



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 708**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/22</b> (2006.01)	<b>C07K 14/575</b> (2006.01)
<b>G01N 33/50</b> (2006.01)	<b>A61P 29/00</b> (2006.01)
<b>A61P 1/12</b> (2006.01)	<b>A61P 9/12</b> (2006.01)
<b>A61P 9/10</b> (2006.01)	<b>A61P 35/00</b> (2006.01)
<b>A61P 31/00</b> (2006.01)	<b>A61P 37/00</b> (2006.01)
<b>A61P 25/30</b> (2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01985936 .2**

96 Fecha de presentación : **24.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1343520**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

54 Título: **Nuevos usos terapéuticos de péptidos SMR1.**

30 Prioridad: **22.12.2000 EP 00403670**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.08.2011**

73 Titular/es: **Institut Pasteur**  
**28, rue du Docteur Roux**  
**75724 Paris Cedex 15, FR**  
**Centre National de la Recherche Scientifique**

72 Inventor/es: **Rougeot, Catherine y**  
**Rougeon, François**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 708 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

Nuevos usos terapéuticos de péptidos SMR1

En un primer aspecto, la invención se refiere a nuevos usos terapéuticos de un péptido SMR1.

5 Los inventores han caracterizado previamente una nueva proteína glandular submandibular de la rata, llamada SMR1 (proteína 1 submandibular de la rata), que tiene la estructura de una prohormona y cuya síntesis se encuentra sometida a control por andrógenos ((Rosinsky-Chupin y col., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 85(22):8553-7) y solicitud de patente PCT N° WO 90/03981). El gen que codifica la SMR1 pertenece a una nueva familia de multigenes, la familia VCS, que se ha localizado en el cromosoma 14 de la rata, bandas p21-p22 ((Courty y col., (1996) Mol. Biol. Evol. 13(6):758-66; Rosinsky-Chupin y col., 1995) Mamm. Genome 6(2):153-4) y para la que se han caracterizado algunos miembros génicos humanos (Isemura y col., (1997), J Biochem 121:1025-1030; Isemura y col. (1994) J Biochem 115:1101-1106; Isemura y col. (1979) J Biochem 86:79-86; Dickinson y col. (1996) Curr Eye Res 15:377-386). El gen tiene una organización similar a varios genes precursores de hormonas (Rosinsky-Chupin y col., (1990) DNA Cell. Biol. 9(8):553-9)). El ARNm de la SMR1 se expresa de forma determinada según el tejido, edad y sexo específicos en las células acinares de la glándula submaxilar (GSM) y en la próstata de la rata macho (Rosinsky-Chupin y col., (1993) Histochem. Cytochem. 41(11):1645-9).

20 Se ha descrito que la SMR1, *in vivo*, se procesa selectivamente en zonas de pares de aminoácidos básicos de forma específica de tejidos y sexo para alcanzar la madurez de los productos peptídicos, de forma similar al camino de maduración de los precursores de los péptidos-hormona (Rougeot y col., (1994) Eur. J Biochem. 219(3):765-73). La estructura asociada de los péptidos generada a partir de la SMR1 por escisión de pares de residuos de arginina, por ejemplo el undecapéptido: VRGPRRQHNPR; el hexapéptido: RQHNPR; y el pentapéptido: QHNPR se maduran *in vivo* selectivamente a partir del precursor después de procesarse en pares de residuos de aminoácidos básicos por un par básico de aminoácido-enzima conversora, probablemente la furina convertasa (acumulada de forma diferente según las características del tejido, edad y sexo), liberada tanto local como sistemáticamente por medio del control neuroendocrino multifactorial (Rougeot y col., 1994).

25 En este contexto, el péptido maduro final generado a partir de la SMR1, llamado pentapéptido SMR1 (SMR1-QHNPR), también llamado sialorfina, se sintetiza predominantemente como respuesta a esteroides andrógenos, se libera de forma constitutiva en el flujo sanguíneo en condiciones elementales y se libera en mayores cantidades como respuesta a tensiones medioambientales, dependiendo del estado de activación de los adrenoreceptores que controlan la respuesta secretora de la GSM.

30 A su vez, el pentapéptido SMR1 que circula *in vivo* se ocupa rápida y selectivamente por parte de las dianas periféricas a través de centros de unión específicos, preferentemente en los tejidos renales, óseos y dentales.

35 El hecho de que las zonas diana del péptido se encuentren principalmente localizadas en los tejidos principales de transporte, regulación y captura de iones, es una evidencia de que el pentapéptido SMR1 puede tener un papel local y sistémico en el proceso, *in vivo*, de la modulación de la homeostasis de iones minerales. Además, asociado con el hecho de que el pentapéptido SMR1 regulado por andrógenos se secreta debido a las tensiones medioambientales, los inventores postulan que este péptido señal, específico de la GSM, puede participar en el reestablecimiento integrador de las respuestas de la homeostasis dinámica a situaciones de estrés dentro de las características del comportamiento específico de la rata macho, como puede ser la agresividad y/o los actos sexuales, y en relación con las características fisiológicas específicas de las hembras, como son los periodos de gestación y lactancia.

40 El documento WO 98/37100 revela que la maduración de los productos de la proteína SMR1, específicamente el péptido de fórmula estructural XQHNPR, reconoce zonas diana específicas en órganos que se encuentran muy involucrados en la concentración de iones minerales. Este descubrimiento ha llevado a los inventores a asignar al péptido SMR1, específicamente al pentapéptido, hexapéptido o undecapéptido SMR1, un papel activo en la regulación de las concentraciones de iones metálicos en los fluidos y los tejidos del cuerpo, y de esta forma asignar a estos péptidos un papel terapéutico en todos los desórdenes metabólicos relacionados con el desequilibrio de iones minerales.

45 Particularmente, los péptidos terapéuticos que se dan a conocer aquí son útiles para el tratamiento o la prevención de desórdenes de huesos, dientes, riñón, intestino, páncreas, estómago y glándula salivar causados por un desequilibrio de iones minerales en los fluidos del cuerpo o en los tejidos, principalmente debido a hiper o hipoparatiroidismo, osteoporosis, pancreatitis, litiasis de la glándula submandibular, nefrolitiasis o osteodistrofia.

Basándose en la hipótesis mencionada anteriormente se ha llevado a cabo un enfoque farmacológico conductual. El péptido SMR1, especialmente el pentapéptido SMR1, se ha descubierto que ocasiona mejoras en función de las dosis administradas en el comportamiento sexual de las ratas macho adultas, con una pérdida de los impulsos agresivos en su comportamiento como se puede ver en ratas control (solicitud de patente PCT WO 01/00 221).

55 Para elucidar los caminos que han tenido lugar en la acción del péptido SMR1, uno de los pasos esenciales a investigar son las características moleculares de las zonas péptido-receptoras. El aislamiento del centro de unión de la membrana accesible al pentapéptido SMR1, administrado internamente o radiomarcado, se ha logrado

principalmente en la médula externa renal. La identificación de su secuencia de aminoácidos ha revelado que la molécula en la superficie celular que enlaza el péptido *in vivo*, es una metalopeptidasa de membrana y más específicamente es una endopeptidasa que contiene cinc de la membrana integral del tipo II de los mamíferos, es decir, la endopeptidasa neutra 24-11 o EPN, también llamada encefalinasa, que pertenece a la subfamilia de la neprilisina, la cual realiza un papel crítico en la potencia funcional de varias señales peptidérgicas. Además, la interacción *in vivo* de la EPN de riñón de rata y el pentapéptido SMR1 se confirmó *in vitro* usando EPN purificada de riñón de conejo.

Además, a nivel de todo el cuerpo de la rata (topológico y cinético), se ha encontrado que *in vivo* existe una buena correspondencia (topológica y cinética) entre la distribución de los órganos diana accesibles al pentapéptido SMR1 radiomarcado circulante y el inhibidor sintético de la EPN (3HHACBO-Gly) (Sales y col, (1991) *Regulatory Peptides* 33, 209-22). Por otra parte, varias observaciones argumentan como hipótesis que el péptido SMR1 es un modulador natural derivado de la GSM de la actividad de la EPN, especialmente un inhibidor:

- 1- la captación tisular de pentapéptido SMR1 se encontró que era estable *in vivo* farmacocinéticamente y bioquímicamente.
- 2- el péptido SMR1 no comparte los residuos requeridos para ser un sustrato de EPN, observando que la EPN rompe preferencialmente los péptidos entre el enlace X-Phe, y
- 3- el pentapéptido SMR1 tiene un fuerte grupo quelante de cinc que ha sido diseñado para los inhibidores de la EPN sintéticos potentes.

Teniendo en cuenta los numerosos sustratos de la EPN (particularmente las hormonas peptídicas: encefalinas, sustancia P, bradiquinina, angiotensina II y el péptido natriurético atrial), existen consecuencias fisiológicas de la interacción EPN/péptido SMR1 que se espera que tengan una influencia sobre el control de la percepción del dolor central y periférico, fenómenos inflamatorios y/o tono arterial.

La endopeptidasa neutra, EPN 24-11, se distribuye en los tejidos nerviosos y periféricos de los mamíferos, siendo especialmente abundante en los tejidos periféricos del riñón y la placenta. En estos tejidos, la metalopeptidasa EPN de superficie celular participa en el proceso de postsecreción y en el metabolismo de los neuropéptidos, péptidos del sistema inmunorregulador y hormonas peptídicas. Controlando los niveles de actividad de los péptidos reguladores en circulación o secretados, la EPN modula su actividad fisiológica mediada por receptor. Por lo tanto, la EPN anclada a la membrana se involucra en la regulación de la actividad de: los péptidos vasoactivos potentes como la sustancia P, bradiquinina (BK), el péptido natriurético atrial (PNA) y la angiotensina II (AII); péptidos inflamatorios/inmunoreguladores potentes como la sustancia P y la BK y la fMet-Leu-Phe (fMLP); neuropéptidos opiáceos potentes como las encefalinas (Enk) de Met y Leu y cambiadores minerales potentes y péptidos reguladores de la homeostasis de fluidos como el PNA, el péptido natriurético del tipo C (PNC) y el péptido natriurético del tipo B (PNB). Sin embargo, los niveles de estos péptidos cambian a través de la formación/degradación de la inducción de la EPN sólo en las regiones donde se liberan tónicamente o donde se provoca su liberación por un estímulo.

Desde un punto de vista integrador, la actividad biológica de la EPN es controlar los niveles activos de señales peptídicas involucradas en la regulación de la tensión arterial, en fenómenos inflamatorios y en la homeostasis del agua mineral, así como en el control del proceso del dolor. Desde un punto de vista clínico, esto evidencia el hecho de que la EPN es una diana importante de los medicamentos en varias enfermedades. Por ejemplo, inhibiendo la EPN, y por lo tanto incrementando los niveles y la duración de la acción de los opiáceos endógenos centrales o periféricos, se puede obtener un analgésico o agente antidiarreico, o inhibiendo la formación de AII endógena y la inactivación de sustancia P, BK y PNA, se pueden obtener agentes antihipertensivos, natriuréticos y diuréticos. La ventaja principal de modificar las concentraciones de péptidos endógenos mediante el uso de los inhibidores de la EPN es que los efectos farmacológicos se inducen sólo al receptor, estimulado por los efectores naturales, y son críticamente dependientes de la liberación tónica o promovida por estímulos de los efectores naturales que ocurren bajo situaciones estresantes del entorno, del comportamiento y psicopatológicas (Roques y col, (1993) *Pharmacological Reviews* 45, 87-146). Es importante resaltar que, en este contexto estresante, el potencial natural del emulador de la EPN y del péptido SMR1, se liberarán también bruscamente y tónicamente, se distribuirán y recogerán por medio de sus tejidos diana sistémicos, especialmente por las zonas de la EPN renal (Rougeot y col, 1997). Por esta razón, el péptido SMR1 estará biodisponible cinéticamente *in vivo* para modular la actividad de la EPN y, de esta forma, optimizar las respuestas al estrés mediante inflamaciones locales e internas, aumento de la tensión sanguínea y/o homeostasis de iones. El punto de vista de integración se encuentra en concordancia con la asunción de que la circulación de los factores derivados de la glándula submaxilar (GSM) podrían participar en el reestablecimiento integrador de las respuestas homeostáticas a "estados de estrés" psicológicos o patológicos (herida, traumatismo o infección), en vez de contribuir al estado estable homeostático de descanso (Rougeot y col, (2000) *Peptides* 21, 443-55).

Desde un punto de vista general, la evidencia de un significado fisiológico demuestra la existencia de un tronco simpático cervical (TSC)-GSM eje neuroendocrino que tiene un papel integral en las adaptaciones fisiológicas y contribuye al mantenimiento de la homeostasis en los mamíferos, especialmente en las "condiciones de estrés" vistas en

- los roedores con daños en los tejidos, inflamación o comportamiento agresivo. Los datos obtenidos en el laboratorio proporcionan una clara evidencia de que el péptido SMR1 es un nuevo mediador de señales, adaptado al sexo, al entorno específico de las especies, características psicológicas y de comportamiento, que se movilizan tónica y dinámicamente en situaciones urgentes, de forma que se optimicen las respuestas nociceptivas locales y sistémicas, inflamatorias, de aumento de la tensión sanguínea y/o homeostáticas de iones, a través de la regulación de la actividad de la EPN enlazada a la membrana. Por otra parte, el péptido SMR1, que es hasta la fecha el primer regulador natural de la actividad periférica identificada de la EPN, parece estar diseñado como una nueva clase de moléculas terapéuticas, ya que esta metalopeptidasa se encuentra bien conservada, especialmente entre las ratas, conejos y la especie humana con una secuencia similar mayor o igual al 90 %.
- Las pruebas proporcionadas por los inventores junto con la sorprendente similitud con la secuencia de la EPN sugieren además que el péptido SMR1 puede actuar como un modulador/inhibidor natural de las metalopeptidasas de membrana, principalmente las metalopeptidasas de cinc. (Nº de acceso de GenBank: P 08473, Malfroy y col., (1998) FEBS Lett. 229(1), 206-210; NP 258428, Bonvouloir y col., (2001) DNA Cell Biol. 20(8), 493-498; NP 036740, Malfroy y col. (1987) Biochem Biophys Res Commun 144, 59-66).
- Ejemplos de metalopeptidasas de membrana de los mamíferos, además de la EPN, son las ECE (enzimas convertidoras de la endotelina), especialmente ECE1 y ECE2, el antígeno de superficie celular de eritrocita KELL y el producto del gen PEX asociado con el raquitismo hipofosfatémico X enlazado, así como la ECA (enzima convertidora de al angiotensina) y APN (aminopeptidasa N).
- La inhibición de ECA y/o ECE tiene una aplicación importante en el tratamiento de la hipertensión y en la prevención y el tratamiento de la arteroesclerosis.
- La inhibición de APN junto con NEP tiene una aplicación importante en el tratamiento del dolor.
- La inhibición de las metalopeptidasas de membrana tiene efectos terapéuticos en el tratamiento de tumores, principalmente en los cánceres de ovarios, colon y recto, cerebro, pulmón, páncreas, gástricos y melanomas, y reduce la incidencia de la metástasis, arteriosclerosis y/o hipertensión. La inhibición de las metalopeptidasas de membrana relacionadas también tiene un efecto terapéutico en el control del dolor. Dichos efectos antinociceptivos sobre el dolor agudo son efectos analgésicos, pero también efectos sobre el dolor inflamatorio crónico tal como artritis o enfermedad inflamatoria del intestino.
- Además, la inhibición de la metalopeptidasa bacteriana o viral se espera que tenga efectos antiinfecciosos.
- Las metalopeptidasas, que tienen un importante papel en la invasión patógena de tejido huésped y procesos inmunológicos e inflamatorios son, por ejemplo, las de *Streptococcus parasanguis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Legionella pneumophila*.
- Además, las metalopeptidasas bacterianas, especialmente las metalopeptidasas de cinc, tienen un papel importante en las enfermedades causadas por toxinas proteolíticas, tales como las toxinas del *B. anthracis* (factor letal del camburco) y las neurotoxinas de *C. tetanum* y *botulinum*.
- Otras metalopeptidasas tienen un papel importante en varias infecciones, tales como infecciones provocadas por el VIH (FR 2 707 169)
- La importancia de los inhibidores de la proteinasa para el tratamiento de enfermedades virales o bacterianas se puede encontrar en J. Potempa, J. Travis, (Proteinases as virulence factors in bacterial diseases and as potential targets for therapeutic interaction with proteinase inhibitors. In proteases as targets for therapy. 99, 159-188 -Ed K. Helm, B. D. Korant and J. C. Cheronis- Springer Handbook Exp. Pharm. 140).
- Los distintos papeles de las metalopeptidasas se describen en Turner y col, (2001) Bioessays, 23, 261-9 Kenny y col, (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues); Kenny y col, (1987) Mammalian ectoenzymes; Beaumont y col, (1996) zinc metallopeptidasas in health and disease, 105-129).
- Un primer objeto de la invención es, por lo tanto, el uso terapéutico de un péptido SMR1 o una cantidad farmacéuticamente activa de dicho péptido SAR1, para la preparación de una composición terapéutica para prevenir o tratar enfermedades en el que se pretende una modulación de la actividad de una metalopeptidasa de membrana, en particular una metalopeptidasa de cinc de membrana, en un mamífero, específicamente en un ser humano, seleccionándose dicha enfermedad o trastorno del grupo constituido por dolor, diarrea, hipertensión, arteroesclerosis, proliferación y/o diseminación tumoral, infecciones, respuestas inmunoinflamatorias y drogadicción.
- En el presente documento se divulga el uso terapéutico de un agente tal como un derivado biológicamente activo del péptido SMR1 para modular la interacción entre el péptido SMR1 endógeno y dicha metalopeptidasa de membrana. Dicha modulación es una modulación cinética o molecular.
- “Endógeno” se refiere a una molécula (en el presente documento el péptido SMR1) que se expresa o madura de forma natural en tejidos del paciente al que se va a tratar.

En el presente documento se divulga además el uso de una agente que modula la interacción entre la proteína o el péptido SMR1 endógeno y una metalopeptidasa de membrana para la preparación de una composición terapéutica para prevenir o tratar enfermedades en las que se pretende una modulación de la actividad de dicha metalopeptidasa de membrana.

5 La presente invención se refiere más específicamente al uso terapéutico del péptido SMR1 o una cantidad farmacéuticamente activa de un péptido SMR1 para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar enfermedades en las que se pretende la modulación de la degradación inducida por NEP de péptidos sensibles a NEP en un mamífero, específicamente en un ser humano.

10 Tal como se usa en la presente especificación, péptido SMR1 significa proteína SMR1, un péptido generado a partir de la SMR1, también llamado un producto de maduración de la proteína SMR1, o uno de los derivados biológicamente activos de la mencionada proteína o del mencionado producto de maduración.

En una forma de realización preferencial, el péptido SMR1 es un compuesto de fórmula estructural (1):



15 donde  $X_1$  indica un átomo de hidrógeno o  $X_1$  representa una cadena de aminoácido seleccionada de lo siguiente:  $X_1 = R$  o  $G$ ,  $X_1 = RR$ , o  $X_1 = PRR$ , o  $X_1 = GPRR$ , o  $X_1 = RGPRR$ , o  $X_1 = VRGPRR$ ,  $X_2$  indica N, G o D,  $X_3$  indica P o L y  $X_4$  indica R o T.

Los péptidos preferentes comprenden péptidos de secuencia:

QHNPR, RQHNPR y VRGPRRQHNPR de *Ratus norvegicus*,

QHRLR y RQHNLRL de *Ratus rattus*,

20 GQHGPR y GQHDPT de ratón.

En las anteriores secuencias de aminoácidos:

Q representa glutamina,

H representa histidina,

N representa aspargina,

25 G representa glicina,

P representa prolina,

R representa arginina,

L representa leucina

T representa treonina

30 D representa ácido aspártico y

V representa valina.

35 "*Derivados biológicamente activos*" del péptido SMR1 se refiere a variantes que conservan la función, proteínas homólogas y peptidomiméticos, así como a hormonas, un anticuerpo o un compuesto sintético (es decir, bien una molécula peptídica o no peptídica) que, preferentemente, retiene la especificidad de unión y/o la actividad fisiológica del péptido madre, tal como se defina más adelante. Muestran preferentemente una capacidad de unión a metalopeptidasa de membrana, más particularmente a NEP. Dicha actividad de unión puede determinarse fácilmente mediante ensayos de unión, por ejemplo, etiquetando el derivado de SMR1 o mediante ensayos de competición con un sustrato de NEP convencional, opcionalmente etiquetado.

40 "*Variantes que conservan la función*" son aquellas en las que un residuo de aminoácido dado en una proteína se ha modificado sin alterar la conformación total y la función del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, reemplazo de un aminoácido por uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de unión a hidrógeno, propiedades ácidas, básicas, hidrófobas, aromáticas y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la arginina y la lisina son aminoácidos hidrófilos básicos y pueden intercambiarse. De modo similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede reemplazarse por leucina o valina. Se espera que dichos cambios tengan poco o ningún efecto sobre el peso molecular aparente o el punto isoeléctrico de la proteína o polipéptido. Otros aminoácidos diferentes a los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima, de tal modo que el porcentaje de similitud de la secuencia proteica o de aminoácidos entre dos proteínas cualquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de desde el 70

- 5 % al 99 %, tal como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento tal como por el procedimiento de Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. "Una variante que conserva la función" también incluye un polipéptido o enzima que tiene al menos una identidad de aminoácidos del 60 % según se determina por algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente de al menos el 75 %, del modo más preferente del 85 %, e incluso más preferentemente del 90 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones que, o sustancialmente similares a, la proteína madre nativa o enzima con la que se compara.
- "Las variantes alélicas" están abarcadas de modo más particular, tal como se describe con más detalle más adelante.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término "homólogo", en todas sus formas gramaticales se refiere a la relación entre proteínas que poseen un origen evolutivo común, incluidas proteínas de superfamilias (por ejemplo, la superfamilia de las inmunoglobulinas) y proteínas homólogas de diferentes especies (por ejemplo, cadena ligera de miosina, etc.) (Reeck y col., Cell 50:667, 1987). Dichas proteínas tienen homología secuencial, tal como se refleja de su similitud secuencial, bien en términos de porcentaje de similitud o bien la presencia de residuos específicos o patrones en posiciones conservadas.
- 15 En consecuencia, el término "similitud de secuencia", en todas sus formas gramaticales, se refiere al agrado de identidad o correspondencia entre secuencias de aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen evolutivo común (véase Reeck y col., anteriormente). No obstante, en el uso común y en la presente solicitud, el término "homólogo", cuando se modifica con un adverbio tal como "muy", puede referirse a la similitud de secuencia y puede o no estar relacionado con un origen evolutivo común.
- 20 En una realización particular, dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente homólogos o sustancialmente similares si más del 80 % de los aminoácidos son idénticos o más de aproximadamente el 90 % son similares y funcionalmente idénticos. Preferentemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineamiento, usando, por ejemplo, el programa PILEUP GCG (Genetics Computer Group, manual de programación para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) o uno de los programas descritos anteriormente (BLAST, FASTA, etc.).
- 25 Los sustratos de la EPN son principalmente las hormonas peptídicas: encefalinas, sustancia P, bradiquinina, angiotensina II y el péptido natriurético atrial, que tienen un papel clave en la percepción del dolor central y periférico, fenómenos inflamatorios, intercambio de minerales y/o tono arterial.
- 30 Más particularmente, un objeto de la presente invención es el uso de los péptidos terapéuticos descritos anteriormente como agentes analgésicos en la inhibición de NEP en niveles periféricos, espinales y/o supraespinales, aumentando, por lo tanto, los niveles y la duración de la acción de opioides endógenos centrales o periféricos, incluidas las encefalinas.
- Otro objeto es el uso de los péptidos descritos anteriormente como agentes antidiarreicos.
- 35 Otro objeto es el uso de los péptidos descritos anteriormente como agentes antihipertensivos, natriuréticos y diuréticos en la inhibición de la formación de AII endógena y de la inactivación de sustancia P, BK y ANP.
- Otro objeto es el uso de los péptidos descritos anteriormente como agentes para prevenir o tratar aterosclerosis.
- Otro objeto es el uso de los péptidos descritos anteriormente como agentes para el tratamiento del dolor, incluido el dolor inflamatorio crónico, tal como artritis o enfermedad inflamatoria del intestino.
- 40 Otro objeto es el uso de los péptidos descritos anteriormente como agentes para controlar respuestas inmunoinflamatorias.
- Otro objeto es el uso de los péptidos descritos anteriormente como agentes para prevenir o tratar los procesos de proliferación o diseminación celular malignas.
- Otro objeto de la presente invención es el uso de los péptidos descritos anteriormente como sustitutos en el tratamiento de la drogadicción, en particular de la drogadicción por morfina.
- 45 Efectivamente, varios estudios han sugerido que la vulnerabilidad a la drogadicción y el desarrollo de recompensa y dependencia a la droga es al menos en parte el resultado de modificaciones preexistentes o inducidas y/o un defecto del sistema opioide endógeno. A este respecto, el uso del péptido SMR1 para potenciar los efectos de encefalinas endógenas reducirá los distintos efectos secundarios (signos somáticos de abstinencia) producidos por la interrupción de la administración crónica de morfina o heroína.
- 50 Otro objeto más de la invención es el uso de los péptidos descritos anteriormente para tratar infecciones tales como enfermedades bacterianas o víricas.
- Para los fines de la presente invención, el término mamífero se usa en su sentido taxonómico e incluye, específicamente, a seres humanos.

5 Para los propósitos de la invención, un "péptido" es una molécula compuesta por una serie lineal de restos de aminoácidos conectados entre sí en una serie lineal por enlaces peptídicos. Esta serie lineal puede ser opcionalmente cíclica, es decir, las terminaciones del péptido lineal o las cadenas laterales de los aminoácidos a lo largo del péptido se pueden enlazar, por ejemplo, por un enlace químico. Estos péptidos, según la invención pueden incluir desde aproximadamente tres hasta aproximadamente 500 aminoácidos y además pueden incluir estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias, así como asociaciones intermoleculares con otros péptidos u otras moléculas que no son péptidos. Estas asociaciones intermoleculares pueden ser (sin suponer limitación) por medio de enlaces covalentes (por ejemplo, enlaces bisulfuro), o a través de quelación, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones ión-dipolo, interacciones dipolo-dipolo o cualquier combinación de estas interacciones.

10 Los péptidos preferentes según la invención comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por:

Glp-His-Asn-Pro-Arg	[SEQ.ID.Nº 1]
Gln-His-Asn-Pro-Arg	[SEQ.ID.Nº 2]
Arg-Gln-His-Asn-Pro-Arg	[SEQ.ID.Nº 3]
Val-Arg-Gly-Pro-Arg-Arg-Gln-His-Asn-Pro-Arg	[SEQ.ID.Nº 4]
Gln-His-Asn-Leu-Arg	[SEQ.ID.Nº 5]
Arg-Gln-His-Asn-Leu-Arg	[SEQ.ID.Nº 6]
Gly-Gln-His-Gly-Pro-Arg	[SEQ.ID.Nº 7]
Gly-Gln-His-Asp-Pro-Thr	[SEQ.ID.Nº 8]

15 en los que las secuencias aparecen en configuración N a C y en las que Glp es piroglutamato, Gln es glutamina, His es histidina, Asn es asparagina, Pro es prolina, Arg es arginina, Gly es glicina, Val es valina, Leu es leucina y Thr es treonina.

En estos péptidos, debido a la ciclización/desciclización del N-terminal, Glp y Gln se interconvierten.

20 Además, ciertos péptidos preferenciales según la invención comprenden, consisten esencialmente de, o consisten en una variante alélica de un péptido que aparece en cualquiera de las SEQ.ID.Nº 1-8. Tal como se usa en el presente documento, una "variante alélica" es un péptido que tiene uno o dos aminoácidos sustituidos de un péptido madre, pero conserva la especificidad de unión y/o la actividad fisiológica del péptido madre. Tal como se usa en el presente documento, "retener la especificidad enlazante del péptido madre" significa ser capaz de enlazarse a un anticuerpo monoclonal o policlonal que se enlaza a uno de los péptidos que aparecen con SEQ.ID.Nº 1-8 con una afinidad que es al menos una décima parte, preferiblemente al menos la mitad, y más preferentemente al menos tan grande como la de los péptidos que aparecen con los SEQ.ID.Nº 1-8. La determinación de esta afinidad se lleva a cabo, preferentemente, en condiciones estándar de inmunoensayos de competitividad enlazante (Rougeot y col., (E. J. B. 219(3) 765-773). "Retener la actividad fisiológica del péptido madre" significa retener la capacidad de cualquiera de los péptidos que aparecen en los SEQ.ID.Nº 1-8 para enlazar y modular la actividad de la EPN y para optimizar, de este modo, las respuestas homeostáticas al estrés locales e internas, nociceptivas, inflamatorias, por aumento de la tensión sanguínea y/o iónicas. La determinación de si esta actividad está modulada se describe con más detalle más adelante en la presente memoria descriptiva. Se pretende específicamente que el término "variantes alélicas" incluya cualquier homólogo funcional humano de los péptidos indicados en los SEQ.ID.Nº 1-8 que no tengan la secuencia de aminoácidos similar a los mismos.

Los péptidos según la invención se pueden sintetizar convenientemente usando técnicas conocidas (véase por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154).

35 También son parte de la invención peptidomiméticos preferentes que mantienen, como se ha descrito anteriormente, la especificidad enlazante y/o actividad del péptido madre. Tal como se usa en el presente documento, un "peptidomimético" es una molécula orgánica que imita algunas propiedades de los péptidos, preferentemente su especificidad enlazante y su actividad fisiológica. Los peptidomiméticos preferentes se obtienen por modificación estructural de los péptidos según la invención, preferentemente usando aminoácidos no naturales, aminoácidos D en vez de aminoácidos L, restricciones conformacionales, sustitución isostérica, ciclización u otras modificaciones. Otras modificaciones preferenciales incluyen, sin ninguna limitación, aquellas en las que uno o más enlaces amida se sustituyen por un enlace que no es de amida, y/o uno o más aminoácidos de cadena lateral se sustituyen por un resto químicamente diferente, o uno o más de los extremos N-terminales, de los C-terminales o una o más de las cadenas laterales se protegen con un grupo protector, y/o se introducen en la cadena de aminoácidos enlaces dobles y/o ciclización y/o la estereoespecificidad para incrementar la rigidez y/o afinidad enlazante.

Otras modificaciones preferenciales incluyen aquellas que intentan potenciar la resistencia a la degradación enzimática, mejorar la biodisponibilidad, en particular en tejidos nerviosos, del intestino, de la placenta y de las gónadas y, más generalmente, las propiedades farmacocinéticas y, especialmente, comprenden:

- 5 - la protección de los grupos hidrófilos  $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$  por la esterificación ( $\text{COOH}$ ) con alcoholes lipofílicos o por amidación ( $\text{COOH}$ ) y/o acetilación ( $\text{NH}_2$ ) o por adición de cadenas hidrófobas aromáticas o carboxialquilos en el extremo  $\text{NH}_2$  terminal;
- retroinversión o reducción de isómeros de los enlaces amida  $\text{CO-NH}$  o metilación (o cetometileno, metilenoxi, hidroxi-metileno) de las funciones amida;
- sustitución de aminoácidos L por aminoácidos D;
- 10 - dimerización de cadenas peptídicas de aminoácidos.

Todas estas variaciones son muy bien conocidas en la técnica. De esta forma, a partir de las secuencias de péptidos descritas aquí, los expertos en la materia serán capaces de diseñar y producir peptidomiméticos con características enlazantes similares o superiores a tales péptidos (véase por ejemplo, Horwell y col., *Bioorg. Med. Chem.* **4**: 1573 (1996); Liskamp y col., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1**: 113 (1994); Gante y col., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**: 1699 (1994); Seebach y col., *Helv. Chim. Acta* **79**:913 (1996)).

Los péptidos que se usan según la presente invención se pueden preparar de forma convencional por síntesis de péptidos en fase líquida o sólida por medio de acoplamiento sucesivos de los diferentes residuos de aminoácidos que se van a incorporar (desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal en fase líquida, o desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal en fase sólida) en la que se termina en el N-terminal y en la que las cadenas laterales reactivas se bloquean previamente por medio de grupos convencionales.

Para la síntesis en fase sólida se puede usar preferentemente la técnica descrita por Merrifield. Alternativamente, se puede usar también la técnica descrita por Houbenweyl en 1974.

Para más detalles se puede consultar el documento WO 98/37100.

25 Los péptidos usados en los procedimientos terapéuticos según la presente invención se pueden obtener usando procedimientos de ingeniería genética. La secuencia de ácidos nucleicos del ADNc que codifica la proteína SMR1 de 146 aminoácidos se ha descrito en la solicitud de patente PCT número WO 90/03891 (Rougeon y col.). Para los péptidos biológicamente activos derivados del péptido SMR1, por ejemplo un derivado de  $\text{X}_1\text{QH}\text{X}_2\text{X}_3\text{X}_4$ , los expertos en la materia se referirán a la bibliografía general para determinar qué codones apropiados pueden usarse para sintetizar el péptido deseado.

30 Más adelante se describen los procedimientos que permiten a los expertos en la materia seleccionar y purificar los derivados biológicamente activos que se enlazan a las mismas dianas y que tienen alguna actividad biológica agonista o antagonista similar al péptido SMR1 de la invención.

35 El derivado activo biológicamente del péptido SMR1 puede ser una proteína, un péptido, una hormona, un anticuerpo o un compuesto sintético, que bien es una molécula peptídica o no peptídica, tal como cualquier compuesto que se pueda sintetizar por procedimientos convencionales de química orgánica.

40 La selección de los derivados biológicamente activos del péptido SMR1 de la invención se lleva a cabo evaluando el enlace de una molécula ligando candidata al centro de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR, y determinando los cambios metabólicos introducidos por la molécula candidata en su diana, como es la síntesis y/o liberación de los metabolitos mensajeros primarios y secundarios como consecuencia de la señal de transducción a través de las proteínas quinasas o ciclasa adenilata y de la activación de una proteína de la familia G, o la variación de la actividad enzimática de la EPN, específicamente en el metabolismo de los sustratos de la EPN natural.

Los ensayos de unión de las moléculas candidatas se llevan a cabo generalmente a de 4 °C a 25 °C ó 37 °C. Con objeto de facilitar la lectura del protocolo descrito más adelante, el pentapéptido QHNPR se usa en lugar de o en competencia con un derivado activo biológicamente de la molécula candidata.

45 Según esto, un objeto de la presente invención es un procedimiento para seleccionar moléculas ligando que se enlazan específicamente al centro de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR y que comprende los siguientes pasos:

- 50 a) preparación de un cultivo celular o preparación de un espécimen de órgano o una muestra de tejido (criosecciones o secciones o preparaciones de membrana u homogenatos en bruto) que contienen centros de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR;
- b) adición de la molécula candidata para analizarla compitiendo con concentraciones medio saturadas del pentapéptido marcado;

- c) incubación del cultivo de células, muestra de órgano o muestra de tejido del paso a) en presencia de la molécula candidata durante un tiempo suficiente y en unas condiciones en las que tiene lugar el enlace específico;
- d) cuantificación de la etiqueta unida específicamente al cultivo de células, muestra de órgano o muestra de tejido en presencia de varias concentraciones de la molécula candidata (de  $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M).

En el proceso anteriormente mencionado, una concentración medio saturada es la concentración del pentapéptido QHNPR marcado que se enlaza al 50 % de los centros de unión de la EPN.

Este procedimiento también permite definir la afinidad relativa de la molécula candidata comparada con la afinidad del QHNPR.

La presente memoria descriptiva también divulga un procedimiento para determinar la afinidad relativa de las moléculas ligando, que se enlazan específicamente a los centros de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR que comprende los pasos a), b), c) y d) del procedimiento anterior para cada molécula candidata y además comprende el paso e) que compara la afinidad de cada molécula candidata cuantificada en el paso d) con la de las otras moléculas candidatas.

La presente memoria descriptiva también divulga un procedimiento para determinar la afinidad de las moléculas ligando, que se enlazan específicamente al centro de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR que comprende los siguientes pasos:

- a) preparación de un cultivo celular o preparación de un espécimen de órgano o una muestra de tejido (criosecciones o secciones o preparaciones de membrana u homogenatos en bruto) que contienen centros de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR;
- b) adición de la molécula candidata, que previamente se ha marcado con una etiqueta radiactiva o no radiactiva;
- c) incubación del cultivo de células, espécimen de órgano o muestra de tejido del paso a) en presencia de la molécula candidata marcada durante un tiempo suficiente y en unas condiciones en las que se lleva a cabo el enlace específico; y
- d) cuantificación de la etiqueta unida específicamente al cultivo de células, espécimen de órgano o muestra de tejido diana en presencia de varias concentraciones de la molécula candidata marcada (de  $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M).

La molécula ligando candidata se puede marcar radiactivamente ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ , etc.) o no radiactivamente (biotina, dioxigenina, fluoresceína, etc.).

De esta forma, la presente memoria descriptiva también divulga un procedimiento para seleccionar moléculas ligando, que poseen actividad biológica agonista en el centro de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR, que comprende los siguientes pasos:

- a) preparación de un cultivo celular o preparación de un espécimen de órgano o una muestra de tejido (criosecciones o secciones o preparaciones de membrana u homogenatos en bruto) que contiene centros de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR;
- b) incubación del cultivo de células, espécimen de órgano o muestra de tejido del paso a) en concentraciones que permitan la medida de la actividad enzimática de la EPN en condiciones de velocidad iniciales tal como se definen en el procedimiento del Ejemplo 1 (material y procedimientos) en presencia de la molécula candidata (de  $10^{-10}$  a  $10^{-5}$  M), una concentración medio saturada de QHNPR y un sustrato de EPN durante un tiempo suficiente para la hidrólisis del sustrato de EPN, que tiene lugar en las condiciones de velocidad iniciales;
- c) cuantificación de la actividad de la EPN presente en el material del paso a) midiendo los niveles de la hidrólisis del sustrato de EPN, respectivamente en presencia o ausencia de la molécula ligando candidata y en presencia o ausencia de QHNPR.

En el proceso mencionado anteriormente, una concentración medio saturada es la concentración del pentapéptido QHNPR que reduce a la mitad la degradación del sustrato de la EPN.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para seleccionar las moléculas ligando que poseen una actividad biológica antagonista en el centro de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR, que comprende los pasos siguientes:

- a) preparación de un cultivo celular o preparación de un espécimen de órgano o una muestra de tejido (criosecciones o secciones o preparaciones de membrana u homogenatos en bruto) que contiene centros de unión de la EPN con el pentapéptido QHNPR;

- b) incubación del cultivo de células, espécimen de órgano o muestra de tejido del paso a) a concentraciones que permitan la medida de la actividad enzimática de la EPN en condiciones de velocidad iniciales en presencia de una concentración submáxima del péptido XQHNPR, especialmente del péptido QHNPR y un sustrato de la EPN, en presencia de la molécula candidata durante un tiempo suficiente para que se lleve a cabo la hidrólisis del sustrato de EPN bajo las condiciones de velocidad iniciales;
- c) cuantificación de la actividad de la EPN presente en el material del paso a) midiendo los niveles de la hidrólisis del sustrato de EPN, respectivamente en presencia o ausencia de la molécula ligando candidata y en presencia o ausencia de QHNPR.

En una forma de realización preferencial del proceso anteriormente mencionado, una concentración submáxima es una concentración del pentapéptido que reduce la degradación del sustrato en al menos un 50 % y preferentemente en al menos un 75 %.

Como se ha mencionado anteriormente, otro ensayo metabólico, con el fin de evaluar la actividad agonista o antagonista de la molécula ligando candidata, comprende la incubación del candidato ligando en presencia de un cultivo de células primario o de una línea de células establecida o de una muestra de tejido de rata, ratón o de origen humano y un sustrato de la EPN endógeno o exógeno determinando, de forma cuantitativa y cualitativa, la hidrólisis del sustrato de la EPN.

Una muestra de tejido que se usa preferentemente en los procedimientos de selección, según la presente invención, es una preparación de membranas o secciones de médula espinal de ratas, un tejido conocido que es apropiado para medir la actividad de la EPN.

Otros ejemplos de tejidos preferentes que se pueden usar en los procedimientos de selección son todas las preparaciones de tejidos periféricos que se sabe que están enriquecidos en EPN-peptidasa y/o son dianas del péptido SMR1, por ejemplo, la médula externa renal, placenta, testículos, próstata, hueso y tejidos dentales de rata. Adicionalmente, este procedimiento también se puede aplicar a tejidos y/o células de mamífero (por ejemplo de ratón) y especialmente de origen humano o líneas de células transfectadas con el ADNc de EPN humano, por ejemplo células MDCK, HEK o COS transfectadas primeramente con ADNc de EPN humano.

Los derivados biológicamente activos preferentes del péptido SMR1, especialmente de  $X_1QHX_2X_3X_4$ , tienen mejores propiedades farmacodinámicas que el péptido  $X_1QHX_2X_3X_4$  natural o sintético endógeno, y de esta forma poseen una vida media *in vivo* mayor, comparada con sus homólogos naturales, y una mejor biodisponibilidad en un espacio/tejido determinado, especialmente en los tejidos nervioso, intestinal, de la placenta y de las gónadas.

Los derivados biológicamente activos descritos anteriormente también son objeto de la presente invención.

De esta manera, la presente invención divulga también productos de maduración de la SMR1 y los derivados biológicamente activos de la proteína SMR1 o de sus productos de maduración, que se han seleccionado según los procedimientos de selección descritos anteriormente, siempre que no tengan la estructura de la fórmula (1) anterior. De hecho, también se excluye el aminoácido 146 de la proteína que constituye la proteína SMR1 (solicitud de patente PCT N° WO90/03981). No obstante, el uso terapéutico de estas moléculas excluidas como tales de la presente invención, es un objeto principal de la presente invención. También se describe en el presente documento un derivado biológicamente activo del péptido SMR1, caracterizado por su capacidad de incrementar o reducir la actividad de la metalopeptidasa o de prevenir la interacción normal entre el péptido SMR1 y dicha metalopeptidasa. La metalopeptidasa mencionada es preferentemente una metalopeptidasa de cinc de membrana. Más preferentemente la mencionada metalopeptidasa de cinc de membrana es la EPN.

Los derivados biológicamente activos del péptido SMR1 caracterizados des este modo también incluyen los productos de maduración de la proteína SMR1, siempre que no tengan la estructura de la fórmula (1) anterior.

La proteína SMR1 o sus productos de maduración y los derivados biológicamente activos de la proteína SMR1 o de sus productos de maduración que se usan en las composiciones terapéuticas según la presente invención se han seleccionado según la siguiente forma de realización preferentes: primero según su capacidad para enlazarse a las mismas dianas que el péptido  $X_1QHX_2X_3X_4$ , específicamente QHNPR, y segundo por su capacidad para modular la hidrólisis del sustrato de una metalopeptidasa, por ejemplo la EPN, *in vitro* o *in vivo*.

Se entiende por "modular" que el péptido SMR1 mencionado tiene capacidad para aumentar o disminuir la actividad de la metalopeptidasa o para prevenir la interacción normal entre el péptido SMR1 y la mencionada metalopeptidasa.

La presente invención también trata del uso de composiciones terapéuticas que comprenden una cantidad eficaz de péptido SMR1.

En los procedimientos según la invención, los péptidos o peptidomiméticos según la invención se pueden administrar por cualquiera de una variedad de modos. En determinadas formas de realización preferenciales, la administración puede ser parental, más preferentemente intravenosa. En otras formas de realización preferenciales la administración puede ser intranasal, oral, sublingual, transmucosal, intrarespiratoria o por medio de un parche inerte

o iontoforético.

Las dosis del péptido o peptidomiméticas que se van a administrar dependerán del paciente en particular, de la afección y de la vía de administración, y se pueden determinar empíricamente por la reducción o eliminación relacionada con los desórdenes patológicos mencionados anteriormente en respuesta a un régimen con dosis más elevadas. Las dosis preferentes van desde aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg, más preferentemente desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 µg/kg, y aún más preferentemente desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 50 µg/kg.

En determinadas realizaciones preferentes, el péptido o peptidomimético según la invención se administra junto con un segundo producto farmacéutico, en las que el segundo agente farmacéutico está presente en una cantidad insuficiente para reducir o eliminar los síntomas del trastorno o enfermedad que hay que tratar, y en las que el péptido o peptidomimético según la invención y el segundo agente farmacéutico actúan sinérgicamente para reducir o eliminar síntomas del trastorno o la enfermedad que hay que tratar. El segundo agente farmacéutico puede o no actuar como modulador de la metalopeptidasa.

"Sinérgicamente" significa que el péptido o el peptidomimético y el segundo agente farmacéutico juntos son más eficaces en la reducción o eliminación de síntomas del trastorno o la enfermedad que lo que serían cada uno por separado en la misma concentración.

La presente invención también describe un complejo molecular que comprende:

- el receptor EPN o el centro de unión de la SMR1 del receptor EPN;
- el péptido SMR1

#### Descripción breve de los dibujos

FIGURA 1-A: influencia de la concentración de proteína de membrana de médula espinal en hidrólisis de sustancia P (25 nM) en presencia o ausencia del inhibidor de la EPN, fosforamidón, 10 µM. Cada punto representa el porcentaje de 3H-sustancia P hidrolizada por la membrana de la médula espinal incubada 15 minutos a 30 °C en 250 µl de volumen final de disolución reguladora de Tris-HCl.

FIGURA 1-B: transcurso del tiempo de la hidrólisis de la sustancia P (12,5 nM) por las preparaciones de membrana de la médula espinal de rata en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de la peptidasa a concentración final de 10 µM: -un inhibidor ACE, captopril,- los inhibidores del CPB y del DPPIV, GEMSA e inhibidor de DPPIV. Cada punto representa el porcentaje de 3H-sustancia P hidrolizada por 250 µg de proteínas de membrana incubadas a 25 °C en 250 µl de volumen final de disolución reguladora de Tris-HCl.

FIGURA 2: actividad de la met-enkefalina en secciones de médula espinal, en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de la peptidasa a 10 µM de concentración final: un inhibidor de la EPN, fosforamidón; un inhibidor de la EPN, tiorfan; los inhibidores del CPB y del DPPIV, GEMSA e inhibidor de DPPIV; el SMR1-QHNPR solo o combinado con los inhibidores del CPB y DPPIV. El control representa la recuperación de la met-enkefalina en ausencia de secciones de tejido.

2-A: los valores representan la concentración de la met-enkefalina intacta e inmunoreactiva (media de dos determinaciones) determinada por análisis con RIA (µM) y recuperada después de 20 minutos. La incubación fue a 25 °C con 1 mg de secciones de tejido fresco en 1 ml de volumen final de disolución reguladora de KRBG.

2-B: los valores representan la cantidad de met-enkefalina intacta (la media de dos determinaciones) determinada por análisis de RP-HPLC (altura máxima con un tiempo de retención de 18,9 minutos) recuperada después de 20 minutos de incubación a 25 °C con 1 mg de secciones de tejido fresco en 1 ml de volumen final de disolución reguladora de KRBG.

FIGURA 3-A: hidrólisis de la sustancia P (25 nM) de secciones de médula espinal de rata en presencia o ausencia de varios inhibidores de la peptidasa a 10 µM de concentración final: un inhibidor de la EPN, fosforamidón; un inhibidor de la EPN, tiorfan; el inhibidor de CPB y DPPIV, GEMSA e inhibidor de DPPIV, el SMR1-QHNPR solo o combinado con inhibidores de CPB y DPPIV. El control representa la hidrólisis de la 3H sustancia P hidrolizada con 1 mg de secciones de tejido fresco incubado a 25 °C en 1 ml de volumen final de disolución reguladora de KRBG.

FIGURA 3-B: inhibición dependiente de la concentración por SMR1-QHNPR del catabolismo de 3H-sustancia P (12,5 nM) en preparaciones de membrana de médula espinal de rata. Comparación con un inhibidor de la EPN, fosforamidón, e inhibidores CPB y DPPIV, GEMSA + inhibidor DPPIV. Comparación entre la actividad inhibidora llevada a cabo por el péptido QHNPR solo o en combinación con los inhibidores CPB y DPPIV. Cada punto representa la recuperación media (en porcentaje) de 3H-sustancia P después de 10 minutos. La incubación se realizó a 25 °C con 250 µg de proteína de membrana en 250 µl de disolución reguladora Tris-HCl (la media se

obtiene a partir de 2 determinaciones).

FIGURA 4 Actividad catalítica de la sustancia P de diversas membranas de tejidos periféricos de rata y potencia inhibitoria de respuesta a la dosis de SMR1-QHNPR (sialorfina) sobre membranas renales.

5 FIGURA 4-A : La actividad de la endopeptidasa de las preparaciones de membrana de tejido se determinó usando [3H] sustancia P 25 nM, en presencia de 10  $\mu$ M de bestatina. La actividad enzimática específica expresada en pM/min/ $\mu$ g de proteína de membrana se da en ausencia y en presencia de sialorfina 10  $\mu$ M o inhibidores de NEP (fosforamidón 10  $\mu$ M o tiorfan 1  $\mu$ M).

10 FIGURA 4B: Inhibición dependiente de la concentración del catabolismo de [3H] sustancia P mediante preparaciones de membrana renal de rata. Cada punto representa el porcentaje de [3H] sustancia P intacta recuperada y calculada como porcentaje de velocidad sin inhibidor—velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, y (\*) representa la media  $\pm$  DT de cuatro determinaciones. La concentración de sialorfina se expresa en nM y se representa en una escala logarítmica en B derecha. La concentración de proteína de enzima de membrana se define de acuerdo con las condiciones de medida de velocidad inicial.

15 FIGURA 5: gráficos del perfil representativo no transformado (FIGURA 5A) y doble recíproco (FIGURA 5B) y de Dixon

(FIGURA 5C) de análisis de la actividad inhibitoria de sialorfina sobre la actividad endoproteolítica de la sustancia P por membranas renales de rata.

20 La potencia inhibitoria de sialorfina se midió usando sustancia P como sustrato en concentraciones indicadas para A y B, y a 14-24 nM (triángulo en blanco) o 56-105 nM (triángulo negro) para la FIGURA 5C. Las concentraciones de inhibidor para la FIGURA 5A y 5B fueron 0 (círculos negros), 1500 (círculos en blanco) y 4500 nM (rombos en blanco). Cada punto de los gráficos no transformado y doble recíproco representan la media de 2 determinaciones independientes por duplicado. Los experimentos se realizaron a 25 °C en 250  $\mu$ l de tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) en condiciones de medida de velocidad inicial.

FIGURA 6: Respuesta de dolor a un estímulo nocivo en ratas siguiendo la administración intravenosa de sialorfina.

25 La sesión de ensayo de 3 minutos se realizó 5 minutos después de la administración intravenosa en la vena de la cola de la rata de sialorfina o su vehículo. Se inyectó subcutáneamente naloxona (0,3 mg por kg de peso corporal) 5 minutos antes de la administración de sialorfina. Tiempo en el sector central del espacio (FIGURA 6C) (cuadrado central del espacio abierto sin agujas) y la actividad (FIGURA 6A y 6B) en cuadrado periféricos (cubiertos con agujas) durante la sesión de ensayo de 3 minutos. Cada valor representa la media  $\pm$  sem de 8 animales por grupo. 1 = número de tránsitos a través de cuadrados periféricos; 2 = número de veces que el animal se yergue sobre las patas traseras en cuadrados periféricos; 3 = número de respuestas de escape; 4 = número de vocalizaciones audibles 5 = tiempo pasado en la zona central. El grupo de control correspondía a la respuesta al dolor en ratas tratadas con vehículo: 50  $\mu$ g/kg de sialorfina, 100  $\mu$ g/kg de sialorfina, 100  $\mu$ g/kg de sialorfina más 0,3 mg/kg de naloxona.

### 35 **Ejemplos:**

#### **Ejemplo 1: Exploración ex vivo de las consecuencias funcionales resultantes de la interacción del péptido SMR1-QHNPR con la EPN**

40 Las consecuencias de la protección de los péptidos sensibles a la EPN exógena por medio del pentapéptido SMR1 se evaluaron usando preparaciones de membrana y secciones frescos de tejidos nerviosos de rata en los niveles extracelulares de la met-enkefalina y la sustancia P.

#### 1. *Materiales y procedimientos*

##### 1.1. *Preparaciones de animales y tejidos*

45 Se usaron ratas macho Wistar (Iffa Credo) maduras sexualmente (de 7 a 9 semanas). Hasta el día del experimento, las ratas se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente constante (24 °C) y sometidas a un ciclo de horas luminosas (encendido a las 8:00 horas/apagado a las 20:00 horas) sin restricción de comida ni agua. El día del experimento, los animales se sacrificaron por perforación cardiaca con pentobarbital (Sanofi, 45 mg/kg de peso corporal) o ketamina (Imalgene 500, Rhone Merieux, 150 mg/kg de peso corporal) anestesia o alternativamente asfixia por dióxido de carbono.

- *Secciones de tejido fresco*

50 Los órganos se extirparon rápidamente, se diseccionaron en hielo, se quitaron los nervios y los tejidos adiposos y a continuación se lavaron con glucosa oxigenada fría y bicarbonato contenido en la solución de Krebs Ringer (KRBG), cuya composición es la siguiente: 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1,2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 27,5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 2,6 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,67 mM de MgSO<sub>4</sub>, 5,9 mM de glucosa. Las secciones de los tejidos se prepararon bien

5 manualmente con la ayuda de un bisturí (1-2 mm de espesor), bien mecánicamente con la ayuda de un "cortador de tejidos" (1 mm de espesor). A continuación las secciones se repartieron en tubos de reacción donde se lavaron tres veces consecutivas con la KRBG oxigenada enfriada con hielo. A continuación se mantuvieron a 4 °C en la misma disolución reguladora con un suplemento de 10 µM de bestatina (una aminopeptidasa de membrana, APN, inhibidor, Roche) y se oxigenaron en una atmósfera compuesta por un 95 % de O<sub>2</sub> y un 5 % de CO<sub>2</sub> hasta que se pudieron usar como fuente de enzimas.

- *Preparaciones de membrana*

10 Los órganos diseccionados se lavaron con KRBG enfriada con hielo homogeneizado a 4 °C en 10 volúmenes (V/p) de 50 mM de disolución reguladora Tris-HCl a pH 7,2, usando un homogeneizador de teflón-vidrio (3X5 sec.). Para eliminar los restos y los núcleos del aglomerado se realizó una primera centrifugación de 5 minutos a 1000 X g y 4 °C. Para concentrar la fracción de membrana en el aglomerado, que se lavará superficialmente tres veces con una disolución reguladora de Tris-HCl fría y se volverá a suspender en una disolución reguladora reciente usando el homogeneizador de Kontes, se dividirá en partes alícuotas y se almacenará a -80 °C mientras se espera al menos durante tres meses para que se utilice como fuente enzimática, se realizará una segunda centrifugación a 100.000 X g y 5 °C.

15 1.2. *Determinación de las proteínas*

20 Para la determinación de las concentraciones de las proteínas del tejido y la membrana se usó el ensayo de proteínas DC de Bio-Rad (Bio-Rad). Al igual que en el ensayo de Lowry, el kit Bio-Rad se basa en la reacción del contenido de una proteína de muestra con una solución alcalina de tartrato de cobre y el reactivo de Folin. La absorbancia se lee a 750 nm a partir de los 15 minutos hasta 2 horas después de la adición del reactivo. La curva de calibración se prepara a partir de diluciones de una solución estándar de ASB (albúmina de suero bovino) que van desde 0,2 hasta 1,44 mg/ml de proteína.

1.3. *Medida de la actividad enzimática de la EPN*

1.3.1. *Fuentes, sustratos e inhibidores de la EPN*

25 Para los experimentos de análisis de la actividad de la peptidasa EPN se desarrolló primero un modelo ex vivo, usando incubaciones de preparaciones de membrana y secciones de tejido fresco a partir de tejidos nerviosos que se sabe que son apropiados para explorar la actividad de la peptidasa EPN, es decir, la zona dorsal de la medula espinal de la rata. La evaluación del metabolismo de los péptidos sensibles a la EPN se midió usando los sustratos de EPN implicados en la señalización de la respuesta nociceptiva: los neuropéptidos met-enkefalina y la sustancia P. Se usó met-enkefalina nativa (Peninsula, 10 µM) y sustancia P valorada modificada: [(3,4<sup>3</sup>H) Pro<sup>2</sup>-Sar<sup>9</sup>-Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]-sustancia P con una radiactividad específica de 40 Ci/mmol. (NEN, 12,5-25 Nm).

30 El objetivo era medir la endoproteólisis específica de la EPN de estos sustratos. Para ello, en cada ensayo se analizó la hidrólisis del sustrato en presencia y ausencia de inhibidores específicos de la EPN (10 µM de fosoramidon, Roche y/o 1-10 µM de tiorfan, Sigma), y en todos casos en presencia de un inhibidor de APN, bestatina (10 µM). Además, para estudiar el papel funcional del SMR1-QHNPR, la reacción se llevó a cabo en presencia del péptido SMR1 solo o combinado con inhibidores específicos de peptidasas de membrana, que podrían inactivar el péptido QHNPR por ruptura del extremo C-terminal: un inhibidor de la carboxipeptidasa B (GEMSA, 10 µM, Sigma) y un inhibidor de la dipeptidilpeptidasa IV (inhibidor de DPPIV, 10 µM, Roche).

1.3.2. *Ensayo de actividad enzimática*

40 • *Secciones de tejido fresco*

45 En primer lugar, las secciones de tejido fresco se preincubaron en medio KRBG que contenía 10 µM de bestatina, a 25, 30 ó 37 °C en un baño de agua con agitación constante y bajo una atmósfera con el 95 % de O<sub>2</sub> y el 5% de CO<sub>2</sub>, en presencia y en ausencia del inhibidor de la EPN. Al final del periodo de preincubación (15 minutos), el medio se reemplazó con un medio nuevo que contenía el sustrato solo o combinado con un inhibidor de la EPN o SMR1-QHNPR y la incubación se llevó a cabo con las mismas condiciones que la preincubación. Al final del periodo de incubación (de 5 a 30 minutos), el medio se transfirió a tubos enfriados con hielo que contenían ácido clorhídrico, de tal forma que la concentración final de HCl fuera 0,1 N. Las muestras se mantuvieron a -30 °C hasta que se midió su sustrato intacto y su contenido de metabolitos.

50 La temperatura y el tiempo de incubación, así como la concentración de sustrato y de enzima de tejido, se definieron según los resultados, así como la actividad hidrolítica de la EPN se medirá en las condiciones de velocidad inicial.

- *Preparaciones de membrana*

Las preparaciones de membrana se preincubaron en 50 mM de disolución reguladora de Tris-HCl a pH 7,2 y que contenía 10 µM de bestatin, a 25, 30 ó 37 °C en un baño de agua con agitación constante, en presencia y en ausencia del inhibidor de la EPN. Al final del periodo de preincubación (10 minutos), el sustrato se añadió solo o

combinado con el inhibidor de la EPN o con SMR1-QHNPR y la incubación se llevó a cabo en las mismas condiciones de incubación que la preincubación. Al final del periodo de incubación, la reacción se detuvo enfriando a 4 °C y se añadió ácido clorhídrico de tal forma que la concentración final del HCl fuera 0,3 N. Las muestras se mantuvieron a -30 °C hasta que se midió su sustrato intacto y su contenido de metabolitos.

- 5 La temperatura y el tiempo de incubación, así como la concentración de sustrato y de enzima de membrana, se definieron según los resultados, así como la actividad hidrolítica de la EPN se medirá bajo las condiciones de velocidad inicial.

### 1.3.3. Detección del sustrato y sus metabolitos

- 10 Para separar, detectar y cuantificar el sustrato intacto y sus metabolitos se usaron varias técnicas, dependiendo de si el sustrato estaba radiomarcado o no: dos se basan en el principio de cromatografía en fase inversa para el aislamiento selectivo de los productos de reacción (cartuchos C-18 Sep-Pak y RP-HPLC) y el tercero se basa en la detección específica del sustrato por radioinmunoensayo (RIA).

- *Cartuchos C-18 Sep-Pak*

- 15 Los cartuchos C-18 Sep-Pak (Waters) se usaron para analizar la hidrólisis de los péptidos radiomarcados: separan compuestos según sus diferencias en polaridad. Este procedimiento de extracción en fase sólida permite aislar el sustrato de sus metabolitos, ya que el carácter hidrofóbico de los metabolitos del péptido se reduce o incluso se pierde comparado con el del sustrato del péptido intacto.

- 20 Los 3H-metabolitos de la sustancia P radiomarcada se eluyen en dos pasos: uno con H<sub>2</sub>O-0,1 % de TFA y el segundo con metanol al 20 %-0,1% de TFA, mientras de la 3H-sustancia P intacta se eluye en el tercer paso con metanol al 70-100 %-0,1 % de TFA. La radiactividad de los compuestos extraídos y aislados se determina por espectrometría de centelleo líquido.

- *RP-HPCL (cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa)*

- 25 La HPLC es un procedimiento de alta resolución que permite aislar y detectar por análisis del espectrofotómetro acoplado los péptidos no radiactivos cuya concentración es de al menos 1 a 10 µM. El C-18 RP-HPCL se basa en el mismo principio que el cartucho C-18 Sep-Pak. Los análisis cromatográficos se usaron para estudiar la hidrólisis de la met-enkefalina, que se realizó en una columna analítica LUNA C-18 (150 X 4,6 mm de diámetro interno, AIT) empaquetado con esferas de diámetro de 5 µm.

- 30 La RP-HPLC se lleva a cabo en una sola etapa con un gradiente lineal de 30 minutos que va desde H<sub>2</sub>O-0,1 % de TFA hasta 100 % de acetonitrilo-0,1 % de TFA, con un caudal de 1 ml/min, que da como resultado la separación resolutive de los dos metabolitos de la met-enkefalina y del sustrato intacto. Su identificación y cuantificación relativa (pico máximo) se chequean por monitorización continua de absorbancia UV a 254 nm del flujo saliente de la columna.

- *Ensayo RIA (radioinmunoensayo)*

- 35 RIA es un buen procedimiento analítico, que permite cuantificar los compuestos cuya concentración se encuentra entre 1 y 100 nM o incluso menos. En este caso se usó un sistema RIA competitivo: la cantidad de antígeno radiactivo enlazado al anticuerpo disminuye de forma inversamente proporcional a la cantidad de antígeno contenida en la solución estándar o en la muestra. El antígeno radiactivo libre se separa del complejo antígeno radiactivo - anticuerpo por inmunoprecipitación.

- 40 La actividad de la encefalinasa EPN se monitoriza por cuantificación de la desaparición del sustrato inicial met-enkefalina. El primer anticuerpo usado es un anticuerpo de conejo dirigido contra el extremo C-terminal de la met-enkefalina (la reactividad cruzada con metabolitos u otros péptidos es ≤ 1%) (Goros y col, J. Neurochem. (1978), 31; 29-39. Radio immunoassay of methionine and leucine enkephalins in regions of rat brain and comparison with endorphins estimated by a radioreceptor assay). El segundo anticuerpo es un anticuerpo de caballo dirigido contra las inmunoglobulinas de conejo. El antígeno radiomarcado es met-enkefalina yodada (<sup>125</sup>I-met-enk enkefalina) con una radiactividad específica estimada de 3000 Ci/mmol.

- 50 Brevemente, el RIA de la met-enkefalina se lleva a cabo en 100 mM de disolución reguladora Tns/HCl a pH 8,6 conteniendo 0,1 % de BSA y 0,1 % de Triton X 100. La solución estándar (1-100 nM) o la muestra (100 µM), diluidas en el anticuerpo anti-met-enkefalina (100 µM, 1/2000) y <sup>125</sup>I-met-enk (10000 cpm, 100 µl) se incuban durante la noche a 4 °C. Las fracciones enlazadas y libres se separan por inmunoprecipitación con una segunda inmunoglobulina anticonejo en presencia de polietileno glicol 6000 (6 %). Después de la centrifugación, el precipitado enlazado radiactivo se cuantifica usando un espectrómetro de rayos gamma.

## 2. Resultados

Para especificar el papel inhibitor del SMR1-QHNPR en la actividad enzimática de la EPN, fue necesario desarrollar

primero un protocolo experimental que permitiera llevar a cabo la hidrólisis de los péptidos de met-enkefalina y de la sustancia P bajo condiciones de medida de la velocidad inicial.

## 2.1. Búsqueda de las condiciones experimentales de medida de la velocidad inicial de la actividad de la EPN

### 2.1.1. Hidrólisis de la met-enkefalina nativa

- 5 En una primera serie del experimento, las secciones y las preparaciones de membrana de tejido de médula espinal se incubaron a 30 °C en un volumen final de 1 ml de KRBG y a 37 °C en un volumen final de 0,25 ml de Tris-HCl 50 mM y pH 7,2.

#### • Análisis RP-HPLC

10 La calibración del sistema de cromatografía RP-HPLC revela que el marcador met-enkefalina se elude con un tiempo de retención de 18,8 minutos. En el caso de las muestras, se identificó un pico cuya altura incrementa considerablemente en presencia de un inhibidor específico de la EPN: este pico, cuyo tiempo de retención es de 18,8 ± 0,2 minutos, se corresponde con el sustrato de met-enkefalina intacto. Inversamente, en ausencia de los inhibidores de la EPN aparecen dos picos con tiempos de retención de 5,8 ± 0,2 minutos y 12,8 ± 0,1 minutos que se corresponden con los metabolitos Tyr-Gly-Gly y Phe-Met respectivamente. Este resultado indica que una enzima de  
15 tejido espinal ha dividido el sustrato predominante en el enlace amida Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> del péptido, que se corresponde con la actividad de la enkefalinasas.

A nivel de preparaciones de membrana, así como de secciones de tejido fresco, se observa durante 10 minutos de incubación a 37 °C una hidrólisis altamente específica de la EPN de la met-enkefalina exógena: la actividad de la enkefalinasas de la médula espinal provoca la desaparición del pico de met-enkefalina y que se invierte en presencia de fosforamidón 10 µM o de tiorfan 1 µM (80-90 % de inhibición). Adicionalmente, en estas condiciones, ambos inhibidores específicos de la EPN aseguran la casi completa inhibición de la actividad de la enkefalinasas sobre el tiempo de incubación a 37 °C, de 10 a 30 minutos.

Puesto que la hidrólisis máxima se alcanzó a 37 °C de temperatura en 10 minutos de incubación, en los siguientes experimentos se redujo la temperatura de incubación hasta 30 °C y después hasta 25 °C. En las secciones de tejido fresco que se incubaron a 30 °C, el nivel de hidrólisis de la met-enkefalina incrementó con el tiempo (desde 0 a 30 minutos). De la misma manera, en las preparaciones de membrana incubadas a 30 °C, se apreció un incremento del nivel de hidrólisis en relación con la concentración de enzimas (de 0 a 2 mg/ml). A pesar de esto, no se puede establecer una relación lineal clara.

De hecho, la cromatografía HPLC junto con el análisis del espectrofotómetro es una técnica semicuantitativa y la sola medida de las alturas de las áreas de los picos no es suficientemente precisa como para calcular las relaciones proporcionales cuantitativas. Por lo tanto, para cuantificar de forma precisa la met-enkefalina se usó la detección específica cuantitativa por RIA.

### 2.1.2. Hidrólisis de la sustancia P valorada modificada

35 Se han establecido los parámetros experimentales que permiten estudiar, bajo condiciones de medida de velocidad inicial, la hidrólisis de los sustratos met-enkefalina y sustancia P de los tejidos nerviosos que contienen EPN.

A este respecto, primero se probó la influencia de las concentraciones de proteínas de membrana de la médula espinal de la rata (desde 0,03 hasta 1 mg/ml de concentración final) sobre el nivel de hidrólisis de sustancia P (25 nM) después de 15 minutos de incubación a 30 °C. Tal como se ilustra en la figura 1-A, los niveles de la degradación de la 3H-sustancia P, expresados en porcentaje de la concentración de sustrato inicial, se incrementan proporcionalmente desde el 2 hasta el 25 % como función lineal relacionada con la concentración de proteína de membrana. En ausencia de fosforamidón se encontró una correlación más cercana de r=0,98, n=7 y en presencia de 10 µM de fosforamidón de r=0,99 y n=7. Además, en las mismas condiciones experimentales, la adición de fosforamidón da como resultado una clara reducción de la degradación de la sustancia P (del 50 al 65 % de protección del péptido exógeno).

45 De forma similar, se estudió el nivel de hidrólisis de la sustancia P (12,5 nM) en función del tiempo de incubación a 25 °C (5-20 minutos). Se eligió una concentración de proteína de membrana de 1 mg/ml. El catabolismo de la sustancia P por membranas de médula espinal aumenta linealmente con el tiempo de incubación, con una relación cercana a r=0,97 y n=18 (figura 1-B). El captopril (10 µM), un potente inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) que también divide la sustancia P, no tiene efecto en la actividad de las preparaciones de  
50 enzima de membrana ni de los inhibidores potentes de las enzimas CPB y DPPIV (compuestos protectores del catabolismo potencial del extremo C-terminal del SMR1-QHNPR).

Por lo tanto, parece que se han establecido las condiciones de medida de la velocidad inicial de la hidrólisis de la sustancia P por parte del tejido de médula espinal que contiene EPN. De todas formas, la actividad de los inhibidores EPN (fosforamidón y tiorfan), no parece que sean proporcionalmente estables en función de la duración de la incubación. Por lo tanto, el efecto del péptido SMR1-QHNPR en la actividad de la EPN se va a estudiar

sistemáticamente en función del tiempo de incubación.

### 2.1.3 Registro

Las condiciones experimentales, que permiten estudiar con las medidas de velocidad inicial el catabolismo de la metencefalina y la sustancia P por tejidos de la médula espinal *ex vivo* se exponen en la siguiente tabla:

Tiempo de preincubación	-10 minutos (preparaciones de membrana) -15 minutos (secciones de tejido fresco)
Tiempos de incubación	De 5 minutos a 30 minutos
Temperatura	25 °C
Concentración final de proteína de membrana o de tejido (médula espinal)	1 mg/ml
Concentración de sustrato	-Sustancia P: 12,5 nM - Met-encefalina 10 µM (HPLC) 20 nM (RÍA)
Volumen de reacción	-1 ml (secciones de tejido fresco) - 250 µM (preparación de membrana)
Técnica para separar los metabolitos	- Sep-Pak + contador de centelleo líquido (3H-sustancia P) - RP-HPLC y RÍA (met-encefalina)
Tampón	-Tris-HCl 50 mM, pH 7,2 + BSA al 0,1 % + bestatina 10 µM (preparaciones de membrana) -KRBG + BSA al 0,1 % + bestatina 10 µM oxigenada con un 95 % de O <sub>2</sub> – 5 % de CO <sub>2</sub> (secciones de tejido fresco)

## 5 2.2. Estudio de las consecuencias funcionales resultantes de la interacción del péptido SMR1-QHNPR con NEP

### 2.2.1. Degradación de la met-encefalina por la EPN de la médula espinal

Primero se analizó el efecto de una concentración fija de SMR1-QHNPR (10 µM) en la actividad de la met-encefalinas de secciones de médula espinal con las condiciones experimentales definidas en el párrafo 2.1.3.

- *Análisis RP-HPLC*

10 Tal como se ilustra en la figura 2-B, el análisis de HPLC muestra una fuerte hidrólisis específica de la EPN del sustrato met-encefalina por secciones de médula espinal con 20 minutos de incubación a 25 °C. El fosforamidón, a una concentración de 10 µM, asegura la inhibición completa de la actividad de la met-encefalinas y la adición del tiorfan (10 µM) da como resultado una clara reducción, del orden del 80 %, de la degradación de la met-encefalina.

15 En el mismo experimento, el péptido QHNPR a 10 µM de concentración, solo o combinado con los inhibidores de las proteasas CPB y DPPIV, tiene una actividad inhibidora del 70 u 80 %; de esta forma el pentapéptido SMR1 es capaz de entrar en competición con el pentapéptido de encefalina por los centros de unión de la EPN, teniendo ambos la misma concentración. Como en el caso de la degradación de la sustancia P por preparaciones de membrana espinal, los inhibidores de CPB y DDPIV solos no tienen ninguna actividad inhibidora intrínseca en la degradación de la met-encefalina por secciones espinales frescas. Además, aparentemente no es necesario proteger el SMR1-  
20 QHNPR, especialmente en su extremo C-terminal, de la actividad de la peptidasa potencialmente presente en las secciones frescas del tejido espinal.

Con el fin de cuantificar la actividad de la EPN y su inhibición, se ha analizado el mismo experimento usando un RIA específico de la met-enkefalina.

- *Ensayo RIA*

5 De manera general, los resultados obtenidos por la fase inversa de la técnica HPLC se confirman con los derivados del ensayo RIA (figura 2-A). Con un periodo de incubación de 20 minutos a 25 °C, el fosforamidón, tiorfan, así como el SMR1-QHNPR aparecen como compuestos muy potentes para proteger la met-enkefalina de la actividad degradante de la EPN. De esta forma, a concentración de 10 µM, se previene casi totalmente la degradación de 10 µM de met-enkefalina por el tejido de la médula espinal: 96 %, 100 % y 96 % de protección, respectivamente.

10 En conclusión, todos estos resultados muestran el papel regulador negativo ejercido por el péptido SMR1-QHNPR en la actividad de la met-enkefalinasasa de los tejidos de nervio de rata, *ex vivo*.

### 2.2.2. *Degradación de la sustancia P por la EPN de la médula espinal*

- *SMR1-QHNPR, un inhibidor de la actividad de la EPN en el catabolismo de la sustancia P*

15 En el primer caso, el efecto del péptido QHNPR en la hidrólisis de la sustancia P se investigó como se había hecho antes con la met-enkefalina. Por eso, se usaron secciones de médula espinal y se llevó a cabo una cinética sobre un periodo de incubación de 30 minutos con las condiciones de medida de la velocidad inicial definidas en 2.1.3.

20 Como se ilustra en la figura 3-A, la reacción de hidrólisis de la sustancia P tiene lugar en unas condiciones de velocidad iniciales: se encontró una estrecha relación de  $r=0,99$  entre el porcentaje de hidrólisis de sustancia P y el tiempo de incubación a 25 °C. El fosforamidón 10 µM o el tiorfan 10 µM exhiben relativamente la misma actividad inhibitoria (60-65 % de inhibición). Se encontró que el péptido QHNPR (10 µM) es un inhibidor eficiente: 75 % de inhibición de la degradación de la sustancia P cuando está solo, más del 90 % cuando se combina con GEMSA (10 µM) e inhibidor DPPIV (10 µM). Este último parece que muestra una actividad inhibitoria inherente de la degradación de la sustancia P por parte del tejido espinal fresco.

Por otra parte, en este experimento, el efecto de los inhibidores es proporcionalmente estable en función de la duración de la incubación sobre un periodo de incubación de 30 minutos ( $r = 0,99$ ).

- 25 • *Determinación del  $CI_{50}$*

30 La curva de dosis-respuesta del efecto inhibitorio del SMR1-QHNPR en la degradación de la 3H-sustancia P por parte de preparaciones de membrana de médula espinal, que se muestra en el panel derecho de la figura 3-B, permite el cálculo de un valor de  $CI_{50}$  (concentración del inhibidor que reduce a la mitad la degradación de la 3H-sustancia P) de aproximadamente  $10^{-7}$  M. En el mismo experimento, la comparación con fosforamidón revela que la protección de la sustancia P exógena por parte del SMR1-QHNPR es equivalente a la obtenida con fosforamidón (panel izquierdo de la figura 3-B). Además, el péptido QHNPR combinado con los inhibidores de CPB y DPPIV muestra una alta actividad inhibitoria de la EPN, mayor que la del fosforamidón (panel izquierdo de la figura 3-B).

### 2.2.3. *Registro*

35 El índice de metabolismo de los péptidos sensibles a la EPN se midió usando un sustrato valorado acoplado a análisis cromatográfico (sustancia P) o usando sustrato nativo acoplado a cuantificación específica por RIA (met-enkefalina). En condiciones de medida de velocidad inicial de la actividad enzimática de la EPN, se observó una inhibición casi completa del catabolismo de la sustancia P y la met-enkefalina exógena como resultado de la adición del pentapéptido SMR1: la concentración de SMR1-QHNPR que reduce a la mitad la degradación de la sustancia P por medio de tejidos de médula espinal se calculó que era  $10^{-7}$  M y su potencia inhibitoria es equivalente a la de los inhibidores específicos bien conocidos de la EPN, tiorfan y fosforamidón. A partir de estos resultados parece que, *ex vivo*, la eficiencia del SMR1-pentapéptido previene la degradación espinal inducida por la EPN de los neuropéptidos implicados en el control de la percepción del dolor espinal, es decir, de la sustancia P y la met-enkefalina.

### **Ejemplo 2: SMRI-QHNPR (Sialorfina), inhibidor del catabolismo de la sustancia P en tejidos periféricos.**

45 Los primeros resultados muestran el papel regulador ejercido por el péptido sialorfina sobre la actividad de enkefalinasasa de tejidos nerviosos de rata. El mismo enfoque se aplicó a preparaciones de membrana de tejidos periféricos que se sabe que están enriquecidos con peptidasa NEP y/o son dianas para la sialorfina, *in vivo*, es decir, tejidos de médula renal externa, mucosa intestinal, placenta, próstata, dientes y huesos, así como epitelio submandibular (Rougeot, C. y col, American Journal of Physiology, (1997) 273, R1309-20; Sales y col., (1991) Regulatory Peptides 33, 209-22) y revisado por Kenny y col., (1987), Mammalian ectoenzymes 169-210. Existen evidencias de que casi todos estos tejidos contienen sustancia P liberada por terminaciones nerviosas parasimpáticas periféricas y sensoriales que actúan cerca del sitio de liberación de células diana que contienen receptores de neuroquinina para modular la función hística particular (McCarson y col., (1999), Neuroscience 93, 361-70). De este modo, parece que el neuropéptido podría considerarse como un sustrato NEP con importancia biológica en la periferia. No obstante, la sustancia P se escinde potencialmente por las peptidasas unidas a

membrana NEP y ACE, y ambas enzimas están muy distribuidas en el epitelio renal (Skidgel y col., (1985), Progress in Clinical & Biological Research 192, 371-8).

La especificidad del ensayo de peptidasa se evaluó analizando la eficacia inhibitoria de inhibidores selectivos de peptidasa (a 1-10  $\mu\text{M}$  de concentración final para inducir una respuesta inhibitoria máxima) sobre la endoproteólisis de la 3H-sustancia P para las diversas de membrana de tejidos y analizando la formación selectiva del producto de reacción valorado relacionado con NEP que se había definido, tal como anteriormente usando un tejido espinal. Además, en condiciones estándar de medida de velocidad inicial, se añadió bestatina (10  $\mu\text{M}$ ) en el medio de incubación, para evitar de forma no selectiva las actividades de la aminopeptidasa de membrana.

Tal como se muestra en la figura 4A y de acuerdo con datos anteriores, el riñón de rata macho contenía el nivel máximo de actividad específica hidrolítica de sustancia P: 197 pM/min/ $\mu\text{g}$  de proteína de membrana de la cual el  $61 \pm 10\%$ ,  $n=4$  fue debido a la actividad de NEP y el  $38 \pm 12\%$  fue el resultado de la actividad de ACE. La sialorfina inhibió la actividad de la membrana renal con igual eficacia que el fosforamidon inhibidor de NEP, es decir, el  $60 \pm 5\%$  de la respuesta inhibitoria máxima ( $n=9$ ). Cuando se analizó la eficacia inhibitoria sobre NEP renal de conejo purificado usando sustancia P como sustrato ( $V_i = 140$  pM/min/ $\mu\text{g}$  de enzima), se encontró que el catabolismo de la sustancia P por la enzima soluble ya estaba inhibido por la sialorfina (46 % para 5  $\mu\text{M}$ ).

Además, el efecto inhibitorio de la sialorfina sobre la degradación de la 3H sustancia P por riñón de rata, que se muestra en la figura 4B, era estrictamente dependiente de la dosis ( $r=0,970$ ,  $n=20$ ), permitiendo de este modo evaluar la potencia inhibitoria con valores de  $\text{CI}_{50}$  en el intervalo micromolar [0,5-1]. La potencia inhibitoria está estrechamente relacionada con la obtenida usando NEP renal de conejo purificado y sustrato fluorógeno específico sintético, es decir 0,6  $\mu\text{M}$  o usando NEP espinal de rata, es decir, 0,4  $\mu\text{M}$ .

Todos estos resultados indicaron que la interacción molecular NEP renal/sialorfina, que ya se había evidenciado después de la captación por el tejido *in vivo*, puede dar como resultado una acción fisiológica, por ejemplo, la protección del metabolismo inducido por NEP de péptidos reguladores presentes en dicho tejido, tales como la sustancia P, un mediador humoral vasodilatatorio-proinflamatorio y neurotransmisor autónomo. El riñón que contiene la actividad de NEP más elevada parece ser también en sitio principal del metabolismo de ANP (Webb y col., (1989), Journal of Cardiovascular Pharmacology 14, 285-93). Así, puede lanzarse la hipótesis de que en sitios renales la sialorfina también podría tener un papel en la potenciación de los efectos fisiológicos de este mensajero peptídico, cuya acción está regulada claramente por la NEP (Kenny y col. (1988) FEBS Letters 232, 1-8); el ANP es un factor vasodilatador y natriurético que media la regulación fisiológica de la tensión sanguínea, la circulación de fluidos corporales y la homeostasis mineral.

En tejidos de placenta y próstata de rata, otros dos tejidos periféricos, de los más ricos en NEP, los niveles de actividad proteolítica de sustancia P fueron 12-14 veces inferiores que en riñón y se demostró que el  $74 \pm 10\%$ ,  $n=5$  era debido al NEP mientras que sólo el 8 % fue el resultado de ACE. Además, la sialorfina disminuyó la degradación de la sustancia P de estos tejidos en el  $70 \pm 3\%$ . No se observó que el tejido de próstata fuera accesible a un compuesto hidrófilo administrado sistémicamente tal como péptido sialorfina 3H, no obstante, este tejido ya es capaz de sintetizarla, sugiriendo un papel local potencial importante para la sialorfina, como inhibidor de la inactivación de la señal peptidérgica endógena, tal como sustancia P (Rougeot y col., (1994), European Journal of Biochemistry 219, 765-73; Rougeot, C. y col. (1997), American Journal of Physiology 273, R1309-20).

El resultado más destacable vino de la observación de que el tejido dental interior de rata, que es una de las dianas principales para la sialorfina, *in vivo*, mostró altos niveles de actividad proteolítica de sustancia P, es decir, 44 pM/min/ $\mu\text{g}$  de proteína de membrana (Rougeot, C. y col. (1997), American Journal of Physiology 273, R1309-20. La adición de inhibidores de NEP redujo el proceso catabólico de la 3H-sustancia P en un  $53 \pm 4\%$ , mientras que el inhibidor de ACE lo redujo en un 21 % y la sialorfina, en un  $39 \pm 14\%$ ,  $n=4$ . En línea con este resultado, la presente demostración de la eficacia inhibitoria de la sialorfina es de un  $75 \pm 10\%$ ,  $n=4$  sobre la degradación de la sustancia P sensible a ectopeptidasa por los tejidos óseos internos. La posible implicación de la sialorfina en la función NEP dentro de estos tejidos está respaldada por la observación de que la localización y la actividad de la enzima en tejidos periféricos de rata coincide con la distribución tisular y la densidad de sitios de secuestro para la sialorfina; y estos tejidos incluyeron el esqueleto y los huesos alveolares y las superficies perioesteales (Rougeot, C. y col. (1997), American Journal of Physiology 273, R1309-20; Sales y col., (1991), Regulatory Peptides 33, 209-22; Llorens y col., (1981), European Journal of Pharmacology 69, 113-6). Además, a partir de los extractos de hueso interno y de membrana dental, la molécula principal asociada a sialorfina muestra un  $\text{pl}$  de  $5,2 \pm 0,4$ , ( $n = 5$ ) y  $5,7 \pm 0,6$ , ( $n = 3$ ), respectivamente, estando de este modo bien correlacionado con el  $\text{pl}$  para NEP (5,5). No obstante, el péptido o los péptidos fisiológicos efectores sensibles a NEP implicados en la regulación de los procesos de mineralización y/o reabsorción esquelética y dental permanecen sin identificar.

Se produce una situación similar para otras estructuras anteriormente demostradas que se etiquetaron para el inhibidor de NEP o sialorfina tales como GSM de rata (Rougeot, C. y col. (1997), American Journal of Physiology 273, R1309-20; Sales y col., (1991), Regulatory Peptides 33, 209-22). Efectivamente, se encontró que el nivel en la GSM de actividad hidrolítica de sustancia P era de 4,2 pM/min/ $\mu\text{g}$  de proteína de membrana y un  $55 \pm 12\%$ ,  $n=4$  fue debido a la actividad de NEP y un 20 % a la actividad de ACE, mientras que al adición de sialorfina dio como resultado un 79 % de inhibición. Esta glándula es el sitio principal de síntesis de sialorfina donde puede estar

implicada, de este modo, en la regulación de la proteína local y/o secreciones de fluido mediante modulación de la actividad de la sustancia P, un compuesto sialogogo extremadamente potente en ratas (Yu y col., (1983), *Experimental Biology & Medicine* 173, 467-70).

5 Además, otra zona que se suministra con gran cantidad es el intestino, especialmente la pared intestinal que expresa NEP, neuronas entéricas y sensoriales extrínsecas y sitios de captación de sialorfina que contienen sustancia P (Rougeot, C. y col. (1997), *American Journal of Physiology* 273, R1 309-20; Holzer y col., (1997), *Pharmacology & Therapeutics* 73, 219-63). La endoproteólisis de la sustancia P por fracciones de membrana del intestino de rata se encontró que era de 93,5 pM/min/μg de proteína de membrana. El perfil de inhibición mostró que en presencia de inhibidores de NEP se libró un 51 % de la 3H sustancia P del proceso catabólico, mientras que la adición de sialorfina indujo una respuesta inhibitoria potente con un  $87 \pm 17 \%$ ,  $n = 3$  de protección.

10 En conjunto, estos resultados indican en gran medida que la sialorfina *in vitro* previene eficientemente al degradación inducida por endopeptidasa del neuropéptido o mediador humoral, sustancia P, que está disponible localmente en un número de tejidos en los que también se localiza la síntesis y/o captación de NEP y sialorfina. Esto sugiere que la sialorfina en circulación contribuye *in vivo* a la regulación de acciones de vasodilatación y proinflamatorias periféricas de la sustancia P. Además, como una serie de efectos periféricos de ANP en circulación están regulados por NEP, se puede lanzar la hipótesis de que la sialorfina también modula sus acciones vasorrelajantes, diuréticas y natriuréticas, especialmente en zonas renales, intestinales, óseas y submandibulares (Kenny y col., (1988), *FEBS Letters* 232, 1-8; Vargas y col., (1989), *Endocrinology* 125, 2527-31 ; Gonzalez y col., (2000), *Peptides* 21, 875-87.

### 20 **Ejemplo 3: La sialorfina tiene características conductuales cinéticas de un inhibidor competitivo**

Con el fin de determinar la modalidad del inhibidor, se hizo una gráfica de todas las medidas de velocidad inicial de la reacción enzimática renal frente a la concentración de sustrato, para varias concentraciones de inhibidor fijas o frente a la concentración del inhibidor para concentraciones fijas de sustrato.

25 Los patrones de líneas en el gráfico no transformado (figura 5A) y doble recíproco (figure 5B) así como los análisis de la inhibición por sialorfina sobre el catabolismo de la [3H] sustancia P por la membrana renal en el gráfico de Dixon (figura 5C) son la firma característica de una inhibición competitiva. La función de inhibidores competitivos mediante la unión en el sitio activo de la enzima, por lo tanto, compiten directamente con el sustrato por la enzima activa libre. Por lo tanto, la competición entre sialorfina y sustancia P tiene un efecto cinético de aumento de la  $K_m$  aparente de la enzima por el sustrato de 2 a 5 veces.

30 Por el contrario, la captación por el tejido del péptido sialorfina implica una especie molecular compleja, que incluye un elemento mineral catiónico, ya que el péptido solo se recuperó en presencia de un agente quelante de ion metálico divalente fuerte (Rougeot, C. y col. (1997), *American Journal of Physiology* 273, R1309-20). Además, los análisis de FPLC quelante mostraron que la sialorfina tiene un grupo quelante de cinc fuerte y selectivo, que probablemente implica su residuo de histidina. El ion cinc, un componente esencial del sitio catalítico de NEP es una diana común de los inhibidores de NEP sintéticos potentes que se han descrito en otra parte. Efectivamente, se han diseñado con grupos fosfato (fosforamidon) o tiol (tiolfan) o hidroxamato (celatorfan) como resto coordinador de cinc, que fijan los sitios activos de metalopeptidasa (revisión por Roques y col., (1993), *Pharmacological Reviews* 45, 87-146).

40 Considerando el comportamiento cinético de sialorfina junto con el hecho de que la interacción peptídico *in vivo* con sus sitios del receptor de membrana implicaron un ión mineral multivalente, puede postularse que la sialorfina tiene alguna cosa estructural en común con el estado de transición de la reacción, permitiendo de este modo optimizar interacciones con grupos en el sitio activo de la enzima, por ejemplo como ligando de coordinación de cinc.

La determinación de la estructura cristalina de NEP cuando forma complejo con sialorfina permitiría obtener una comprensión sobre el modo de unión distintivo de su inhibidor competitivo natural.

### 45 **Ejemplo 4: Sialorfina, una nueva clase de analgésico natural**

El NEP tiene un papel esencial en el control de la actividad biológica de las señales neuropeptídicas implicadas en el transporte de información sensorial de diferentes modos, desde los tejidos periféricos (cutáneos, musculares y de zonas viscerales) a múltiples circuitos neuronales del sistema nervioso central y periférico. Entre estos mediadores se destaca la sustancia P, un neurotransmisor sensorial y encefalinas, los neuromoduladores analgésicos (Dickenson, (1995), *British Journal of Anaesthesia* 75, 193-200). Se demuestra más adelante en el presente documento que la sialorfina previene de forma potente su catabolismo extracelular por tejidos espinales de rata, *in vitro*.

55 La importancia de las encefalinas en la modulación de la información nociceptiva se ha evidenciado en ratones con deficiencia génica pre-proencefalina, que mostraron una disminución significativa de los umbrales nociceptivos (Konig, M. y col. (1996) *Nature* 383, 535-8). Por contra, usando inhibidores de metalopeptidasas de cinc unidas a membrana, NEP y APN, que están ambos implicados en la inactivación rápida de las encefalinas, se obtiene como resultado respuestas analgésicas potentes (Chen y col., (1998) *Proceedings of the National Academy of Sciences of*

the United States of America 95, 12028-33).

Para ampliar la comprensión en las propiedades posibles *in vivo* de la sialorfina mediante la inhibición enzimática de degradación de encefalina, sus efectos se evaluaron en modelo de dolor de rata, es decir, el ensayo de dolor con aguja, (Hebert y col. (1999) *Physiology & Behavior* 67, 99-105) en el que los diversos parámetros conductuales de respuestas al dolor se registraron con un tiempo límite de 3 minutos.

La actividad *in vivo* de la sialorfina se analizó con el ensayo de dolor con aguja usando ratas macho (350-400 g, Charles Rivers). El dispositivo experimental consiste en un espacio abierto (45x45x40 cm) que está dividido en nueve cuadrado iguales (150x150 mm), ocho de los cuales son periféricos y uno es central. Los cuadrados periféricos están cubiertos con agujas de acero inoxidable (2/cm<sup>2</sup>, longitud 8 mm y diámetro 0,6 mm). El ensayo consiste en situar la rata en el cuadrado central del espacio abierto y registrar sus distintos comportamientos (tiempo límite: 3 min). Dos días antes del ensayo de dolor, las ratas se familiarizaron con el dispositivo experimental sin agujas durante 20 minutos, de tal modo que se redujo el estrés unido a la neofobia espacial. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa estadístico Statview 5.

Tal como se muestra en la figura 6A, las ratas tratadas con sialorfina administrada de forma intravenosa emitieron menos vocalización en comparación con los controles de vehículo y mostraron actividades locomotoras y exploratorias en las zonas periféricas con agujas. Por ejemplo, 100 µg por kg de peso corporal de sialorfina produjeron una respuesta analgésica profunda, ya que indujeron un aumento significativo de la frecuencia de tránsito de cuadrados periféricos durante el transcurso del ensayo de 3 minutos: 11,13 ± 1,43, n=8 frente a control 2,88 ± 0,44, n=8, p 0,001 por ANOVA y ensayos t independientes, así como de erguirse en los cuadrados periféricos: 3,88 ± 0,83 frente a 0,75 ± 0,41, p 0,005. Paralelamente, indujo una disminución significativa de respuestas de vocalización audible (0,25 ± 0,16 frente a 7,25 ± 3,13 p 0,05) y escape (0,13 ± 0,13 frente a 6,88 ± 2,47, p ≤ 0,05) a los estímulos dolorosos. Por lo tanto, las ratas tratadas con sialorfina mostraron unos niveles de analgesia similares a morfina potentes, es decir, 74-97 % de analgesia en 100 µg/kg de administración intravenosa, en el ensayo de dolor con agujas, en rata.

Además, en un segundo ensayo, el efecto de sialorfina sobre los parámetros conductuales de respuesta nociva, que se muestra en la figura 6B, se invirtió en un 42-63 % mediante la administración previa de 0,3 mg por kg de peso corporal de naloxona (inyección subcutánea) un antagonista del receptor de µ-opioides (el parámetro de vocalización se pudo invertir un 20 % con naloxona). Además, tal como se muestra en la figura 6C, las ratas tratadas con sialorfina estuvieron mucho menos tiempo en la zona central del espacio abierto que no estaba cubierta con agujas que los controles (57,75 ± 21,30 segundos frente a 155,13 ± 14,21 segundos, p=0,0019), y su comportamiento se pudo invertir en un 56 % con naloxona (112,38 ± 17,44 segundos). Esto demuestra que el receptor de µ-opioides se necesita para un efecto analgésico inducido por sialorfina farmacológicamente completo, apoyando así la mediación opioidérgica endógena de analgesia inducida por sialorfina. Las rutas opioidérgicas dependientes del receptor mu tienen un papel esencial en el control espinal y supraespinal de aportes nociceptivos y en analgesia inducida por morfina (Besse y col., (1990) *Brain Research* 521, 15-22; Matthes y col., (1996), *Nature* 383, 819-23 Sora, I. y col., (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1544-9). De este modo, la sialorfina puede producir una parte de sus efectos analgésicos mediante la potenciación de rutas endógenas y dependientes de opioides dando como resultado antinocicepción espinal y cerebral.

#### **Ejemplo 5: Estudio de la actividad del péptido QHNPR en el ensayo de evasión de estímulos de luz aversivos**

##### 1 - MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

###### 1.1 - Animales

Se usaron veinticuatro ratas SPF Wistar/AF macho que pesaban de 300 a 320 g. Después de la recepción, las ratas se pesaron, se marcaron y se distribuyeron en grupos de 3 en jaulas de policarbonato de tipo F. Los animales se alojaron en un alojamiento para animales con aire acondicionado a 22-24 °C. Se suministró a las ratas agua y bebida sin restricción. Se sometieron a un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (luz de 8 pm a 8 am).

Después de un periodo de familiarización con las condiciones del laboratorio de una semana, las 24 ratas se dividieron aleatoriamente en 2 grupos (n = 12). Las ratas de los diversos grupos se manipularon del mismo modo y en las mismas condiciones.

###### 1.2 - Materiales

##### Dispositivo para acondicionamiento de evasión de estímulos de luz aversivos (ALSAT)

El dispositivo experimental consta de una jaula aislada (50 x 40 x 37 cm) que está iluminada de forma brillante y comprende dos palancas: una palanca se activa, posibilitando que cuando se acciona se obtengan 30 segundos de oscuridad, seguidos del retorno de la luz, mientras que la otra palanca permanece inactiva (no supone un refuerzo positivo). La presión de la palanca activa durante el periodo de oscuridad no produce periodos adicionales de oscuridad. La rata se sitúa en la jaula durante 20 minutos y se hace un recuento del número de veces que se presiona cada palanca durante el experimento.

La batería de ensayos, compuesta de 4 dispositivos acondicionados, está completamente automatizada y se controla informáticamente. De este modo, ningún experimentador está presente en la habitación durante el ensayo.

1.3 – Procedimiento experimental

5 Este modelo usa la aversión de la rata al ambiente con luz brillante. Durante la sesión de familiarización y la sesión de aprendizaje, la rata aprende a controlar el ambiente con luz aversiva del dispositivo de ensayo en el contexto de acondicionamiento operante: el animal aprende a presionar la palanca activa con el fin de obtener periodos de oscuridad.

El ensayo de aprendizaje se realizado en dos sesiones:

- Sesión 1, familiarización con el dispositivo experimental (día 1);
- 10 - Sesión 2, ensayo de aprendizaje (día 2).

Variables registradas

- El número de veces que se presiona la palanca activa (AL);
- El número de veces que se presiona la palanca inactiva (IL);

1.4 - Productos

15 Productos

Producto	Péptido QHNPR	Ácido acético 0,01 N	PBS	Agua destilada
Origen	BACHEM Suiza	Riedel de Haèn Alemania	Fluka Suiza	Chaix and Du Marais Francia
Procedimiento de preparación	Se disuelve en ácido acético diluido en agua destilada y se tampona con PBS	Se diluye en agua destilada		

1.5 – Administración de productos

20 El péptido QHNPR se suspende en una proporción de 500 µg por 5 ml de ácido acético 0,01 N y, a continuación, se diluye con PBS con el fin de administrar una dosis de 50 µg/kg, mediante vía intravenosa, en la vena caudal dorsal de la rata, 1 minuto antes del ensayo.

Protocolo de administración del producto

Grupo	Ratas por grupo	Tratamiento	Dosis (µg/kg)	Vía	Volumen ml/kg	Administración antes del ensayo (minutos)
Vehículo	12	Ácido acético + PBS	-	I.V.	0,7	1
Péptido	12	FG6-005	50	I.V.	0,7	1

25 1.6 – Análisis estadístico

Se usó una prueba t independiente de probabilidad bilateral para comparar la actividad en presionar la palanca de los dos grupos de ratas.

30 Con el fin de evaluar la distinción entre las dos palancas, se usó una prueba t dependiente de la probabilidad bilateral para comparar el número de veces que se presionó la palanca activa con el número de veces que se presionó la palanca inactiva, dentro de cada uno de los grupos.

Los resultados se expresan como valores medios con errores estándar de la media (EEM).

## 2 - RESULTADOS

## 2.1 – Número total de veces que se presionaron las dos palancas durante la sesiones de ensayo

Durante las dos sesiones de ensayo, las ratas tratadas con el péptido QHNPR demostraron ser significativamente menos activas que las ratas control en el ensayo de evasión de estímulos de luz aversivos.

5 Número total de veces que se presionaron las dos palancas durante la sesiones de ensayo (media  $\pm$  EEM)

Tratamiento	Vehículo	Péptido	Prueba t independiente (prob. Bilateral)
	I.V. (n = 10)	50 $\mu$ g/kg, I.V. (n = 10)	
Sesión 1	25,58 $\pm$ 6,15	10,08 $\pm$ 1,98	t = 2,40; p<0,05
Sesión 2	21,50 $\pm$ 5,09	5,25 $\pm$ 5,09	T = 3,08; p<0,01

## 2.2 – Distinción entre las palancas

## 10 Durante las dos sesiones de ensayo, las ratas control presionaron la palanca activa notablemente más que la palanca inactiva.

Este no es el caso de las ratas tratadas con el péptido QHNPR, que no realizaron distinción entre las dos palancas.

Distinción entre las palancas durante las sesiones de ensayo (media  $\pm$  EEM)

Tratamiento	Vehículo	Péptido
	I.V. (n = 10)	50 $\mu$ g/kg, I.V. (n = 10)
<u>Sesión 1</u>		
Número de veces que se presionó AL	14,17 $\pm$ 3,52	4,83 $\pm$ 1,02
Número de veces que se presionó IL	11,42 $\pm$ 2,68	5,25 $\pm$ 1,14
Prueba t dependiente (prob. bilateral) AL frente a IL	t = 2,30; p<0,05	T = 0,49; N.A.
<u>Sesión 2</u>		
Número de veces que se presionó AL	12,83 $\pm$ 3,22	2,67 $\pm$ 0,47
Número de veces que se presionó IL	8,67 $\pm$ 1,97	2,58 $\pm$ 0,94
Prueba t dependiente (prob. bilateral) AL frente a IL	t = 2,63; p<0,05	T = 0,13; N.A.
AL: palanca activa; IL: palanca inactiva		

15

## 3- CONCLUSIÓN

En estas condiciones experimentales, durante las dos sesiones de ensayo, las ratas tratadas con el péptido QHNPR demostraron ser significativamente menos activas que las ratas control en el ensayo de evasión de estímulos de luz aversivos. Además, no mostraron ningún aprendizaje, ya que no hacían distinción entre las dos palancas.

O bien estas ratas son menos sensibles a estímulos de luz nociceptivos o bien son más sensibles al estrés del ambiente de luz experimental. Dado que se ha observado directamente que estas ratas tiene actividad locomotora y exploratoria satisfactoria durante los ensayos, es un hecho que son menos sensibles a estímulos aversivos, lo que explica su comportamiento. De este modo, el péptido muestra actividad analgésica.

- 5 Las ratas control muestran actividad satisfactoria con respecto a la manipulación de las palancas y hacen distinción entre la palanca activa y la palanca inactiva, tanto durante la primera sesión como durante la segunda sesión.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto Pasteur

- 10 <120> Nuevos usos terapéuticos de un péptido SMR1

<130> BET 00/1229

<140>

- 15 <141>

<160>8

<170> PatentIn Ver. 2.1

- 20 <210>1

<211>5

<212>PRT

<213> Rattus rattus

- 25 <400>1

**Xaa His Asn Pro Arg**  
1 5

<210>2

<211>5

<212>PRT

- 30 <213> Rattus rattus

<400>2

**Gln His Asn Pro Arg**  
1 5

<210>3

- 35 <211>6

<212>PRT

<213> Rattus norvegicus

<400>3

5 Arg Gln His Asn Pro Arg  
1 5

<210>4

<211>11

<212>PRT

<213> Rattus norvegicus

10

<400>4

Val Arg Gly Pro Arg Arg Gln His Asn Pro Arg  
1 5 10

<210>5

<211>5

15 <212>PRT

<213> Rattus rattus

<400>5

Gln His Asn Leu Arg  
1 5

20 <210>6

<211>6

<212>PRT

<213> Rattus rattus

25 <400>6

Arg Gln His Asn Leu Arg  
1 5

<210>7

<211>6

<212>PRT

30 <213> Mus musculus

<400>7

Gly Gln His Gly Pro Arg  
1 5

<210>8

<211>6

<212>PRT

<213> Mus musculus

5

<400>8

Gly Gln His Asp Pro Thr  
1 5

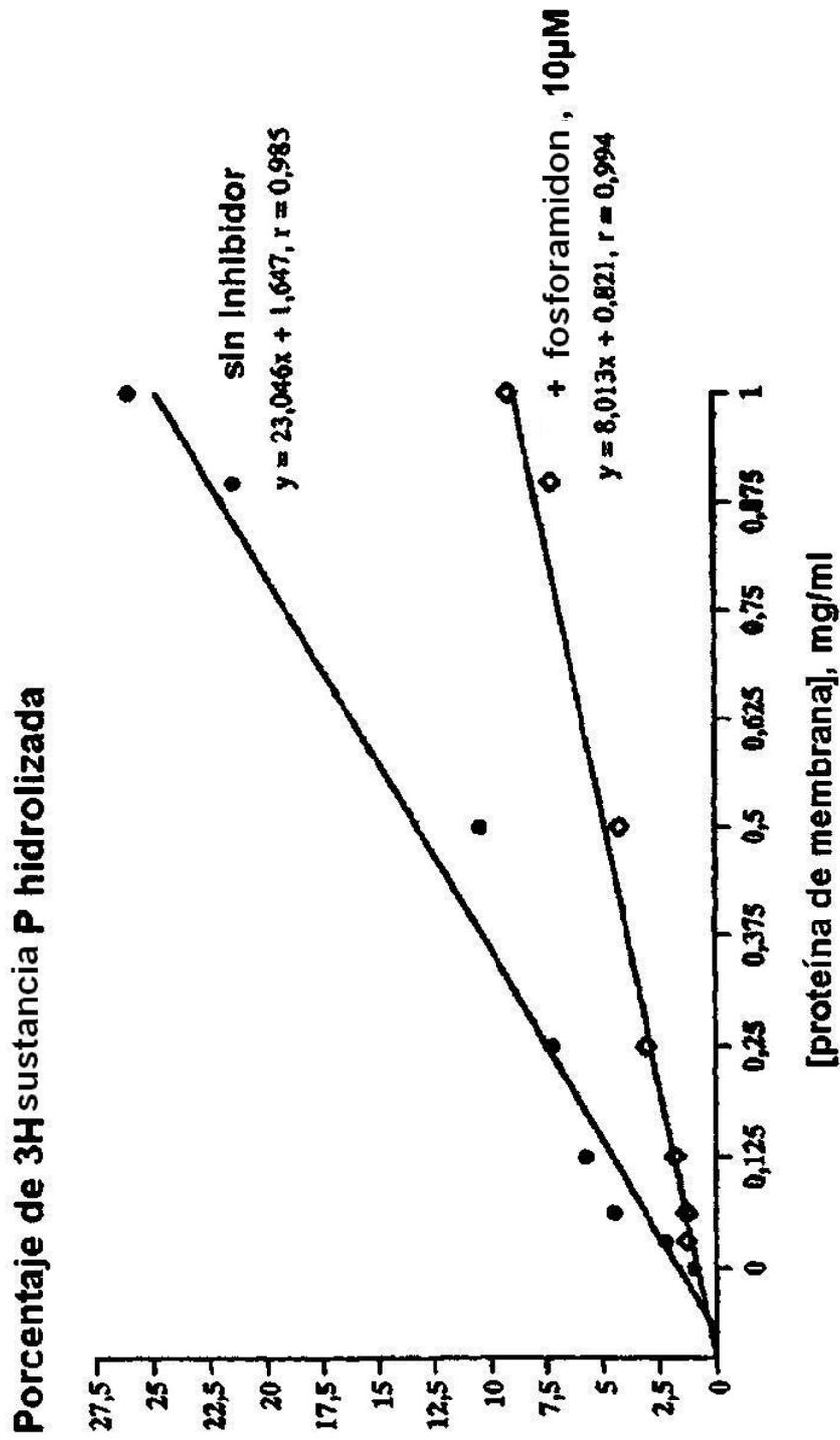
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido SMR1 o una cantidad farmacéuticamente activa de dicho péptido SAR1 para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos en el que se pretende una mediación de la actividad de una metalopeptidasa de membrana en un mamífero, específicamente en un ser humano, seleccionándose dichas enfermedades o trastornos del grupo constituido por dolor, diarrea, hipertensión, aterosclerosis, proliferación y/o diseminación de células malignas, infecciones, respuestas inmunoinflamatorias y drogadicción.
2. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha metalopeptidasa es una metalopeptidasa de cinc de membrana, tal como NEP.
- 10 3. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha modulación de la actividad de una metalopeptidasa de membrana es la modulación de la degradación inducida por NEP de péptidos sensibles a NEP.
4. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho péptido SMR1 actúa inhibiendo NEP.
- 15 5. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho péptido SMR1 actúa inhibiendo la degradación de encefalina.
6. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente antinocipeptivo.
7. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente analgésico.
- 20 8. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente que controla el dolor inflamatorio crónico.
9. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente que controla el dolor inflamatorio crónico, tal como artritis o enfermedad intestinal inflamatoria.
- 25 10. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente antidiarreico.
11. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho péptido SMR1 actúa inhibiendo la formación de AII endógena y la inactivación de la sustancia P, BK y ANP.
12. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 u 11, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente antihipertensivo.
- 30 13. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 u 11, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente natriurético.
14. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 u 11, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente diurético.
- 35 15. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno es aterosclerosis.
16. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno es la proliferación o diseminación de células malignas.
17. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno es una infección tal como una infección bacteriana o vírica.
- 40 18. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido SMR1 actúa como un agente para controlar respuestas inmunoinflamatorias.
19. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho péptido SMR1 actúa como sustituto en el tratamiento de la drogadicción.
- 45 20. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 19, en el que la composición terapéutica comprende un péptido SMR1 de la fórmula (1)

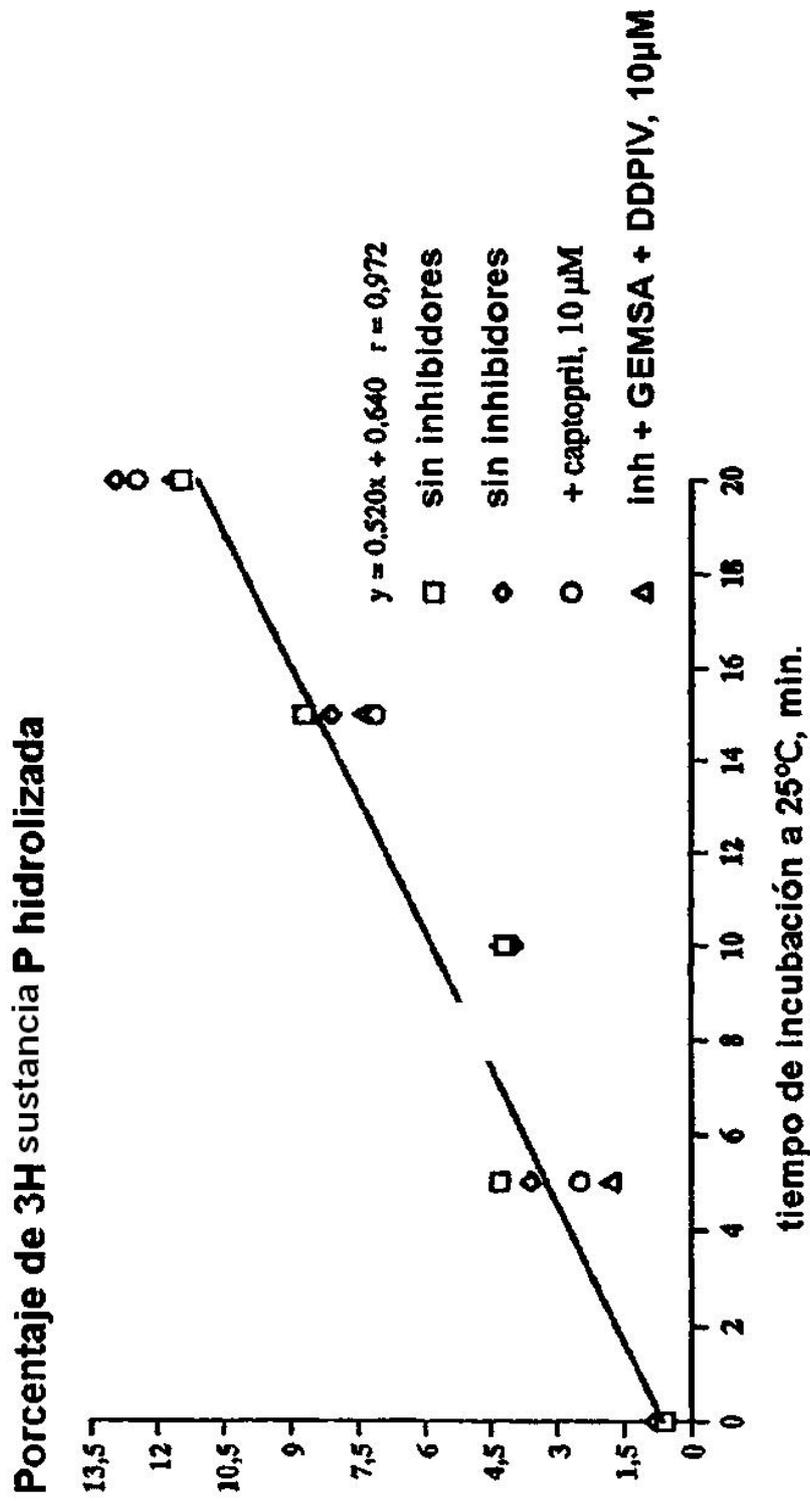
(1):  $X_1QHX_2X_3X_4$

en la que  $X_1$  indica un átomo de hidrógeno o  $X_1$  representa una cadena de aminoácido elegida de entre las siguientes:  $X_1 = R$  o  $G$ ,  $X_1 = RR$  o  $X_1 = PRR$  o  $X_1 = GPRR$  o  $X_1 = RGPRR$  o  $X_1 = VRGPRR$ ,  $X_2$  indica N, G o D,  $X_3$  indica P o L y  $X_4$  indica R o T.

21. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 19, en el que el péptido SMR1 es un derivado biológicamente activo de la proteína SMR1.
22. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21, en el que el péptido SMR1 o uno de sus derivados biológicamente activos comprende uno o varios aminoácidos en la forma D.
- 5 23. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 ó 21, en el que el péptido SMR1 o uno de sus derivados biológicamente activos además comprende un grupo sustituido o modificado o añadido para potenciar la biodisponibilidad o potenciar la resistencia a la degradación enzimática de dicho péptido o derivado biológicamente activo del mismo.
24. Un complejo molecular que comprende:
- 10 - el receptor NEAP o el sitio de unión a SMR1 del receptor NEP;  
- un péptido SMR1.
25. El péptido SMR1 para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el péptido SMR1 está asociado con un segundo agente farmacéutico que actúa de forma sinérgica con el péptido SMR1.

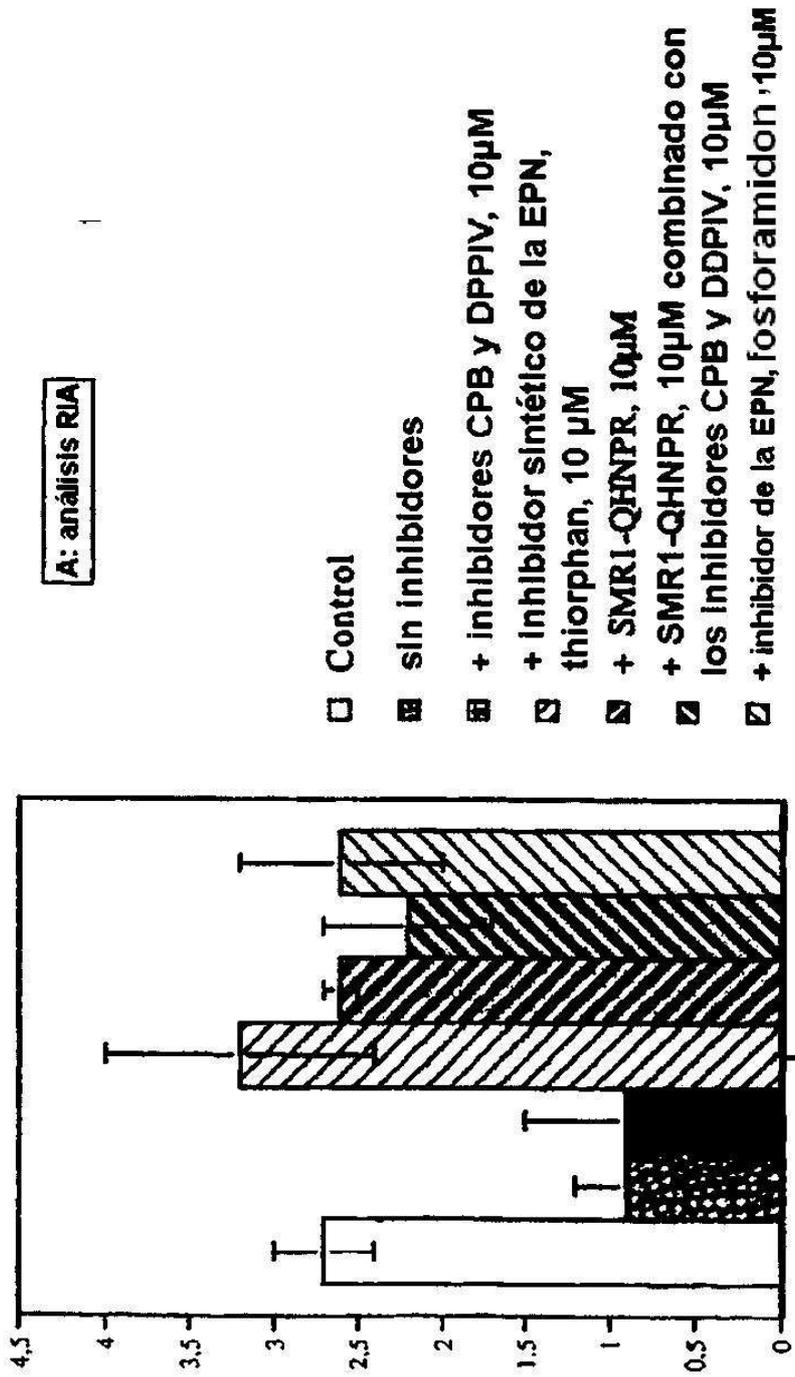


**FIG.1A**



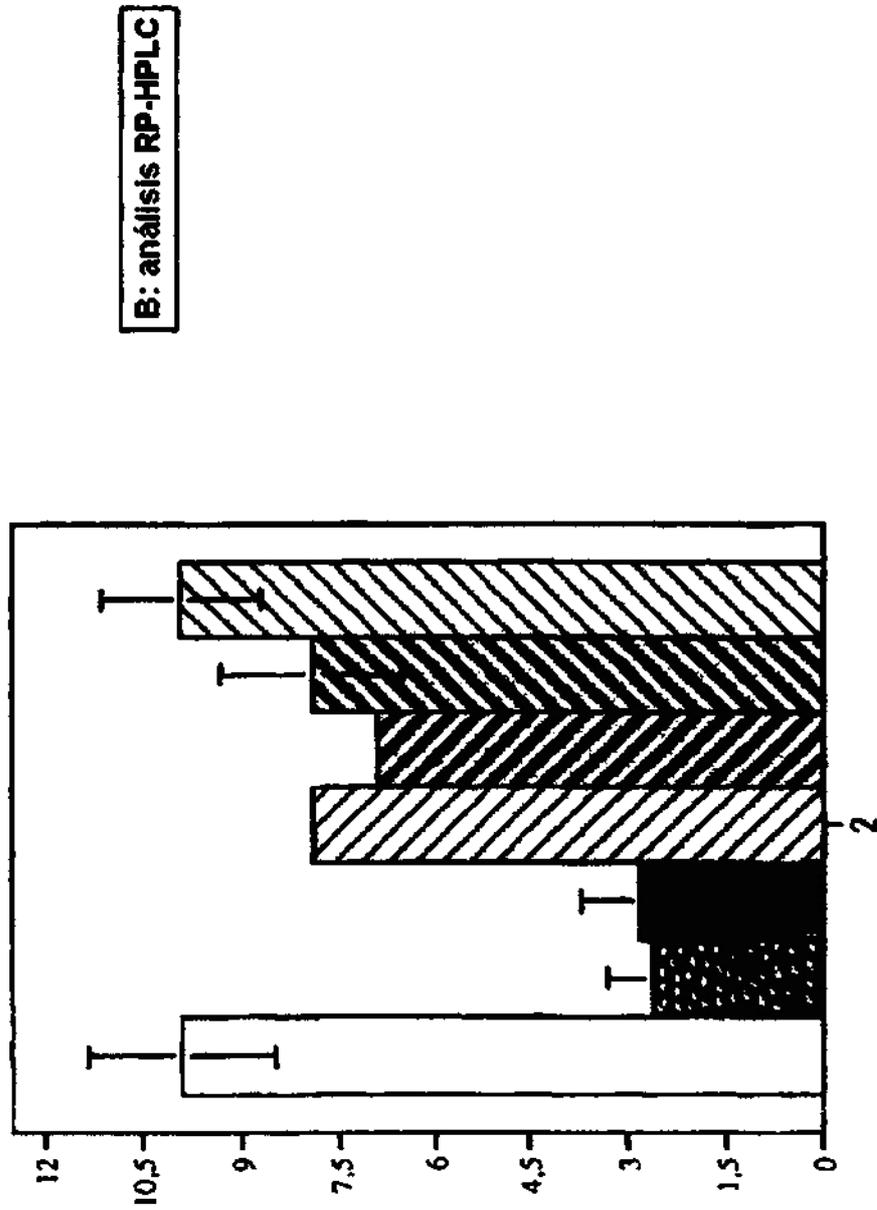
**FIG.1B**

Recuperación de la met-enkefalina nativa e inmunorreactiva  $\mu\text{M}$

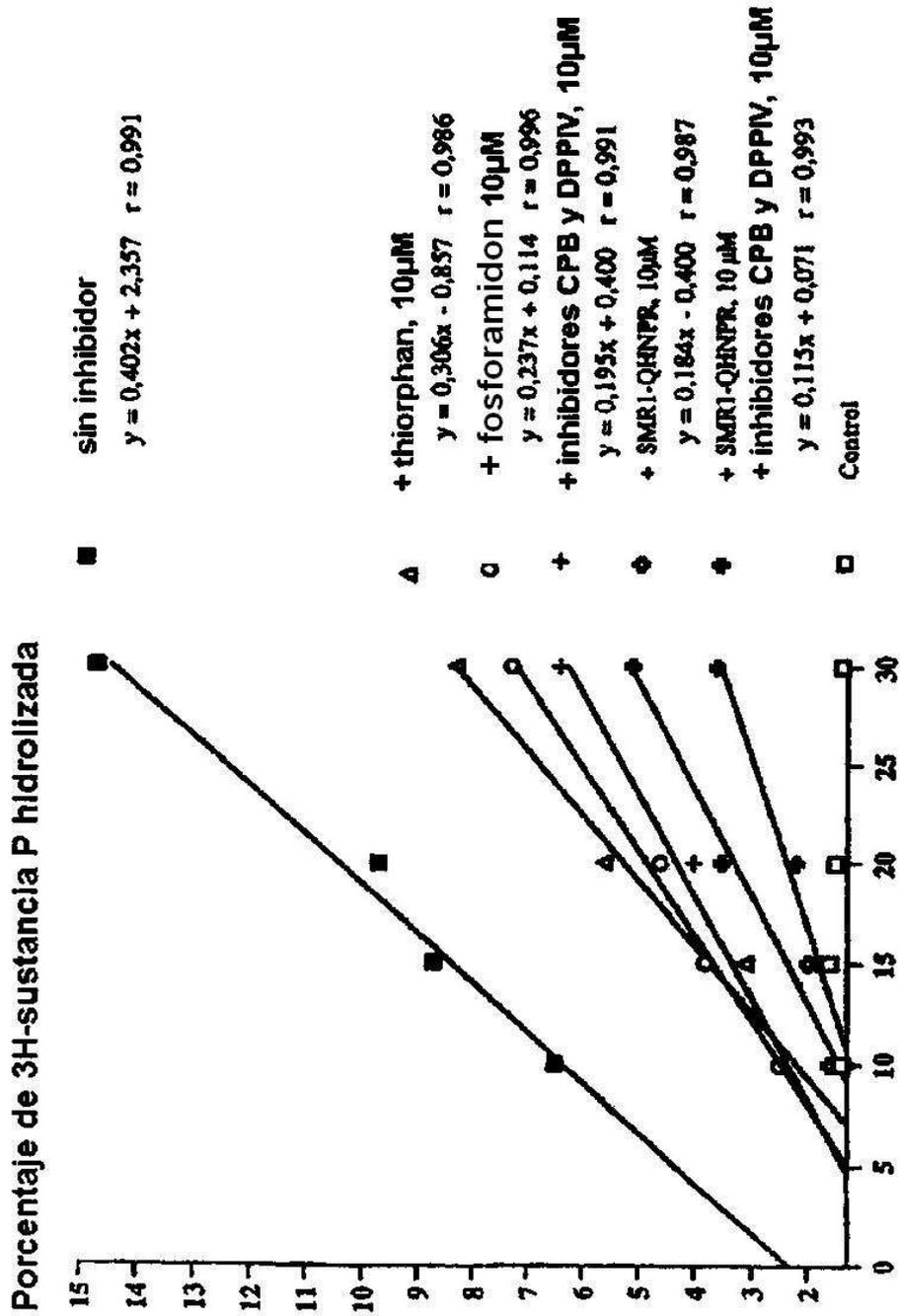


**FIG. 2A**

Recuperación de la met-enkefalina nativa, cm (pico máximo a 18,9 min Rt)

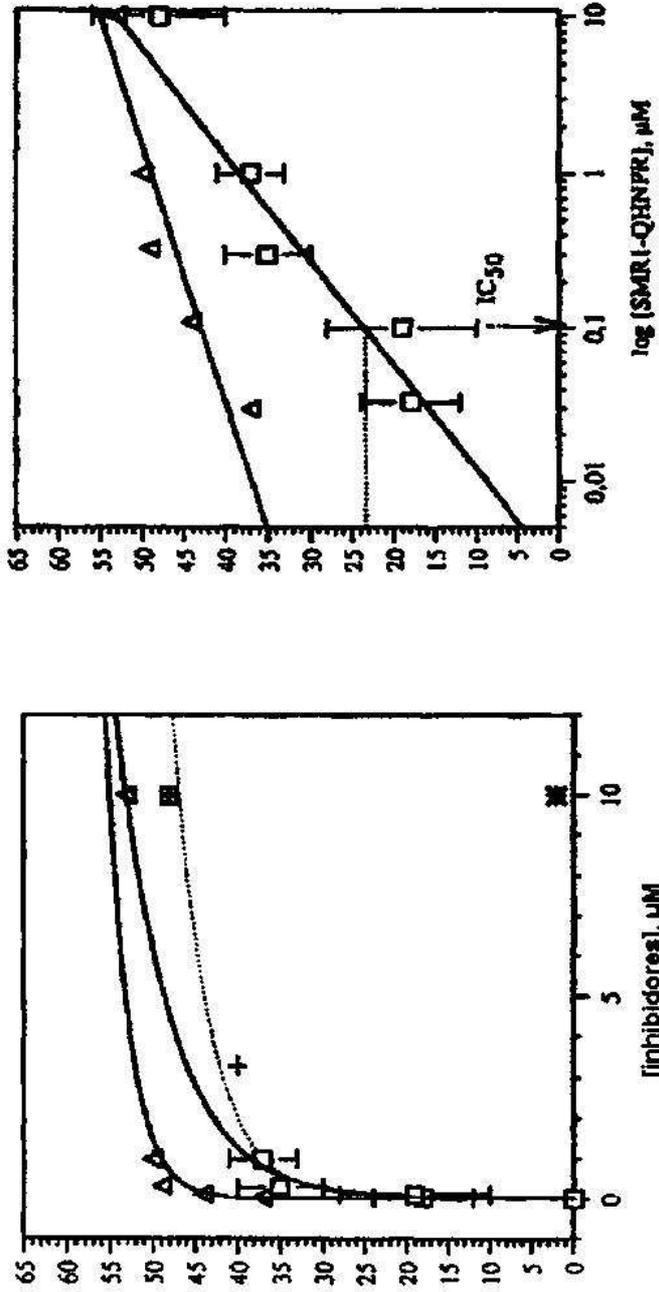


**FIG. 2B**



**FIG.3A**

Recuperación media de 3H-sustancia P, %



□ SMRI-QHNPR  $y = 14,774\text{LOG}(x) + 38,347$   $r = 0,926$

+ fosforamidon

△ inhibidores de SMRI-QHNPR + CPB y DPPIV  $y = 6,043\text{LOG}(x) + 48,973$   $r = 0,927$

\* Inhibidores de CPB y DPPIV

FIG. 3B

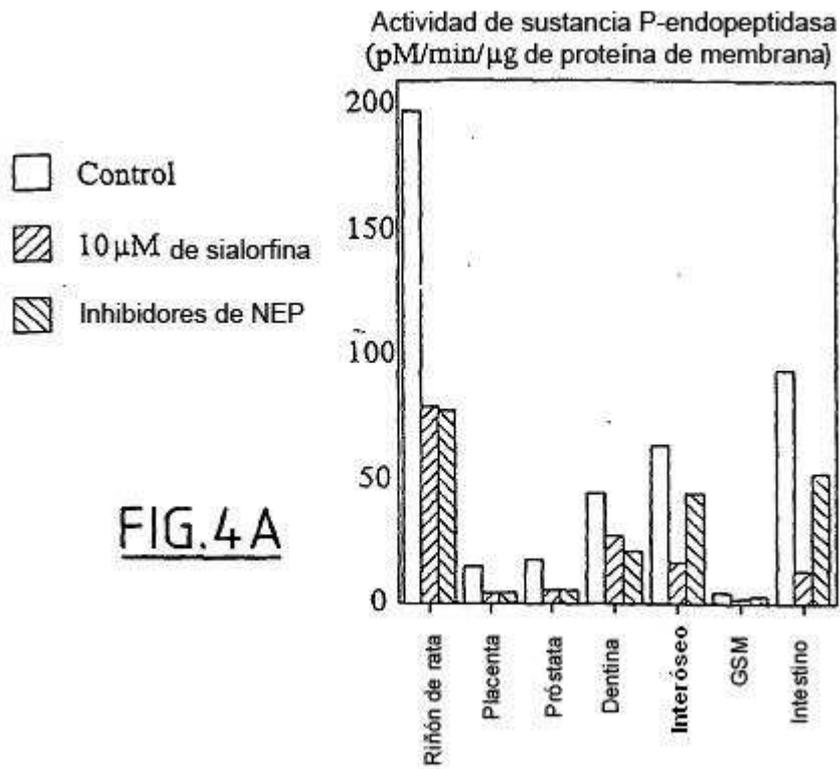


FIG.4A

Inhibición de hidrólisis de 3H sustancia P  
[Vo-vi/Vo %]

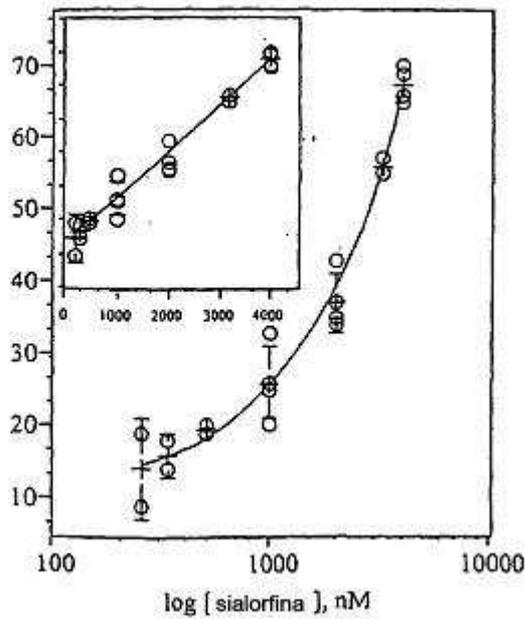


FIG.4B

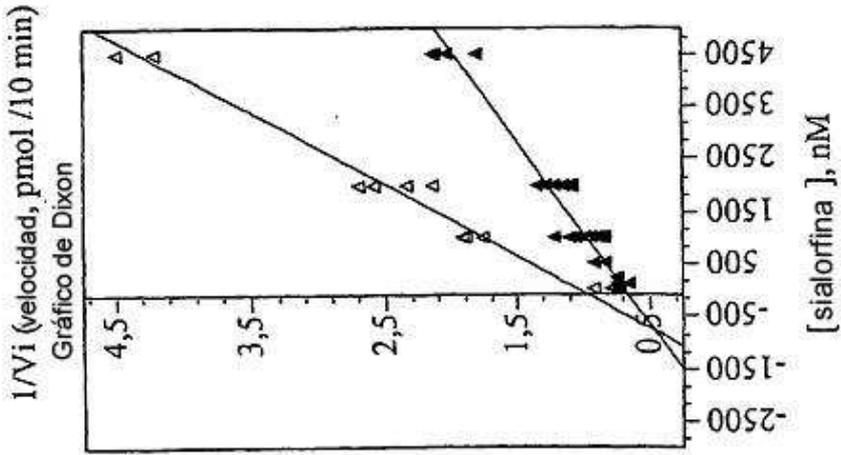


FIG.5C

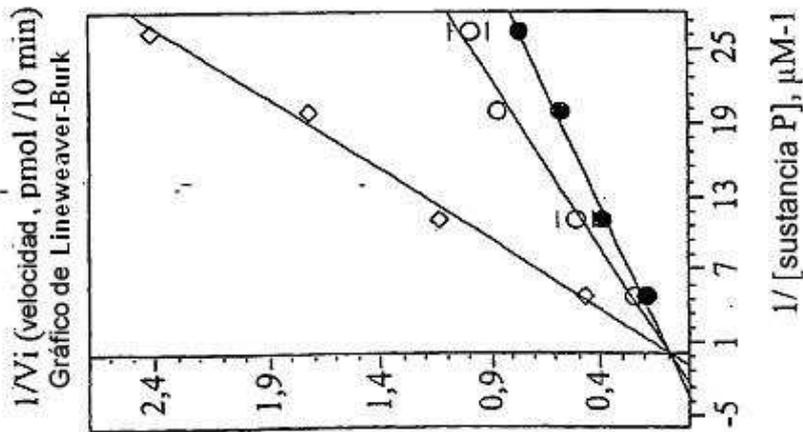


FIG.5B

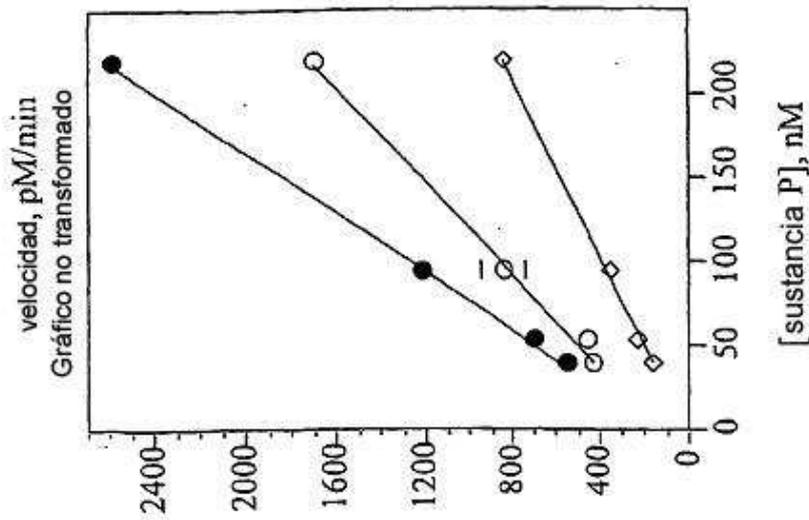


FIG.5A

