limitación, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas vehículo, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos para los expertos en la materia, micelas, liposomas, microesferas, nanoparticulados, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos para los expertos en la materia del comportamiento de fases en sistemas de lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, auto-emulsionantes, auto-microemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de los mismos, y dendrímeros.

20 Las composiciones de la presente invención son específicamente útiles en la formulación de sistemas de suministro de fármaco de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada, y lenta. Más específicamente, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas parenterales de liberación controlada y liberación sostenida (conduciendo ambos sistemas a una reducción en muchas veces de la cantidad de administraciones), bien conocidos para los expertos en la materia. Incluso más preferiblemente, son los sistemas de liberación controlada y liberación sostenida administrados de forma subcutánea. Son limitar el alcance de la invención, son ejemplos de sistemas y composiciones útiles de liberación controlada hidrogeles, geles oleaginosos, cristales líquidos, micelas poliméricas, microesferas, nanopartículas.

30 Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para composiciones de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsificación, dispersión, homogenización a alta presión, encapsulación, secado por pulverización, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación de disolvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluidos supercríticos. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D. L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E. J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

40 Por tanto, las composiciones inyectables del derivado GLP-1 de la invención pueden prepararse usando las técnicas convencionales de la industria farmacéutica que implica disolver y mezclar los ingredientes según lo apropiado para dar el producto final deseado.

De acuerdo con un procedimiento, el derivado GLP-1 se disuelve en una cantidad de agua que es algo menor que el volumen final de la composición a preparar. Se añade un agente isotónico, un conservante y un tampón según lo necesario y se ajusta el valor de pH de la solución -- si fuera necesario -- usando un ácido, por ejemplo ácido clorhídrico, o una base, por ejemplo hidróxido sódico acuoso según lo necesario. Finalmente, el volumen de la solución se ajusta con agua para dar la concentración deseada de los ingredientes.

50 Además de los componentes mencionados anteriormente, las soluciones que contienen un derivado GLP-1 de acuerdo con la presente invención también pueden contener un tensioactivo para mejorar la solubilidad y/o la estabilidad del derivado GLP-1.

Puede prepararse una composición para administración nasal de ciertos péptidos, por ejemplo, como se describe en la patente europea n.º 272097 (de Novo Nordisk A/S) o en el documento WO93/18785.

55 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el derivado GLP-1 se proporciona en forma de una composición adecuada para administración por inyección. Dicha composición puede ser una solución inyectable lista para su uso o puede ser una cantidad de una composición sólida, por ejemplo, un producto liofilizado, que tiene que disolverse en un disolvente antes de poder inyectarse. La solución inyectable preferiblemente contiene no menos de aproximadamente 2 mg/ml, preferiblemente no menos de aproximadamente 5 mg/ml, más preferiblemente no menos de aproximadamente 10 mg/ml del derivado GLP-1 y, preferiblemente, no más de aproximadamente 100 mg/ml del derivado GLP-1.

60 Pueden prepararse formulaciones de los compuestos de la invención por técnicas conocidas para los expertos en la materia. Las formulaciones pueden contener vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables incluyendo microesferas, liposomas, microcápsulas, nanopartículas o similares como se ha descrito anteriormente.

65

Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de acuerdo con la presente invención pueden administrarse a un paciente que necesite dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de piel y mucosa, en sitios que eluden la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que implican absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen.

La administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención puede ser través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una combinación de las mismas, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, uretral, y parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en varias formas de dosificación, por ejemplo, como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, ungüentos, pastas, emplastos, pomadas, comprimidos, comprimidos recubiertos, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas duras de gelatina y cápsulas blandas de gelatina, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, pulverizaciones, polvo, aerosoles, inhalantes, colirios, pomadas oftálmicas, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillos vaginales, pomadas vaginales, solución de inyección, soluciones de transformación in situ, por ejemplo de gelificación in situ, de fijación in situ, de precipitación in situ, de cristalización in situ, solución de infusión, e implantes.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semi-sólidos, polvo y soluciones para administración pulmonar del compuesto usando, por ejemplo, un inhalador de dosis medida, inhalador de polvo seco y un nebulizador, sienten todos dispositivos bien conocidos para los expertos en la materia.

La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. Como alternativa, la administración parenteral puede realizarse mediante una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser una solución o suspensión para la administración del compuesto de acuerdo con la presente invención en forma de una pulverización nasal o pulmonar. Como otra opción adicional más, las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de la invención también pueden adaptarse para administración transdérmica, por ejemplo, por inyección sin aguja o a partir de un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ejemplo, bucal.

Otras formulaciones son igualmente adecuadas para administración nasal y pulmonar, por ejemplo, inhaladores y aerosoles.

El compuesto activo puede formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres del compuesto peptídico) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido mandélico. También pueden derivarse sales formadas con el grupo carboxilo libre a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína.

Las preparaciones se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que será terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrarse depende del sujeto a tratar incluyendo, por ejemplo, el peso y edad del sujeto, la enfermedad a tratar y la fase de la enfermedad. Los intervalos adecuados de dosificación son por kilogramo de peso corporal normalmente del orden de varios cientos de μg de ingrediente activo por administración con un intervalo preferido de aproximadamente 0,1 μg a 5000 μg por kilogramo de peso corporal. Usando formas monoméricas de los compuestos, las dosificaciones adecuadas a menudo están en el intervalo de 0,1 μg a 5000 μg por kilogramo de peso corporal, tal como en el intervalo de aproximadamente 0,1 μg a 3000 μg por kilogramo de peso corporal, y especialmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 μg a 1000 μg por kilogramo de peso corporal. Usando formas multiméricas de los compuestos, las dosificaciones adecuadas a menudo están en el intervalo de 0,1 μg a 1000 μg por kilogramo de peso corporal, tal como en el intervalo de aproximadamente 0,1 μg a 750 μg por kilogramo de peso corporal, y especialmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 μg a 500 μg por kilogramo de peso corporal tal como en el intervalo de aproximadamente 0,1 μg a 250 μg por kilogramo de peso corporal. En particular cuando se administran de forma nasal se usan dosificaciones más pequeñas que cuando se administran por otras vías. La administración puede realizarse una vez o puede estar seguida de posteriores administraciones. La dosificación dependerá de la vía de administración y variará con la edad y peso del sujeto a tratar. Una dosificación preferida de formas multiméricas estaría en el intervalo de 1 mg a 70 mg por 70 kg de peso corporal. Para la mayoría de indicaciones, se prefiere una aplicación localizada o sustancialmente localizada.

Algunos de los compuestos de la presente invención son suficientemente activos, pero para algunos de los otros, el efecto se potenciará si la preparación comprende adicionalmente aditivos y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichos aditivos y vehículos serán conocidos en la técnica. En algunos casos, será ventajoso incluir un compuesto, que promueva el suministro de la sustancia activa a su diana como se ha descrito anteriormente.

En muchos casos, será necesario administrar la formulación múltiples veces. La administración puede ser una infusión continua, tal como infusión o administración intraventricular en más dosis tal como más veces al día, diariamente, más veces a la semana, semanalmente, etc. Se prefiere que la administración del medicamento se inicie antes o por después de que el individuo se haya sometido al factor o factores que pueden conducir a muerte celular. Preferiblemente, el medicamento se administra en 8 horas desde la aparición del factor, tal como en 5 horas desde la aparición del factor. Muchos de los compuestos muestran un efecto a largo plazo mediante el cual la administración de los compuestos puede realizarse con intervalos largos, tales como 1 semana o 2 semanas. En relación con el uso en guías de nervios, la administración puede ser continua o en pequeñas partes en base basada en la liberación controlada del compuesto o compuestos activos. Además, pueden usarse precursores para controlar la tasa de liberación y/o sitio de liberación. Otros tipos de implantes así como administración oral puede basarse asimismo en liberación controlada y/o el uso de precursores.

Como se ha analizado anteriormente, la presente invención se refiere a compuestos para su uso en un tratamiento de individuos para inducir diferenciación, modular la proliferación, estimular la regeneración, la plasticidad neuronal y la supervivencia de células in vitro o in vivo, implicando el tratamiento administrar una cantidad eficaz de uno o más compuestos definidos anteriormente.

Otra estrategia para administración es implantar o inyectar células capaces de expresar y secretar el compuesto en cuestión. De ese modo el compuesto puede producirse en la localización donde va a actuar.

Tratamiento

Los compuestos de acuerdo con la invención son particularmente útiles para tratar enfermedades neurodegenerativas, así como afecciones con cognición alterada, y el tratamiento de acuerdo con la invención es, en una realización, útil para inducir la diferenciación, modular la proliferación, estimular la regeneración, la plasticidad neuronal y la supervivencia de células, por ejemplo células que se implantan o trasplantan. Los compuestos son útiles para las enfermedades y afecciones mencionadas a continuación, en particular, útiles para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, isquemia cerebral, así como estrés.

En una realización adicional, el tratamiento puede ser para estimulación de la supervivencia de células que están en riesgo de morir debido a una diversidad de factores, tales como traumatismos y lesiones, enfermedades agudas, enfermedades crónicas y/o trastornos, en particular enfermedades degenerativas que normalmente conducen a muerte celular, otros factores externos, tales como tratamientos médicos y/o quirúrgicos y/o métodos de diagnóstico que pueden causar formación de radicales libres o en caso contrario tienen efectos citotóxicos, tales como rayos X y quimioterapia. En relación a quimioterapia, los péptidos de acuerdo con la invención son útiles en el tratamiento del cáncer.

Por tanto, el tratamiento comprende el tratamiento y/o profilaxis de la muerte celular en relación a enfermedades o afecciones del sistema nervioso central y periférico, tal como daño nervioso postoperatorio, daño nervioso traumático, por ejemplo resultante de lesión de médula espinal, mielinización alterada de fibras nerviosas, daño post-isquémico, por ejemplo resultante de una apoplejía, demencia multi-infarto, esclerosis múltiple, degeneración de los nervios asociada con diabetes mellitus, degeneración neuro-muscular, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, o enfermedad de Huntington.

Además, en relación a enfermedades o afecciones de los músculos, incluyendo afecciones con función alterada de conexiones neuro-musculares, tales como trastornos tróficos genéticos o traumáticos de los músculos; o para el tratamiento de enfermedades o afecciones de diversos órganos, tales como afecciones degenerativas de las gónadas, del páncreas, tal como diabetes mellitus tipo I y II del riñón, tal como nefrosis, los compuestos de acuerdo con la invención pueden usarse para inducir la diferenciación, modular la proliferación, estimular la regeneración, la plasticidad neuronal y la supervivencia, es decir, estimular la supervivencia.

Además, el tratamiento puede ser para prevenir la muerte celular de células musculares del corazón, tal como después de infarto agudo de miocardio, para inducir angiogénesis. Además, en una realización, el tratamiento es para la estimulación de la supervivencia de las células musculares del corazón, tal como supervivencia después de infarto agudo de miocardio. En otro aspecto, el tratamiento es para la revascularización, tal como después de lesiones.

También está dentro del alcance de la invención un uso de los péptidos para promover la curación de heridas. Los presentes péptidos son capaces de estimular la angiogénesis y de ese modo pueden promover el proceso de curación de heridas.

La invención describe adicionalmente un uso de los péptidos en el tratamiento del cáncer.

La regulación de la actividad de receptores tirosina quinasa es importante para la angiogénesis, proliferación y propagación del tumor.

En una realización adicional más, un uso de los péptidos es para la estimulación de la capacidad de aprender y/o de la memoria de corto y/o largo plazo, ya que la actividad de FGFR es importante para la diferenciación de las células neurales.

- 5 En otra realización más, un péptido para su uso de acuerdo con la invención es para el tratamiento de daños corporales debidos al consumo de alcohol. Conciérne particularmente a las malformaciones en el desarrollo de fetos, alteraciones neuroconductuales a largo plazo, hepatopatía alcohólica.

10 El tratamiento terapéutico de enfermedades por priones que incluye el uso de un péptido es otra realización más de la invención.

En particular, el uso de acuerdo con la invención de un péptido puede ser para el tratamiento de afecciones clínicas, tales como neoplasias tales como neoplasias malignas, neoplasias benignas, carcinoma in situ y neoplasias de comportamiento incierto, cáncer en mama, tiroides, páncreas, cerebro, pulmón, riñón, próstata, hígado, corazón, 15 piel, órgano sanguíneo, músculos (sarcoma), cánceres con disfunción y/o sobre- o sub-expresión de receptores específicos y/o expresión de receptores mutados o asociados con receptores solubles, tales como receptores de Erb y receptores de FGF, enfermedades de glándulas endocrinas, tales como diabetes mellitus I y II, tumor de glándula pituitaria, psicosis, tales como afecciones psicóticas orgánicas seniles y preseniles, psicosis alcohólicas, psicosis por fármacos, afecciones psicóticas orgánicas transitorias, enfermedad de Alzheimer, lipidosis cerebral, epilepsia, 20 paresia general [sífilis], degeneración hepatolenticular, corea de Huntington, enfermedad de Jakob-Creutzfeldt, esclerosis múltiple, enfermedad de Pick del cerebro, poliarteritis nodosa, sífilis, trastornos esquizofrénicos, psicosis afectivas, trastornos neuróticos, trastornos de personalidad, incluyendo neurosis caracterial, trastorno no psicótico de personalidad asociado con síndromes cerebrales orgánicos, trastorno paranoide de personalidad, personalidad fanática, personalidad (trastorno) paranoide, rasgos paranoides, desviaciones sexuales y trastornos o disfunciones (incluyendo deseo sexual reducido por cualquier razón), retraso mental, enfermedad en el sistema nervioso y 25 órganos sensoriales, tales como discapacidad de visión, audición, olfato, tacto, gusto, anomalías cognitivas después de enfermedad, lesión (por ejemplo, después de traumatismo, procedimiento quirúrgico, y violencia), enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central, tal como meningitis, encefalitis, degeneraciones cerebrales tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Pick, degeneración senil del cerebro, senilidad no especificada, 30 hidrocefalia comunicante, hidrocefalia obstructiva, enfermedad de Parkinson incluyendo otra enfermedad extra piramidal y trastornos de movimiento anormal, enfermedad espinocerebelosa, ataxia cerebelosa, de Marie Sanger-Brown, disineria cerebelosa mioclónica, degeneración cerebelosa primaria, tal como atrofia muscular espinal, familiar, juvenil, atrofia muscular espinal en el adulto, enfermedad de neuronas motoras, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de neuronas motoras, parálisis bulbar progresiva, parálisis pseudobulbar, esclerosis lateral 35 primaria, otras enfermedades de células del asta anterior, enfermedad de células del asta anterior, no especificada, otras enfermedades de médula espinal, siringomielia y siringobulbia, mielopatías vasculares, infarto agudo de médula espinal (embólico) (no embólico), trombosis arterial de médula espinal, edema de médula espinal, hematomielia, mielopatía necrótica subaguda, degeneración combinada subaguda de médula espinal en enfermedades clasificadas en otra parte, mielopatía, mielitis inducida por fármacos, inducida por radiación, 40 trastornos del sistema nervioso autónomo, trastornos del sistema periférico autónomo, simpático, parasimpático, o vegetativo, disautonomía familiar [síndrome de Riley-Day], neuropatía autónoma periférica idiopática, síncope y síndrome del seno carotídeo, distrofia o parálisis simpática cervical, neuropatía autónoma periférica en trastornos clasificados en otra parte, amiloidosis, enfermedades del sistema nervioso periférico, lesiones del plexo braquial, síndrome de la costilla cervical, síndrome costoclavicular, síndrome del escaleno anterior, síndrome del opérculo 45 torácico, neuritis braquial o radiculitis no especificada, incluyendo en neonatos, neuropatía inflamatoria y tóxica, incluyendo polineuritis infecciosa aguda, síndrome de Guillain-Barre, polineuritis post-infecciosa, polineuropatía en enfermedad vascular de colágeno, trastornos del globo incluyendo trastornos que afectan a múltiples estructuras del ojo, tal como endoftalmitis purulenta, enfermedades del oído y apófisis mastoides, cardiopatía reumática crónica, cardiopatía isquémica, arritmia, enfermedades en el sistema pulmonar, sistema respiratorio, sensorial, por ejemplo, 50 oxigenación, asma, anormalidad de órganos y tejidos blandos en neonatos, incluyendo en el sistema nervioso, complicaciones de la administración de anestesia u otra sedación en el parto y alumbramiento, enfermedades en la piel incluyendo infección, problema de circulación insuficiente, lesión por quemadura y otras lesiones mecánicas y/o físicas, lesiones, incluyendo después de cirugía, lesión por aplastamiento, quemaduras, lesiones a nervios y médula espinal, incluyendo división de nervios, lesión en la continuidad (con o sin herida abierta), neuroma traumático (con o son herida abierta), parálisis traumática transitoria (con o sin herida abierta), perforación o laceración accidental durante procedimiento médico, lesión al nervio óptico y las vías, lesión al nervio óptico, segundo nervio craneal, lesión al quiasma óptico, lesión a las vías ópticas, lesión a la corteza visual, ceguera no especificada, lesión a otro nervio o nervios craneales, lesión a otros nervios y no especificados, envenenamiento con fármacos, sustancias medicinales y biológicas, trastornos musculares atróficos genéticos o traumáticos; o para el tratamiento de 60 enfermedades o afecciones de diversos órganos, tales como enfermedades degenerativas de las gónadas, del páncreas, tal como diabetes mellitus tipo I y II, del riñón, tal como nefrosis, Scrapie, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Gerstmann-Straussler-Sheinker (GSS); síndrome de dolor, encefalitis, consumo de drogas/alcohol, ansiedad, daño nervioso postoperatorio, isquemia peri-operatoria, trastornos inflamatorios con daño tisular, afectando al agente infeccioso o protegiendo el tejido, VIH, hepatitis, y los siguientes síntomas, trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide, SLE, ALS, y MS, efectos anti-inflamatorios, asma y otras reacciones alérgicas, infarto de miocardio agudo, y otros trastornos relacionados o secuencias de AMI, trastornos metabólicos, 65

tales como trastornos lipídicos de obesidad (por ejemplo, hipercolesterolemia, arterosclerosis, trastornos de transporte y metabolismo de aminoácidos, trastornos del metabolismo de purina y pirimidina y gota, trastornos óseos, tales como fractura, osteoporosis, osteoartritis (OA), dermatitis atrófica, psoriasis, trastornos causados por infección, protección o maduración de células madre in vivo o in vitro.

5 En una realización adicional más, el medicamento se administra para aumentar el bienestar, tal como estimulación de la motivación, el deseo o el placer sexual. El bienestar puede ser físico así como psicológico.

Anticuerpo

10 Un objetivo de la presente descripción proporciona el uso de un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o proteína recombinante del mismo capaz de unirse selectivamente a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de NCAM o un fragmento, homólogo o variante de la misma. La descripción se refiere a cualquier anticuerpo capaz de unirse selectivamente a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivada de NCAM, seleccionada entre cualquiera de las secuencias expuestas en las SEC ID N.º 1-4, o un fragmento o variante de dicha secuencia.

15 Por el término "epítipo" se entiende el grupo específico de átomos (en una molécula de antígeno) que los anticuerpos (de ese antígeno) reconocen. El término "epítipo" es el equivalente a la expresión "determinante antigénico". El epítipo puede comprender 3 o más restos de aminoácido, tal como por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8 restos de aminoácido, localizados en cercana proximidad, tal como dentro de una secuencia de aminoácidos de contiguos, o localizados en partes distantes de la secuencia de aminoácidos de un antígeno, pero que debido al plegamiento de la proteína se han aproximado entre sí.

20 Las moléculas de anticuerpo pertenecen a una familia de proteínas plasmáticas llamadas inmunoglobulinas, cuyo componente esencial básico, el plegamiento o dominio de inmunoglobulina, se usa en diversas formas en muchas moléculas del sistema inmune y otros sistemas de reconocimiento biológico. Una inmunoglobulina típica tiene cuatro cadenas polipeptídicas, que contienen una región de unión a antígeno conocida como región variable y una región no variable conocida como región constante.

25 Los anticuerpos e inmunoglobulinas nativas son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo: El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos particulares de aminoácido forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Novotny J, y Haber E. Proc Natl Acad Sci USA. 82(14):4592-6, 1985).

30 Dependiendo de las secuencias de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existe al menos cinco (5) clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG-1, IgG-2, IgG-3 y IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa (α), delta (δ), épsilon (ε), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las cadenas ligeras de los anticuerpos pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base las secuencias amino de su dominio constante. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

35 El término "variable" en el contexto de dominio variable de anticuerpos, se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre anticuerpos. Los dominios variables son para la unión y determinan la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) también conocidas como regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada.

40 Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones flanqueantes (FR).

45 Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina α, conectadas por tres CDR, que forman bucles de conexión, y en algunos casos forman parte de la estructura de la lámina. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un

50

anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

5 Un anticuerpo que se contempla para su uso en la presente descripción por tanto puede estar en cualquiera de una diversidad de formas, incluyendo una inmunoglobulina completa, un fragmento de anticuerpo tal como Fv, Fab, y fragmentos similares, un anticuerpo de cadena sencilla que incluye las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del dominio variable, todas las cuales están bajo el amplio término "anticuerpo", como se usa en este documento. La presente descripción contempla el uso de cualquier especificidad de un anticuerpo, policlonal o monoclonal, y no se limita a anticuerpos que reconocen e inmuno-reaccionan con un antígeno específico. En el contexto de los métodos tanto terapéuticos como de selección descritos a continuación, realizaciones preferidas son el uso de un anticuerpo o fragmento del mismo que es inespecífico para un antígeno o epítipo de la invención.

15 La expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmento Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fe" residual, así llamado por su capacidad de cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos fragmentos de unión a antígeno que tienen capacidad de unión cruzada al antígeno, y un fragmento residual diferente (que se llama pFc'). Fragmentos adicionales pueden incluir diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Como se usa en este documento, "fragmento funcional" con respecto a anticuerpos se refiere a fragmentos Fv, F(ab) y F(ab)₂.

25 La expresión "fragmento de anticuerpo" se usa en este documento de forma intercambiable con la expresión "fragmento de unión a antígeno".

30 Los fragmentos de anticuerpo pueden ser tan pequeños como de aproximadamente 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 9 aminoácidos, aproximadamente 12 aminoácidos, aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 17 aminoácidos, aproximadamente 18 aminoácidos, aproximadamente 20 aminoácidos, aproximadamente 25 aminoácidos, aproximadamente 30 aminoácidos o más. En general, un fragmento de anticuerpo puede tener cualquier límite de tamaño superior siempre que tenga propiedades similares o inmunológicas respecto al anticuerpo que se une con especificidad a un epítipo que comprende una secuencia peptídica seleccionada entre cualquiera de las secuencias identificadas en este documento como SEC ID N.º 1-13, o un fragmento de dichas secuencias. Por tanto, en el contexto de la presente descripción, la expresión "fragmento de anticuerpo" es idéntica a la expresión "fragmento de unión a antígeno".

40 Los fragmentos de anticuerpo retienen alguna capacidad de unirse selectivamente con su antígeno o receptor. Algunos tipos de fragmentos de anticuerpo se definen del siguiente modo:

45 Fab es el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo. Un fragmento Fab puede producirse por digestión del anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada.

45 Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo.

50 Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.

(Fab')₂ es el fragmento de un anticuerpo que puede obtenerse por tratamiento del anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción.

55 F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos por dos enlaces disulfuro.

60 Fv es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en una asociación no covalente ajustada (dímero V_H - V_L). Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H - V. De forma colectiva, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad inferior que el sitio completo de unión.

65 Anticuerpo de cadena sencilla ("SCA") se define como una molécula diseñada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico

adecuado como una molécula de cadena sencilla genéticamente fusionada. Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se mencionan como fragmentos "Fv de cadena sencilla" o "sFv" de anticuerpo. Generalmente, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que posibilita que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 113: 269-315 Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, NY, 1994.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a una dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, el documento EP 404,097; el documento WO 93/11161, y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444 - 6448 (1993).

La descripción también contempla anticuerpos multivalentes que tienen al menos dos dominios de unión. Los dominios de unión pueden tener especificidad por el mismo ligando o por diferentes ligandos. En una realización, la molécula multiespecífica es un anticuerpo biespecífico (BsAb), que porta al menos dos dominios diferentes de unión, al menos uno de los cuales es de origen de anticuerpo. Los anticuerpos multivalentes pueden producirse por varios métodos. Se describen diversos métodos para preparar anticuerpos bi- o multivalentes, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; y 5.482.858.

La descripción contempla anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, fragmentos de unión a antígeno y proteínas recombinantes de los mismos que son capaces de unirse a un epítipo de acuerdo con la invención.

La preparación de anticuerpos policlonales es bien conocida para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Green et al. 1992, *Production of Polyclonal Antisera*, en: *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press); Coligan, et al., *Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats Mice and Hamsters*, en: *Current Protocols in Immunology*, sección 2.4.1.

La preparación de anticuerpos monoclonales asimismo es convencional. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-7 (1975); Coligan, et al., secciones 2.5.1-2.6.7; y Harlow, et al., en: *Antibodies: A Laboratory Manual*, página 726, Cold Spring Harbor Pub. (1988). Pueden aislarse y purificarse anticuerpos monoclonales de cultivos de hibridoma mediante una diversidad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con Proteína-A Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan, et al., secciones 2.7.1-2.7.12 y secciones 2.9.1-2.9.3; Barnes, et al. *Purification of Immunoglobulin G (IgG)*. En: *Methods in Molecular Biology*, 1992, 10:79-104, Humana Press, NY.

Los métodos de manipulación in vitro e in vivo de anticuerpos monoclonales son bien conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a usarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256, 495-7, o pueden prepararse por métodos recombinantes, por ejemplo, como se describe en el documento US 4.816.567.

Los anticuerpos monoclonales para su uso con la presente descripción también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624-628, así como en Marks et al., 1991, *J Mol Biol* 222: 581-597. Otro método implica humanizar un anticuerpo monoclonal por medios recombinantes para generar anticuerpos que contengan secuencias específicas humanas y reconocibles. Véase, por ejemplo, Holmes, et al., 1997, *J Immunol* 158:2192-2201 y Vaswani, et al., 1998, *Annals Allergy, Asthma & Immunol* 81:105-115.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones convencionales de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe entenderse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular.

Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de

anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (documento US 4.816.567); Morrison et al., 1984, Proc Natl Acad Sci 81: 6851-6855.

Los métodos para preparar fragmentos de anticuerpo también son conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988). Los fragmentos de anticuerpo de la presente descripción pueden prepararse por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse por métodos convencionales de digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento de 5 S designado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos Fab' monovalentes de 3,5 S. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fe directamente. Estos métodos se describen, por ejemplo, en el documento US 4.036.945 y US 4.331.647, y referencias contenidas en los mismos.

También pueden usarse otros métodos para escindir anticuerpos, tal como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadena ligera-pesada, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, químicas, o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que el anticuerpo intacto reconoce. Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente o las cadenas variables pueden estar unidas por un enlace disulfuro intermolecular o unirse de forma cruzada por agentes químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (sFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador conectando los dos dominios V. Se describen métodos para producir sFv, por ejemplo, por Whitlow, et al., 1991, En: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:97; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426; documento US 4.946.778; y Pack, et al., 1993, *BioTechnology* 11:1271-77.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una única región determinante de complementariedad (CDR). Los péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") a menudo están implicados en el reconocimiento y unión al antígeno. Los péptidos CDR pueden obtenerse clonando o construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de células productoras de anticuerpo. Véase, por ejemplo Larrick, et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 106 (1991).

La descripción contempla formas humanas y humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos). Dichos anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana, tal como la secuencia de reconocimiento de epítipo. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo destinatario) en que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del destinatario están remplazados por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. El anticuerpo o anticuerpos humanizados que contienen una o más secuencias mínimas del anticuerpo o anticuerpos de la descripción, tal como una o más secuencias que reconocen uno o más epítopos descritos en este documento, es uno de las realizaciones preferidas de la invención.

En algunos casos, se remplazan restos flanqueantes de Fv de la inmunoglobulina humana por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo destinatario ni en las secuencias importadas de CDR o flanqueantes. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente y optimizar el funcionamiento del anticuerpo. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase: Jones et al., 1986, *Nature* 321, 522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332, 323-329; Presta, 1992, *Curr Op Struct Biol* 2:593-596; Holmes et al., 1997, *J Immunol* 158:2192-2201 y Vaswani, et al., 1998, *Annals Allergy, Asthma & Immunol.* 81:105-115.

La generación de anticuerpos puede conseguirse por cualquier método convencional en la técnica para producir anticuerpos policlonales y monoclonales usando fragmentos naturales o recombinantes de una secuencia seleccionada entre cualquiera de las secuencias identificadas como SEC ID N.º 1-4, como antígeno. Dichos anticuerpos también pueden generarse usando variantes o fragmentos de las SEC ID N.º 1-4.

Los anticuerpos también pueden producirse in vivo por el individuo a tratar, por ejemplo, administrando un fragmento inmunogénico de acuerdo con la invención a dicho individuo. Por consiguiente, la presente descripción se refiere adicionalmente a una vacuna que comprende un fragmento inmunogénico descrito anteriormente.

5 La descripción también se refiere a un método para producir un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método una etapa de proporcionar un fragmento inmunogénico descrito anteriormente.

10 La descripción se refiere tanto a un anticuerpo que es capaz de modular, tal como potenciar o atenuar, la función biológica de NCAM, en particular una función relacionada con el crecimiento y supervivencia de células neurales, como a un anticuerpo que puede reconocer y unirse específicamente a NCAM sin modular la actividad biológica de la misma.

15 La descripción se refiere al uso de los anticuerpos anteriores para aplicaciones terapéuticas que implican la modulación de la actividad de NCAM.

En un aspecto, la descripción se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito anteriormente.

20

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ENKAM
- 5 <120> Nuevos péptidos derivados de NCAM (FGLS)
- <130> P1767PC00
- <160> 73
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 11
- 15 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Derivada de NCAM
- 20 <400>1

- Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10
- 25 <210> 2
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> homólogo
- <400> 2

- Glu Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10
- 35 <210> 3
- <211> 13
- <212> PRT
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> homólogo
- 45 <400> 3

- Asn Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10
- 50 <210> 4
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 55 <220>
- <223> homólogo
- <400> 4

- Asn Ser Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10
- 60 <210> 5
- <211> 12

ES 2 559 634 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> homólogo

 <400> 5

 Ala Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10
 10
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> homólogo

 <400> 6
 20
 Gly Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10
 25
 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> homólogo
 30
 <400> 7

 Leu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10
 35
 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> homólogo

 <400> 8

 Met Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10
 45
 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> homólogo

 <400> 9

 Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10
 60
 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT

ES 2 559 634 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

5 <400> 10

Pro Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

10 <210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> homólogo

<400> 11

20 Ile Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

30 <400> 12

Gln Ala Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> homólogo

<400> 13

Gln Gly Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

45 <210> 14
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> homólogo

<400> 14

55 Gln Leu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 13
60 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 559 634 T3

<220>
 <223> homólogo

<400> 15

5

Gln Met Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

<210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> homólogo

15

<400> 16

Gln Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

20

<210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> homólogo

<400> 17

Gln Pro Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

30

<210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213>> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> homólogo

40

<400> 18

Gln Ile Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

45

<210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> homólogo

<400> 19

Asn Ala Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

55

<210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>

ES 2 559 634 T3

<223> homólogo

<400> 20

5 Asn Gly Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 13
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

15 <400> 21

Asn Leu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> homólogo

<400> 22

Asn Met Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

30 <210> 23
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> homólogo

<400> 23

40 Asn Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 13
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

50 <400> 24

Asn Pro Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

55 <210> 25
<211> 13
<212> PRT
60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

ES 2 559 634 T3

<400> 25

Asn Ile Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

5 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> homólogo

<400> 26

Ser Ala Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

15 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> homólogo

25 <400> 27

Ser Gly Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

30 <210> 28
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> homólogo

<400> 28

Ser Leu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

40 <210> 29
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> homólogo

50 <400> 29

Ser Met Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

55 <210> 30
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> homólogo

60 <400> 30

ES 2 559 634 T3

Ser Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

5 <210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> homólogo
<400> 31

Ser Pro Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

15 <210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> homólogo
<400> 32

Ser Ile Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

25 <210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> homólogo
<400> 33

Thr Ala Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

35 <210> 34
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> homólogo
<400> 34

Thr Gly Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

45 <210> 35
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> homólogo
<400> 35

Thr Leu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

55 <210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> homólogo
<400> 36

ES 2 559 634 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> homólogo

<400> 46

Gly Ile Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

10

<210> 47
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> homólogo

20

<400> 47

Asp Ala Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

25

<210> 48
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> homólogo

<400> 48

Asp Gly Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

35

<210> 49
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> homólogo

<400> 49

45

Asp Leu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

50

<210> 50
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> homólogo

<400> 50

Asp Met Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

60

<210> 51

ES 2 559 634 T3

<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> homólogo

<400> 51

10 Asp Val Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

20 <400> 52

Asp Pro Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> homólogo

<400> 53

Asp Ile Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

35 <210> 54
<211> 13
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

<400> 54

45 Glu Ala Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

55 <400> 55

Glu Gly Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

60 <210> 56
<211> 13

ES 2 559 634 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> homólogo

<400> 56

Glu Leu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

10

<210> 57
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> homólogo

<400> 57

20

Glu Met Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

25

<210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> homólogo

<400> 58

35

Glu Pro Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

40

<210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> homólogo

<400> 59

Glu Ile Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

50

<210> 60
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> homólogo

<400> 60

Ala Asp Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
 1 5 10

60

<210> 61
 <211> 13
 <212> PRT

ES 2 559 634 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> homólogo

5

<400> 61

Gly Asp Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

10

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> homólogo

<400> 62

20

Leu Asp Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> homólogo

30

<400> 63

Met Asp Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

35

<210> 64
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> homólogo

<400> 64

45

Val Asp Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> homólogo

<400> 65

55

Pro Asp Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

60

<210> 66
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 559 634 T3

<220>
<223> homólogo.

5 <400> 66

Ile Asp Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> homólogo

15 <400> 67

Ala Glu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

20

<210> 68
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> homólogo

<400> 68

Gly Glu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

30

<210> 69
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> homólogo

40 <400> 69

Leu Glu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

45

<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> homólogo

<400> 70

Met Glu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

55

<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60

<220>

ES 2 559 634 T3

<223> homólogo

<400> 71

5 Val Glu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> homólogo

15 <400> 72

Pro Glu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 73

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> homólogo

<400> 73

30 Ile Glu Val Ala Glu Asn Gln Gln Gly Lys Ser Lys Ala
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de 13 aminoácidos o menos que comprende la secuencia QQGKSKA, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

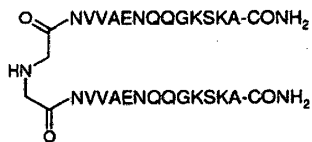
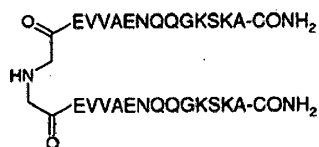
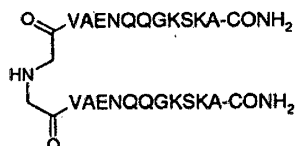
5 2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido se selecciona entre el grupo que consiste en

10 VAENQQGKSKA (SEC ID N.º 1)
 EVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 2)
 NVVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 3) y
 NSVAENQQGKSKA (SEC ID N.º 4),

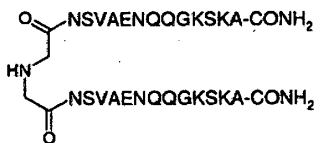
15 o un fragmento o variante de los mismos, en el que dicha variante comprende al menos una sustitución de aminoácido.

3. Un compuesto que consiste en un dímero de dos péptidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 conectados entre sí a través de un enlazador o un grupo enlazador, en el que dicho compuesto se selecciona entre el grupo que

20 consiste en:

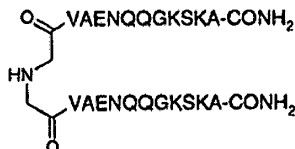


25



4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho compuesto es:

30



5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que dicho péptido es capaz de interactuar con un FGFR, tal como unirse a FGFR.

35

6. Un péptido o un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho péptido es capaz de modular la señalización de FGFR, estimular la señalización de FGFR y/o inhibir la señalización de FGFR.

7. Un péptido o un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho péptido es capaz de estimular la extensión de neuritas, la supervivencia celular, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y/o la memoria.
- 5 8. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido o compuesto definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
9. Un péptido o un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso como medicamento.
- 10 10. Un péptido o un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones en las que es esencial la modulación de la señalización de FGFR.
- 15 11. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones del sistema nervioso central o periférico.
- 20 12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección en la que la estimulación de la diferenciación de células neurales, la supervivencia de células neurales, la neurogénesis, la proliferación de células madre, la diferenciación de células madre, y/o el aprendizaje y la memoria es beneficioso para la recuperación de dicha enfermedad o afección.
- 25 13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de apoplejía, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, daño nervioso postoperatorio, daño nervioso traumático, mielinización alterada de fibras nerviosas, daño post-isquémico, demencia multi-infarto, esclerosis múltiple, degeneración de los nervios asociada con diabetes mellitus, degeneración neuro-muscular, esquizofrenia, trastornos del estado de ánimo, o trastornos maniaco depresivos.
- 30

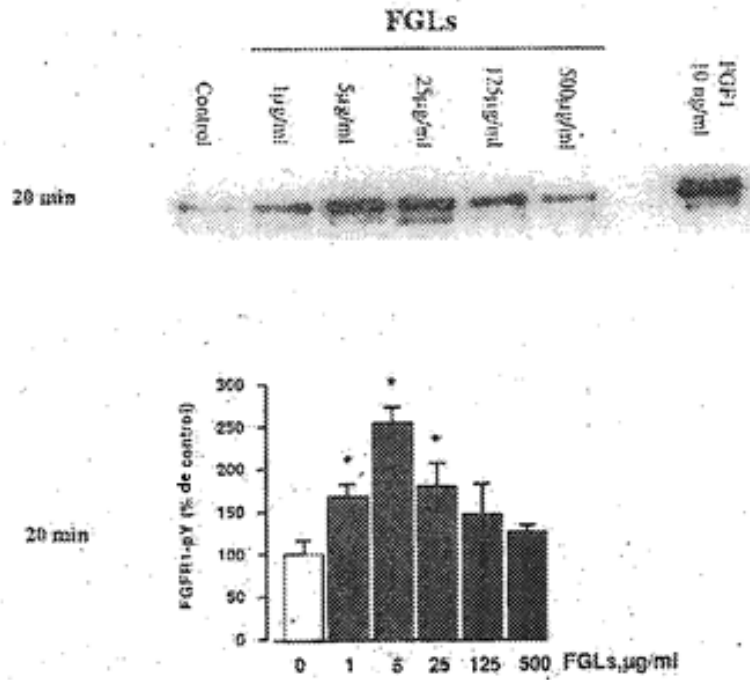


Figura 1

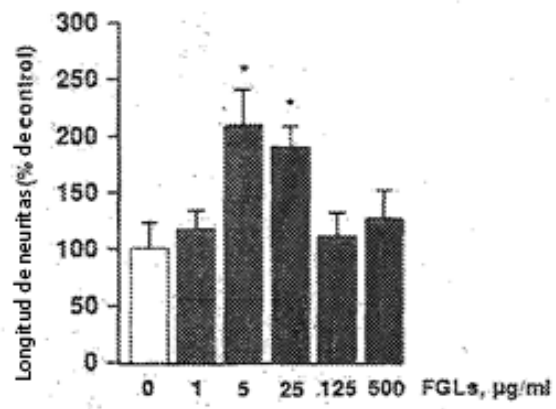


Figura 2

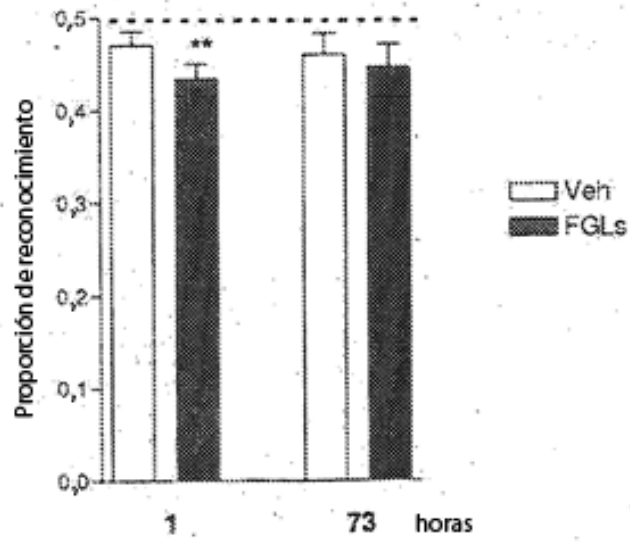


Figura 3

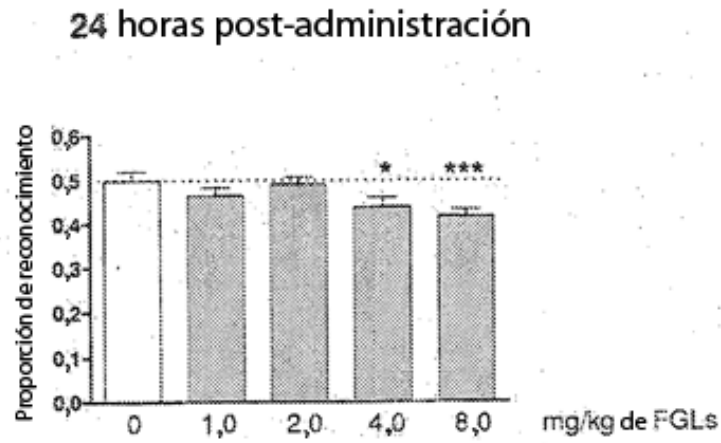
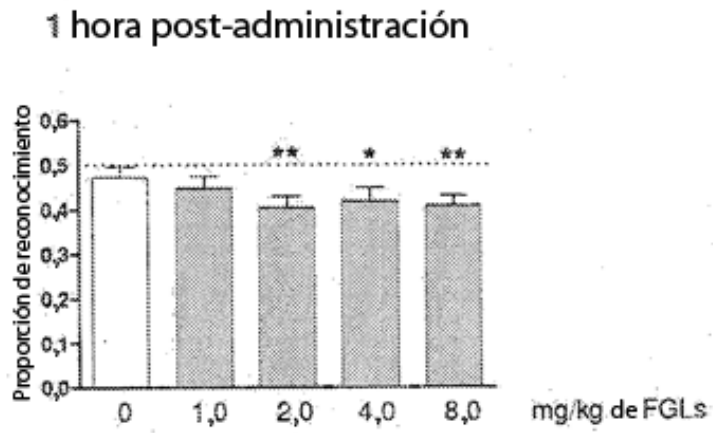


Figura 4

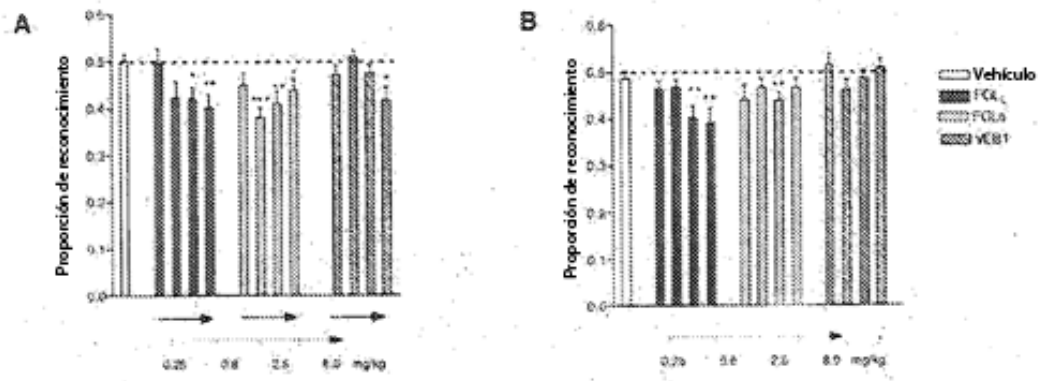


Figura 5

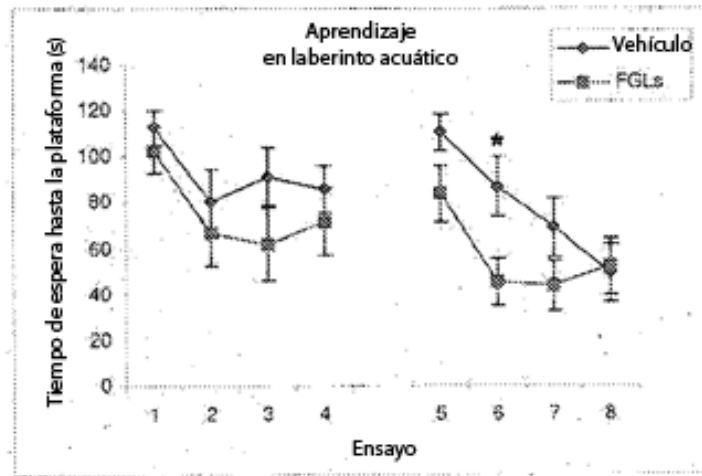


Figura 6

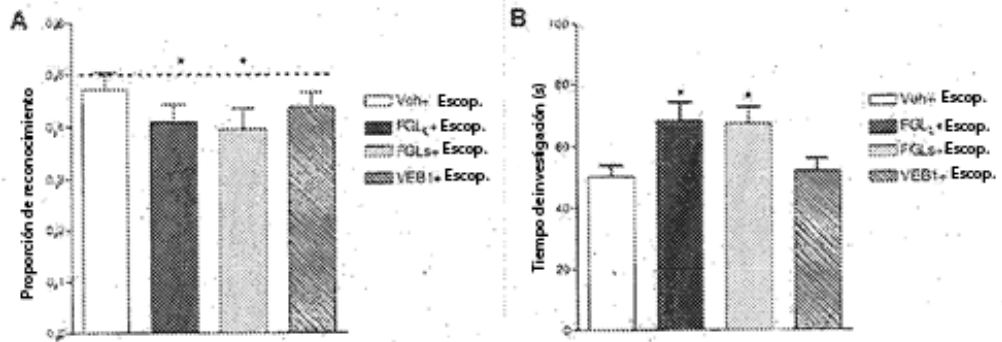


Figura 7

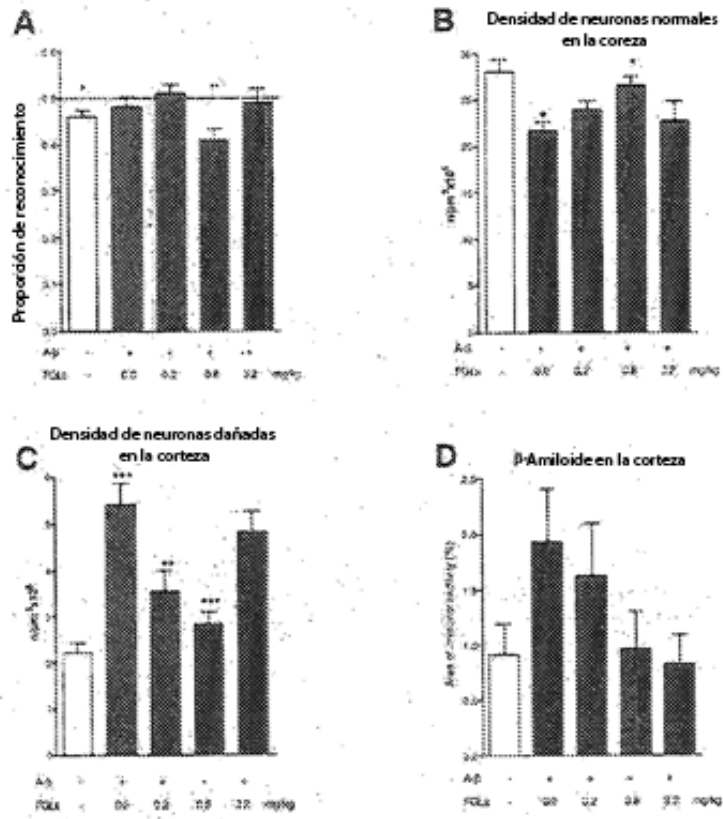


Figura 8

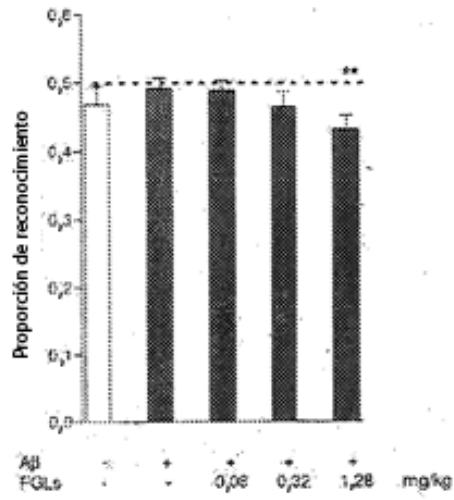


Figura 9

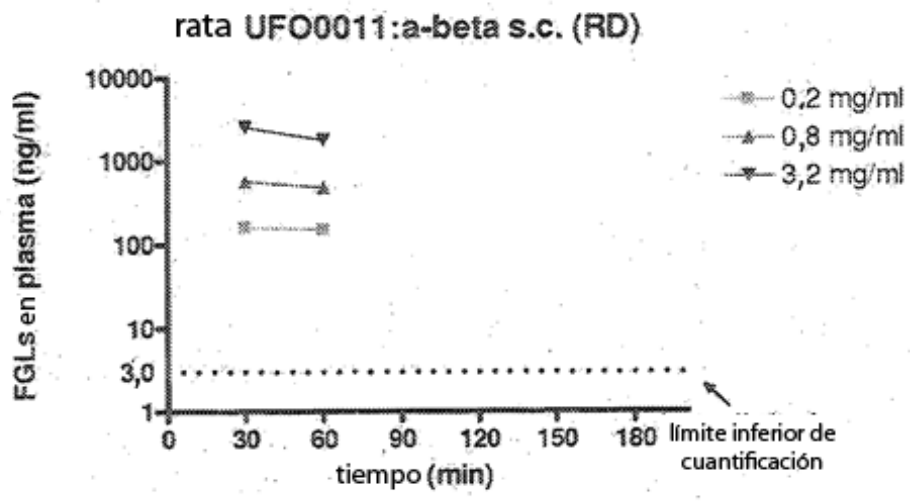


Figura10

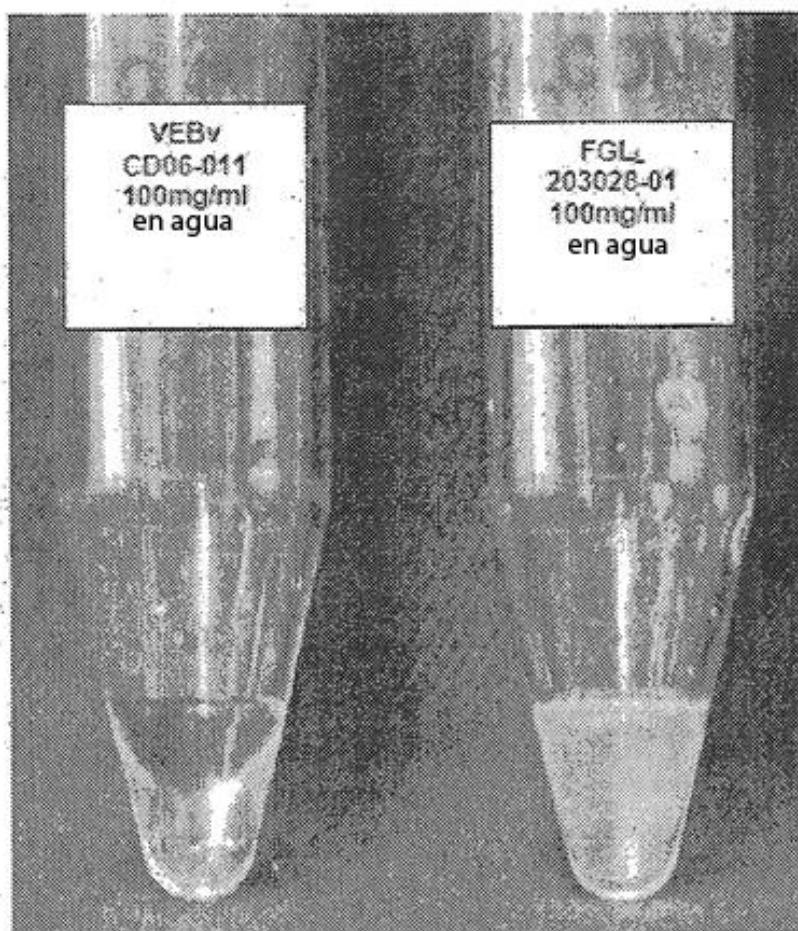


Figura 11

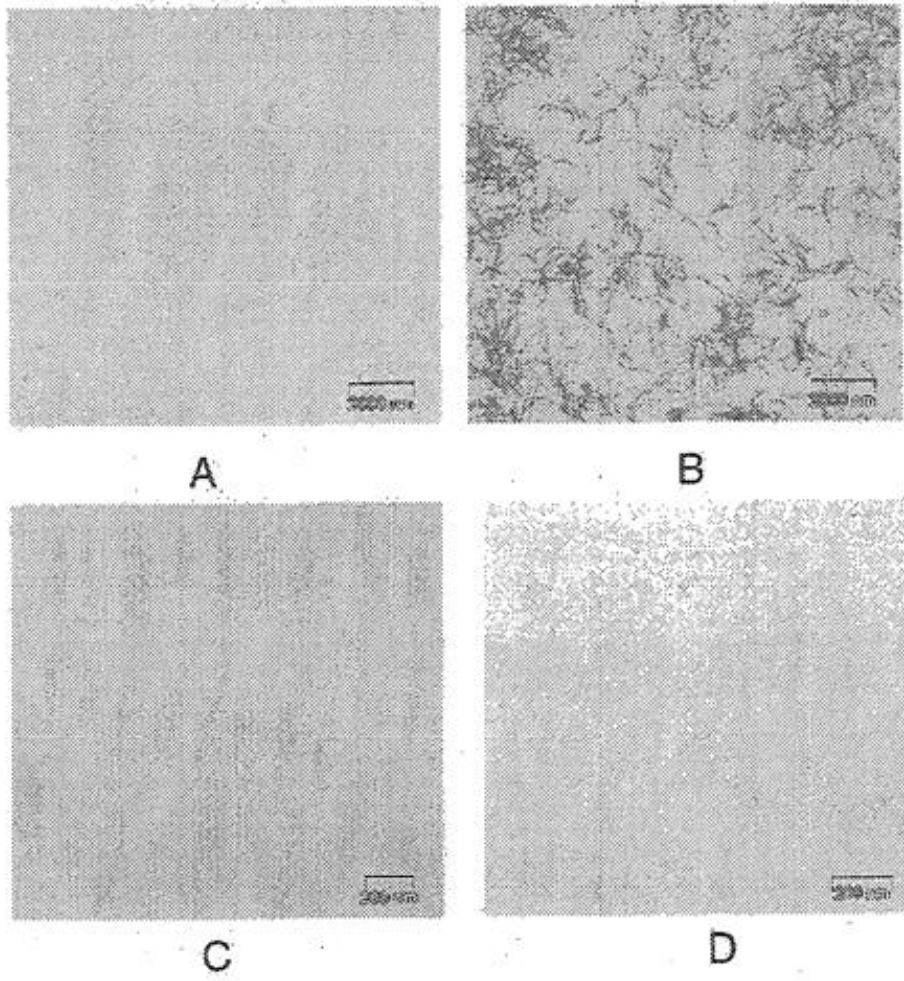


Figura 12

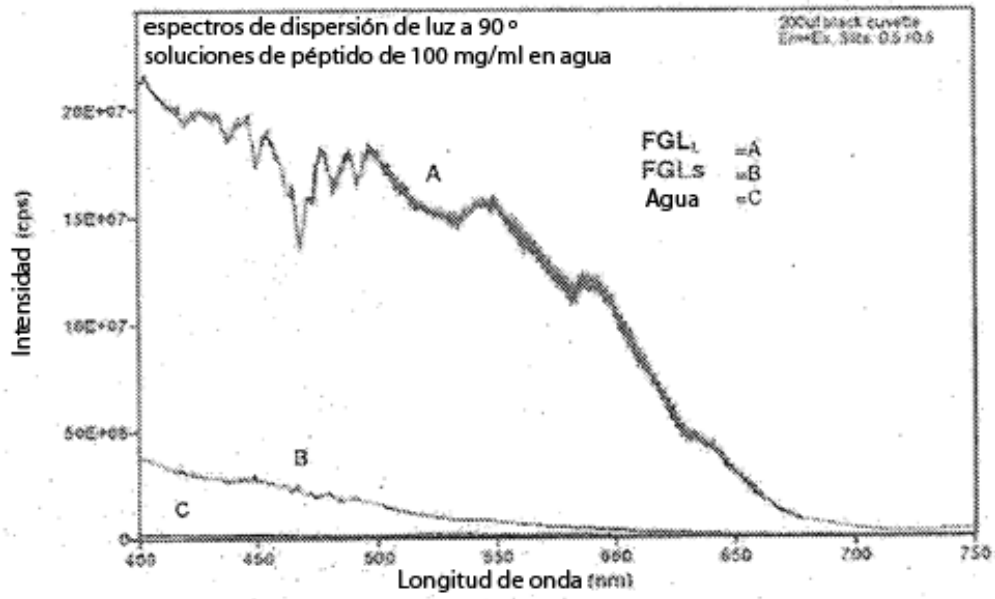


Figura 13

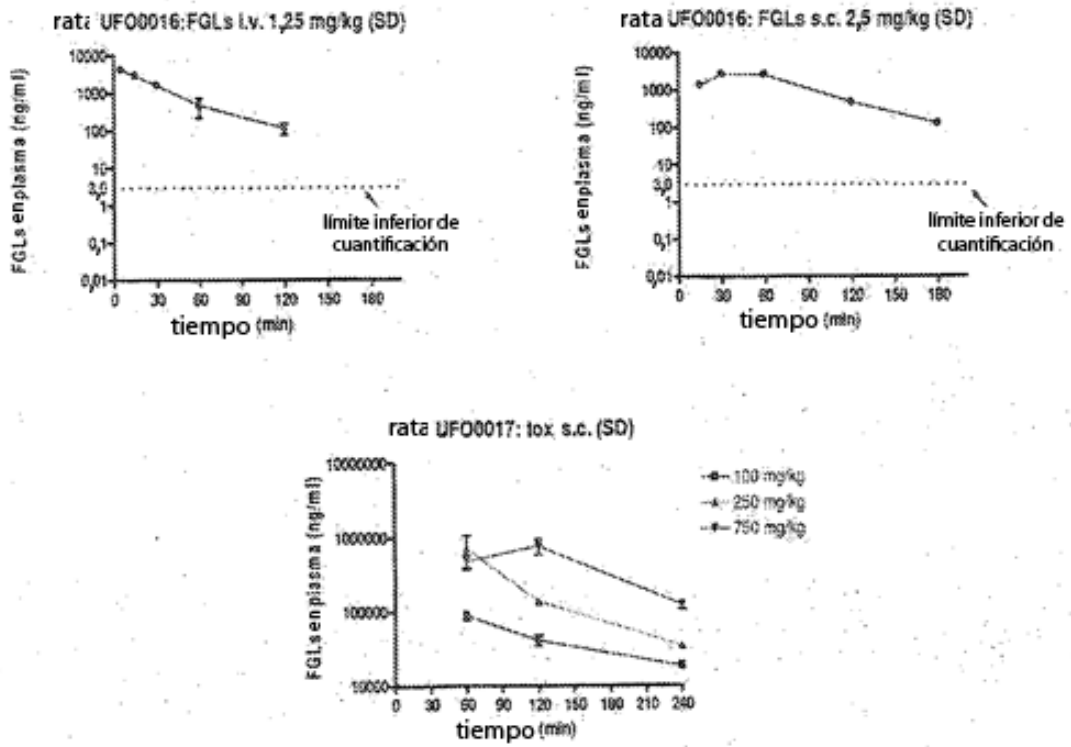


Figura 14