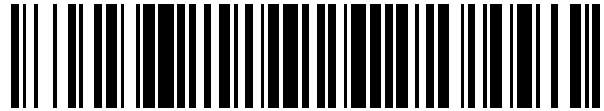


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 015**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/00** (2006.01)

**A61K 31/137** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 1/12** (2006.01)

**C07K 5/027** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.05.2008 E 08752258 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2156846**

54 Título: **Agente profiláctico o terapéutico para la diarrea**

30 Prioridad:

**08.05.2007 JP 2007123765**

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

**26.09.2014**

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)  
15-1, KYOBASHI 1-CHOME  
CHUO-KU, TOKYO 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**YONEDA, JUNYA;  
YANO, TETSUO;  
SEKI, YUKIE;  
ETO, YUZURU y  
AMINO, YUSUKE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 499 015 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

Agente profiláctico o terapéutico para la diarrea.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, que contiene, como principio activo, un compuesto que posee una acción activadora del receptor cálcico.

10 **Antecedentes de la técnica**

El receptor cálcico, también denominado el Receptor Sensible al Calcio (CaSR), tiene 1,078 aminoácidos, y se clasifica en el tipo C de los siete receptores transmembranosos (receptor unido a la proteína G). La clonación del gen para el receptor cálcico se informó en el año 1993 (documento 1 no de patente) y se sabe que el receptor cálcico provoca diversas respuestas celulares mediante el aumento de los niveles intracelulares de calcio, etc., cuando se activa con calcio, etc. La secuencia nucleótida del receptor humano para el calcio está registrada con el número NM\_000388 de GenBank y se encuentra bien conservada entre los animales.

El receptor cálcico puede actuar para promover o suprimir funciones biológicas. Por tanto, actualmente, el agente terapéutico que utiliza una acción activadora sobre el receptor cálcico y un agente terapéutico que utiliza una acción inhibitoria sobre el receptor cálcico, se utilizan apropiadamente en el tratamiento de enfermedades neurológicas, hepáticas, cardiovasculares, digestivas, y otras patologías, dependiendo de las condiciones patológicas. Por ejemplo, el receptor cálcico puede funcionar para detectar el aumento del calcio sanguíneo en las paratiroides, suprimiendo entonces la secreción de la hormona paratiroidea (PTH) para corregir el nivel sanguíneo del calcio. Por lo tanto, para un activador del receptor cálcico, se espera un efecto de reducción del nivel cálcico sanguíneo. Se ha clarificado actualmente que cuando el activador del receptor cálcico se utiliza para tratar el hiperparatiroidismo secundario en un paciente de hemodiálisis, reduce el nivel de PTH sin elevar los niveles de fósforo y calcio.

Ya que un análisis funcional del receptor cálcico se ha llevado principalmente a cabo para la homeostasis del calcio, las aplicaciones se han focalizado principalmente hasta ahora sobre las enfermedades metabólicas óseas, en las que está implicada la regulación cálcica.

Sin embargo, está claro a partir de los resultados del análisis de la expresión genética, etc., que el receptor cálcico está ampliamente distribuido en los organismos vivos, en otros órganos distintos al riñón o a la paratiroides (Documentos 2 y 3 no de patente), habiéndose propuesto la posibilidad de que el receptor cálcico esté implicado en varias funciones biológicas y en las causas de algunas patologías. Por ejemplo, se ha especulado que el receptor cálcico está implicado en las funciones del hígado, corazón, pulmón, tracto gastrointestinal, linfocitos y páncreas. Estos inventores han confirmado también que el receptor cálcico se expresa en una amplia diversidad tisular en los organismos vivos, mediante el análisis de los ARN extraídos de cada uno de los tejidos murinos, utilizando RT-PCR. Considerando los puntos de vista anteriormente mencionados, las aplicaciones potenciales para los activadores e inhibidores del receptor cálcico, están aumentando rápidamente.

Además, se han informado como activadores de receptores cálcicos, además del calcio, cationes tales como un catión de gadolinio, péptidos básicos tales como poliarginina, poliaminas tales como espermina, aminoácidos como fenilalanina, y así sucesivamente (Documento 4 no de patente).

El Documento 5 no de patente informa de que el glutatión ( $\gamma$ -Glu-Cys-Gly), un péptido de bajo peso molecular es un activador del receptor cálcico (es decir, posee acción activadora), pero no existen informes respecto a la posibilidad de que el glutatión podría ser efectivo para el tratamiento de la diarrea.

Tal como se ha mencionado anteriormente se han desarrollado como activadores del receptor cálcico, diversos activadores específicos. Sin embargo, sólo unos pocos de estos compuestos se encuentran en el organismo, y además, los compuestos que se encuentran en el organismo, muestran una actividad extremadamente baja. Por tanto, los medicamentos terapéuticos para varias patologías que contienen estos activadores, presentan problemas importantes en términos de efectos secundarios, permeabilidad y actividades. Por ejemplo, aunque se conoció que un aminoácido podría actuar sobre el receptor cálcico, la actividad del aminoácido era extremadamente baja. De este modo, la utilización de aminoácidos para activar el receptor, se consideró dificultosa. Además, tal como se ha mencionado antes, macromoléculas tales como la poliarginina se han informado como activadores, pero se cree que esta actividad se debe a la acción de un catión polivalente de una estructura no especificada. Dicho de otra forma, no se ha informado de que un péptido de una estructura específica sea útil como activador de un receptor cálcico.

La diarrea es una situación que se presenta cuando aumenta, durante la defecación, la hidratación en las heces, experimentándose por lo tanto, una pérdida de éstas, o su excreción en forma líquida. La diarrea es provocada por la inhibición de la absorción de humedad, debido a una alteración de la mucosa intestinal, el paso rápido del contenido del intestino, al activo movimiento peristáltico del intestino, y, por ejemplo, a una activación de la secreción del jugo intestinal a partir de la mucosa intestinal.

5 La diarrea se clasifica, basándose en su mecanismo o causa, en seis tipos: diarrea osmótica; diarrea secretora; diarrea exudativa; diarrea asociada con una anomalía en la motilidad del tracto intestinal; diarrea debida a una anomalía en el transporte activo; y otros, siendo importante la determinación del mecanismo o la causa de la diarrea, en el desarrollo del diagnóstico y de las estrategias terapéuticas.

10 La terapia habitual para la diarrea causada por una sustancia perjudicial, tal como un compuesto químico, toxina o bacteria infecciosa, es administrar un absorbente tal como caolín-pectina, que puede absorber la sustancia perjudicial. Además, el tratamiento para la diarrea causada por un aumento de la motilidad del tracto gastrointestinal, es administrar un medicamento que actúa sobre los nervios centrales y periféricos y da lugar a la suspensión de la motilidad del tracto gastrointestinal. Todavía más, cuando la diarrea es causada por la invasión e bacterias perjudiciales puede administrarse un agente antibiótico o antimicrobiano, teniendo en cuenta que deberá especificarse la bacteria.

15 Aunque, los medicamentos terapéuticos se han desarrollado dependiendo del mecanismo o causa de la diarrea, todavía no se ha informado de medicamentos terapéuticos que se basen en el mecanismo del equilibrio electrolítico en el tracto gastrointestinal. Un medicamento terapéutico para la diarrea basado en la función fisiológica inherente al tracto gastrointestinal, puede constituir un nuevo medicamento terapéutico nuevo potente en términos de función y seguridad. Por tanto, puede proporcionarse un medicamento seguro para la diarrea.

20 El Documento 6 no de patente menciona la posibilidad de que un activador del receptor cálcico puede servir como un medicamento terapéutico para la diarrea, pero no da a entender si el receptor cálcico tiene actualmente un efecto profiláctico o terapéutico. El documento no de patente menciona asimismo que el activador del receptor cálcico no se absorbe de forma deseable en el organismo desde el punto de vista de las razones de seguridad, pero no dilucida la estructura del compuesto.

25 Documento 1 no de patente: Nature, 1993, Vol. 366 (6455), pp. 575-580  
 Documento 2 no de patente: J. Endocrinol., 2000, Vol. 165 (2), pp. 173-77  
 Documento 3 no de patente: Eur. J. Pharmacol., 2002, Vol. 447 (2-3), pp. 271-278.  
 Documento 4 no de patente: Cell Calcium, 2004, Vol. 35 (3), pp. 209-216.  
 Documento 5 no de patente: J. Biol. Chem., 2006, Vol. 281 (13), pp. 8864-8870.  
 Documento 6 no de patente: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, Vol. 103 (25), pp. 9390-9397.

### 35 **Exposición de la invención**

Problema que debe ser resuelto por la Invención.

40 Constituye un aspecto de la presente invención proporcionar un agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, que es muy seguro en el organismo.

Medios para resolver el problema

45 Los inventores de esta invención han investigado un activador del receptor cálcico. Como resultado, encontraron que algunos péptidos poseen una acción activadora del receptor cálcico. Los inventores encontraron también que un compuesto que posea una acción activadora del receptor del calcio, puede constituir un medicamento terapéutico para la diarrea. Basándose en estos hallazgos, la presente invención se ha constituido.

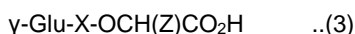
Es decir, la presente invención se refiere a lo siguiente:

50 [1] Un agente que comprende un compuesto que posee una acción activadora del receptor cálcico, para utilizarlo en un procedimiento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la diarrea,

en el que el compuesto se selecciona de entre un péptido o de un derivado peptídico,

55 en el que el péptido constituye un tipo o dos o más tipos seleccionados de entre el grupo constituido por  $\gamma$ -Glu-X-Gly (X representa un aminoácido o un derivado aminoácido),  $\gamma$ -Glu-Val-Y (Y representa un aminoácido o un derivado aminoácido),  $\gamma$ -Glu-Ala,  $\gamma$ -Glu-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys,  $\gamma$ -Glu-Net,  $\gamma$ -Glu-Thr,  $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Gly-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp,  $\gamma$ -Glu-Met(O),  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -Glu-Val-ol,  $\gamma$ -Glu-Ser,  $\gamma$ -Glu-Tau,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O),  $\gamma$ -Glu-Leu,  $\gamma$ -Glu-Ile,  $\gamma$ -Glu-t-Leu y  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me), y

60 en el que el derivado peptídico posee la estructura de la fórmula siguiente (3):

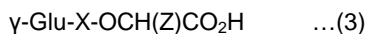


65 en el que X representa un aminoácido o un derivado del aminoácido, y Z representa H o CH<sub>3</sub>.

[2] El agente según el apartado [1] anterior, en el que X representa Cys(SNO), Cys(S-alilo), Gly, Cys(S-Me), Cys, Abu, t-Leu, Cle, Aib, Pen o Ser, e Y representa Gly, Val, Glu, Lys, Phe, Ser, Pro, Arg, Asp, Met, Thr, His, Orn, Asn, Cys o Gln.

5 [3] El agente según el apartado [1] o [2] anterior, en el que el péptido es  $\gamma$ -Glu-Val-Gly o  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly.

[4] Compuesto, que posee la estructura de la fórmula siguiente (3):



10

en la que X representa un aminoácido o un derivado de un aminoácido, y Z representa CH<sub>3</sub>; o

en el que X representa t-Leu o Abu y Z representa H.

15 [5] Compuesto según el apartado anterior [4] en el que X representa t-Leu o Abu y Z representa CH<sub>3</sub>.

[6] Compuesto según los apartados anteriores [4] o [5], que se selecciona de entre el grupo constituido por  $\gamma$ -Glu-Val-GlyA,  $\gamma$ -Glu-t-Leu-GlyA,  $\gamma$ -Glu-Abu-GlyA,  $\gamma$ -Glu-Val-LacA,  $\gamma$ -Glu-t-Leu-LacA y  $\gamma$ -Glu-Abu-LacA.

20 [7] Compuesto que está representado por  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly.

### Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 muestra un gráfico que ilustra una acción del calcio sobre un receptor de éste. El receptor cálcico humano ARNc se inyectó en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante microinyección. Los valores de las corrientes de respuesta intracelular se registraron cuando una solución de cloruro cálcico se añadió a una concentración arbitraria. El valor máximo de las corrientes intracelulares se definió como el valor respuesta de la corriente (valor máximo de respuesta). Se confirmó que no se observó respuesta en los ovocitos que se habían inyectado con agua destilada mediante microinyección como un control.

30 La figura 2 muestra un gráfico que ilustra una acción de un L-aminoácido sobre un receptor cálcico. El receptor cálcico humano ARNc se inyectó en ovocitos de *Xenopus laevis* mediante microinyección. Se registraron valores de las corrientes intracelulares de respuesta cuando se añadió una solución de un 10 mM L-aminoácido. El valor máximo de las corrientes intracelulares se definió como el valor de la corriente de respuesta. Se confirmó que no se observó respuesta en los ovocitos a los que se había inyectado agua destilada mediante microinyección como control.

35 La figura 3 muestra un gráfico que ilustra una acción de un D-aminoácido sobre un receptor cálcico. Se inyectó mediante microinyección en los ovocitos de *Xenopus laevis* el receptor cálcico humano ARNc. Los valores de las corrientes intracelulares de respuesta se registraron cuando se añadió una solución de un 10 mM D-aminoácido. El valor máximo de las corrientes intracelulares se definió como el valor de la corriente de respuesta. Se confirmó que no se observó respuesta en los ovocitos a los que se inyectó mediante microinyección con agua destilada como un control.

40 La figura 4 muestra un grupo que ilustra una acción de un péptido sobre un receptor cálcico. Se inyectó el receptor cálcico humano ARNc en los ovocitos de *Xenopus laevis* mediante microinyección. Se registraron los valores de las corrientes intracelulares de respuesta cuando se añadió una solución peptídica a una concentración arbitraria. El valor máximo de las corrientes intracelulares se definió como el valor de la corriente de respuesta. Se confirmó que no se observó respuesta en los ovocitos que se inyectaron mediante microinyección con agua destilada como control.

45 La figura 5 muestra un gráfico que ilustra un efecto terapéutico sobre la diarrea de un péptido que posee una acción activadora del receptor cálcico. En el modelo murino de defecación inducida por 5-HTP cada uno de los porcentajes 0,1 y 1% del péptido  $\gamma$ EVG con acción activadora del receptor de calcio, mejoró el índice (o baremo) de la forma de las heces, de forma dosis dependiente.

50 La figura 6 muestra un gráfico que ilustra el efecto del  $\gamma$ EVG sobre la absorción líquida en un procedimiento relacionado con el asa del intestino grueso.

55 La figura 7 muestra un gráfico que ilustra los efectos de GSH y  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly sobre la absorción líquida en un procedimiento relacionado con el asa del intestino grueso.

60 La figura 8 muestra un gráfico que ilustra el efecto de cinacalcet sobre la absorción líquida en un procedimiento relacionado con e asa del intestino grueso.

65

**Mejor modo de poner en práctica la invención**

En adelante, la presente invención se describe detalladamente.

- 5 Un agente terapéutico o profiláctico para la diarrea de la presente invención contiene un compuesto que posee una acción activadora del receptor cálcico.

10 El término "receptor cálcico" en esta descripción, significa un receptor que se denomina el Receptor Sensible al calcio (CaSR) y pertenece al tipo C de los siete receptores transmembranales. El término "activador del receptor cálcico" en esta descripción significa una sustancia que se une al receptor cálcico antes mencionado, para activar el receptor cálcico. Además, la frase "activar un receptor cálcico" en esta descripción significa que un ligando se une a un receptor cálcico para activar una proteína guanín nucleótido de unión, para transmitir entonces una señal. Además, el término "actividad del receptor cálcico", significa que éste transmite una señal.

- 15 <1> Compuesto que posee una acción activadora del receptor cálcico

20 El compuesto que tiene una acción activadora del receptor cálcico es un péptido, o su derivado. El compuesto que posee una acción activadora del receptor del calcio, puede obtenerse también haciendo reaccionar un receptor cálcico con una sustancia de prueba; y detectando la actividad del receptor cálcico. Se confirma preferentemente que el péptido así obtenido posee un efecto profiláctico o terapéutico sobre la diarrea.

En adelante, se describe específicamente un procedimiento para escanear el compuesto que posee una acción activadora del receptor cálcico:

- 25 1) Mediante la medición de la actividad del receptor cálcico, añadiendo una sustancia de ensayo a un sistema para la medición de la actividad de un receptor cálcico, para medir la actividad del receptor cálcico;
- 30 2) mediante la comparación de la actividad de un receptor cálcico cuando se añade la sustancia de ensayo, con la actividad de dicho receptor cuando está libre de la sustancia de ensayo; y
- 3) mediante la selección de la sustancia del ensayo que exhiba una intensa actividad estimulante del receptor cálcico cuando se añade la sustancia de ensayo.

35 La actividad del receptor cálcico es, por ejemplo, medica, utilizando un sistema de medida empleando células que expresan los receptores cálcicos. Las células mencionadas pueden ser células que incluyen receptores cálcicos que se expresen endógenamente, o pueden consistir en células recombinantes en las que se introducen genes exógenos del receptor cálcico. El sistema de medida de la actividad del receptor cálcico que se ha descrito anteriormente, puede utilizarse sin ninguna limitación particular, siempre que, cuando un ligando extracelular (activador) específico para un receptor cálcico, se añada a las células antes mencionadas que expresan los receptores cálcicos, el sistema de medida pueda detectar la unión (reacción) entre el activador y el receptor cálcico, o pueda responder a la unión (reacción) entre el activador y el receptor cálcico, para de este modo, transmitir una señal detectable en las células. Cuando la actividad del receptor cálcico se detecta mediante la reacción con la sustancia del ensayo, se determina que ésta posee una actividad estimulante del receptor cálcico, siendo una sustancia que posee un efecto profiláctico o terapéutico sobre la diarrea.

45 Mientras, el efecto terapéutico o profiláctico sobre la diarrea, puede confirmarse mediante una prueba que utiliza un modelo diarreico inducido por un agente anticáncer que se describe en los ejemplos, el modelo de defecación murina inducido por el 5-HTP. Además, los compuestos que van a utilizarse como sustancias de prueba no están particularmente limitados. Sin embargo, el péptido es uno que está formado preferentemente por 2 a 10 residuos aminoácidos, o un derivado de los mismos, y más preferentemente el péptido está formado por 2 o 3 residuos aminoácidos o sus derivados. El residuo aminoácido en el lado del extremo N del péptido, es preferentemente ácido  $\gamma$ -glutámico.

50 El origen del receptor cálcico no está particularmente limitado. Ejemplos del mismo incluyen no sólo el receptor cálcico humano, sino también un receptor cálcico derivado de un animal tal como un ratón, una rata y un perro. Específicamente, ejemplos preferidos del receptor cálcico antes mencionado, pueden incluir el receptor cálcico humano codificado por el gen del receptor cálcico humano, registrado con el nº NM\_000388 del GenBank. El receptor cálcico no se limita a la proteína codificada por el gen que posee la secuencia antes mencionada y puede ser una proteína codificada por el gen que muestra una homología del 60% o más, preferentemente del 80% o más y más preferentemente del 90% o más, con respecto a la secuencia antes mencionada, siempre que el gen codifique una proteína que posea una función del receptor cálcico. El receptor GPRC6A o receptor 5.24 también es conocido como un subtipo del receptor cálcico, y puede utilizarse en la presente invención. Se considerará que la función del receptor cálcico puede investigarse expresando los genes en las células y midiendo el cambio en la corriente cuando se añade el calcio, y el cambio en la concentración del ion cálcico intracelular.

65 Tal como se ha descrito anteriormente, la actividad del receptor cálcico puede confirmarse utilizando células vivas

que expresen un receptor cálcico o su fragmento, membranas celulares que expresen un receptor cálcico o su fragmento, o un sistema *in vitro* que contenga una proteína de un receptor cálcico o de su fragmento.

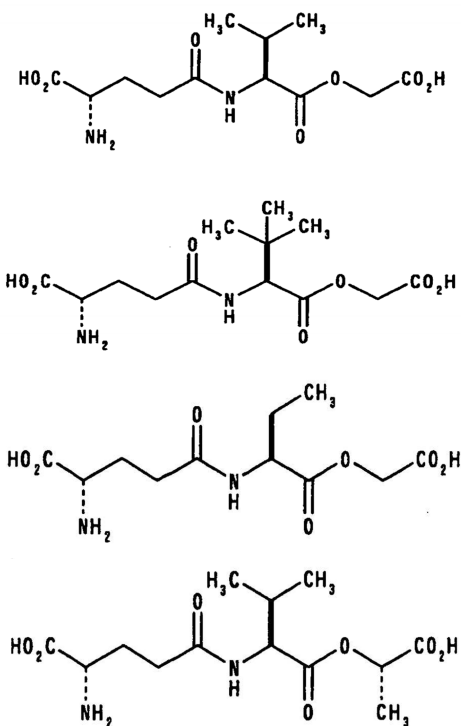
5 A continuación se describe un ejemplo que utiliza células vivientes. Sin embargo, la confirmación de la actividad del receptor cálcico no se limita a este ejemplo.

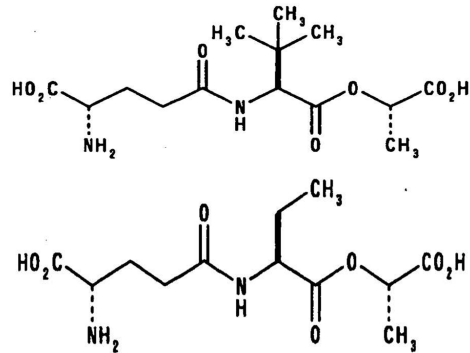
10 Un receptor cálcico se expresa en células cultivadas tales como los ovocitos de *Xenopus laevis*, células ováricas de hámster, y células de riñones fetales humanos. El receptor cálcico puede expresarse clonando el gen del receptor cálcico en un plásmido que transporte un gen extraño, e introduciendo el plásmido o ARNc obtenido utilizando el plásmido como un molde. Para detectar la reacción, pueden utilizarse una técnica electrofisiológica y un indicador fluorescente que indique un aumento en el nivel de calcio intracelular.

15 La expresión del receptor cálcico se confirma, en primer lugar, basándose en la respuesta al calcio o en un activador específico. Se utilizaron ovocitos que mostraron corrientes intracelulares con calcio a una concentración de alrededor de 5 mM, o las células cultivadas que mostraron fluorescencia del reactivo indicador fluorescente con calcio a una concentración de alrededor de 5 mM. La dependencia de la concentración cálcica se determina cambiando ésta. Entonces se prepara una sustancia de prueba tal como un péptido, a una concentración de entre 1  $\mu$ M y 1 mM añadiéndose a los ovocitos o a las células cultivadas, determinándose la actividad del receptor cálcico del péptido anteriormente mencionado.

20 Los compuestos que poseen acción activadora del receptor cálcico que van a utilizarse en la presente invención son péptidos o sus derivados (en lo sucesivo, cuando se utiliza simplemente "péptido", éste significa a veces tanto el péptido como su derivado). El péptido es  $\gamma$ -Glu-X-Gly, donde X representa un aminoácido o un derivado de éste,  $\gamma$ -Glu-Val-Y, donde Y representa un aminoácido o un derivado de aminoácido,  $\gamma$ -Glu-Ala,  $\gamma$ -Glu-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys,  $\gamma$ -Glu-Met,  $\gamma$ -Glu-Thr,  $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp,  $\gamma$ -Glu-Met(O),  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -Glu-Val-ol,  $\gamma$ -Glu-Ser,  $\gamma$ -Glu-Tau,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O),  $\gamma$ -Glu-Leu,  $\gamma$ -Glu-Ile,  $\gamma$ -Glu-t-Leu y  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me) (en lo sucesivo, también referidos como "un péptido de la presente invención", juntamente con el derivado del péptido que se describe a continuación).

30 Además el péptido puede ser un derivado peptídico que presenta una estructura de  $\gamma$ -Glu-X-OCH(Z)CO<sub>2</sub>H, donde X representa un aminoácido o un derivado de éste, y Z representa H (un átomo de hidrógeno) o CH<sub>3</sub> (un grupo metilo). Ejemplos de los mismos específicos apropiados incluyen  $\gamma$ -Glu-Val-GlyA,  $\gamma$ -Glu-t-Leu-GlyA,  $\gamma$ -Glu-Abu-GlyA,  $\gamma$ -Glu-Val-LacA,  $\gamma$ -Glu-t-Leu-LacA y  $\gamma$ -Glu-Abu-LacA. Se considerará que GlyA representa ácido glicólido y LacA representa ácido láctico. El ácido láctico puede ser S-ácido láctico y R-ácido láctico, siendo preferiblemente S-ácido láctico. Las fórmulas estructurales de estos compuestos se describen a continuación.

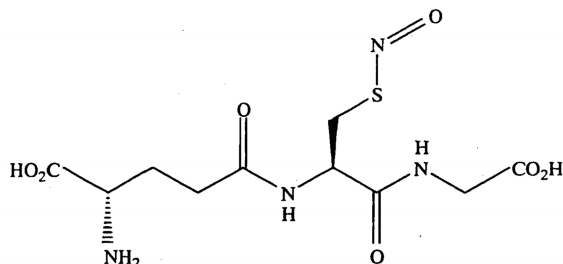




- 5 De los compuestos  $\gamma$ -Glu-X-Gly, donde X representa un aminoácido a un derivado de éste, y  $\gamma$ -Glu-Val-Y, donde Y representa un aminoácido o un derivado de éste, los compuestos preferidos son aquellos en los que X representa Cys(SNO), Cys(S-alilo), Gly, Cys(S-Me), Cys, Abu, t-Leu, Cle, Aib, Pen, o Ser, e Y representa Gly, Val, Glu, Lys, Phe, Ser, Pro, Arg, Asp, Met, Thr, His, Orn, Asn, Cys, Gln, GlyA o LacA. De éstos, los compuestos particularmente preferidos son  $\gamma$ -Glu-Val-Gly y  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly.
- 10 Deberá considerarse que en la presente invención, un aminoácido del cual cada péptido está formado, es un L-aminoácido, si no se dice lo contrario. En la presente invención, ejemplos de los aminoácidos, incluyen: un aminoácido neutro, tal como Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Met, Asn, Gln, Pro y Hyp, un aminoácido tal como Asp y Glu; un aminoácido básico tal como Lys, Arg y His; un aminoácido aromático tal como Phe, Tyr y Trp; y homoserina, citrulina, ornitina, ácido  $\alpha$ -aminobutírico, norvalina, norleucina y taurina. El aminoácido puede también encontrarse de modo no natural (constituyente no proteico), aminoácidos tales como tert-leucina, cicloleucina, ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico, y L-penicilamina. Deberá tenerse en cuenta que X en el péptido  $\gamma$ -Glu-X-Gly, puede ser cualquiera de tales aminoácidos o de sus derivados descritos anteriormente, y preferentemente un aminoácido o su derivado, distinto a Cys.
- 15
- 20 En este lugar, las abreviaturas para los residuos aminoácidos significan los siguientes:
- (1) Gly: glicina
  - (2) Ala: alanina
  - (3) Val: valina
  - 25 (4) Leu: leucina
  - (5) Ile: isoleucina
  - (6) Met: metionina
  - (7) Phe: fenilalanina
  - (8) Tyr: tirosina
  - 30 (9) Trp: triptófano
  - (10) His: histidina
  - (11) Lys: lisina
  - (12) Arg: arginina
  - (13) Ser: serina
  - 35 (14) Thr: treonina
  - (15) Asp: ácido aspártico
  - (16) Glu: ácido glutámico
  - (17) Asn: asparagina
  - (18) Gln: glutamina
  - 40 (19) Cys: cisteína
  - (20) Pro: prolina
  - (21) Orn: ornitina
  - (22) Sar: sarcosina
  - (23) Cit: citrulina
  - 45 (24) N-Val: norvalina
  - (25) N-Leu: norleucina
  - (26) Abu: ácido  $\alpha$ -aminobutírico
  - (27) Tau: taurina
  - (28) Hyp: hidroxiprolina
  - 50 (29) t-Leu: tert-leucina
  - (30) Cle: cicloleucina
  - (31) Aib: ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico (2-metilalanina)
  - (32) Pen: L-penicilamina

Ejemplos de los derivados de aminoácidos incluyen varios derivados de los aminoácidos acabados de mencionar, tales como aminoácidos no habituales, no-naturales, un amino alcohol, y un aminoácido sustituido con una cadena lateral tal como el grupo carbonilo terminal, el grupo amino terminal, y el grupo tiol de la cisteína, que puede contener varios sustituyentes. Ejemplos del sustituyente incluyen un grupo alquilo, un grupo acilo, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo alquilamino, un grupo nitro, un grupo sulfonilo, y varios grupos protectores. Ejemplos de los aminoácidos sustituidos, incluyen: Arg(NO<sub>2</sub>): N-γ-nitroarginina; Cys(SNO): S-nitrocisteína; Cys(S-Me): S-metilciclocisteína; Cys(S-alilo): S-alilcisteína; Val-NH<sub>2</sub>: validamida; y Val-ol: valinol (2-amino-3-metil-1-butanol).

Deberá considerarse que γ-Glu-Cys(SNO)-Gly descrito antes tiene la siguiente fórmula estructural y el "(O)" en las fórmulas anteriores γ-Glu-Met(O) y γ-Glu-Cys(S-Me)(O), indican una estructura sulfóxido.



S-nitrosoglutatión (GNSO)

Los inventores de la presente invención han puesto de manifiesto que γ-Glu-X-Gly, donde X representa un aminoácido o un derivado de aminoácido, γ-Glu-Val-Y, donde Y represente un aminoácido o su derivado, γ-Glu-Ala, γ-Glu-Gly, γ-Glu-Cys, γ-Glu-Met, γ-Glu-Thr, γ-Glu-Val, γ-Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp, γ-Glu-Met(O), γ-Glu-γ-Glu-Val, γ-Glu-Val-NH<sub>2</sub>, γ-Glu-Val-ol; γ-Glu-Ser, γ-Glu-Tau, γ-Glu-Cys(S-Me)(O), γ-Glu-Leu, γ-Glu-Ile, γ-Glu-t-Leu y γ-Glu-Cys(S-Me) activan cada uno al receptor cálcico. Por tanto γ-Glu-X-Gly, donde X representa un aminoácido o su derivado γ-Glu-Val-Y, donde Y representa un aminoácido o su derivado, γ-Glu-Ala, γ-Glu-Gly, γ-Glu-Cys, γ-Glu-Met, γ-Glu-Thr, γ-Glu-Val, γ-Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp, γ-Glu-Met(O), γ-Glu-γ-Glu-Val, γ-Glu-Val-NH<sub>2</sub>, γ-Glu-Val-ol, γ-Glu-Ser, γ-Glu-Tau, γ-Glu-Cys(S-Me)(O), γ-Glu-Leu, γ-Glu-Ile, γ-Glu-t-Leu y γ-Glu-Cys(S-Me) pueden utilizarse como un agente terapéutico para la diarrea. El péptido que va a utilizarse en la presente invención puede emplearse solo o como una mezcla de dos, o tres, o más tipos arbitrarios, en la presente invención.

Como el péptido anteriormente mencionado, puede utilizarse un producto comercialmente disponible. Además, el péptido puede obtenerse utilizando apropiadamente una técnica conocida tal como (1), un procedimiento de síntesis química, o (2), un procedimiento para sintetizar el péptido mediante una reacción enzimática. Ya que el número de residuos aminoácidos contenidos en el péptido que va a utilizarse en la presente invención es tan comparativamente pequeño como 2 o 3 residuos, es conveniente un procedimiento de síntesis química. Cuando se lleva a cabo la síntesis química del péptido, el oligopéptido puede sintetizarse o semi-sintetizarse utilizando un sintetizador peptídico. Un ejemplo del procedimiento de síntesis química del péptido, incluye un procedimiento sintético en fase sólida. El péptido sintetizado tal como se describe anteriormente, puede purificarse mediante medios habituales tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, o la cromatografía de afinidad. Dicho procedimiento sintético en fase sólida del péptido, y su purificación subsiguiente son bien conocidos en el campo técnico.

Además, el péptido que va a utilizarse en la presente invención, puede obtenerse también mediante una reacción enzimática. Por ejemplo, puede utilizarse el procedimiento que se describe en la patente WO 2004/011653. Es decir, el péptido puede obtenerse también mediante: haciendo reaccionar un aminoácido o dipéptido que posee un extremo carboxilo esterificado o amidado con un aminoácido que posee un grupo amino libre (por ejemplo, un aminoácido con un grupo carboxilo protegido) en presencia de un enzima productor de un péptido; y purificando el dipéptido o tripéptido producido. Ejemplos de un enzima productor de un péptido incluyen un cultivo de un microorganismo que posee la capacidad de producir el péptido, células microbianas separadas del cultivo, o un producto procesado de células del microorganismo, o un enzima que produzca un péptido derivado del microorganismo.

El compuesto que va a utilizarse en la presente invención incluye también aquel en forma de una sal. Cuando el péptido de la presente invención está en forma de una sal, ésta puede ser una sal farmacológicamente aceptable. Ejemplos de una sal con un grupo ácido tal como un grupo carboxilo en la fórmula, incluyen: una sal amónica; una sal con un metal alcalino tales como sodio y potasio; una sal con un metal alcalinotérreo tal como calcio y magnesio, una sal de aluminio, una sal de zinc, una sal con una amina orgánica tal como trietilamina, etanolamina, morfolina, pirrolidina, piperidina, piperazina, y dicitclohexilamina; y una sal con un aminoácido básico tal como arginina y lisina. Ejemplos de una sal con un grupo básico, en el caso en el que el grupo básico exista en la fórmula, incluyendo: una



sal con ácido inorgánico tal como el clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y bromídrico; una sal con un ácido carboxílico orgánico tal como el acético, cítrico, benzoico, maleico, fumárico, tartárico, succínico, tánico, butírico, hibenzoico, pamoico, enantoico, decanoico, teíclico, salicílico, láctico, oxálico, mandélico y málico; y una sal con un ácido sulfónico orgánico tal como el metanosulfónico, bencenosulfónico, y el p-toluensulfónico.

5

<2> Agente profiláctico o terapéutico para la diarrea

El compuesto que posee acción activadora del receptor cálcico, puede utilizarse como un principio activo en un agente profiláctico o terapéutico para la diarrea. Ejemplos de las formas en las que puede presentarse el agente terapéutico o profiláctico para la diarrea, de la presente invención, incluyen medicamentos, cuasi-medicamentos y alimentos.

10

Un procedimiento para la administración del agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, no está limitado en particular, y puede incluir administración oral, administración invasiva utilizando una inyección, una administración por vía rectal, o una administración transdérmica. El agente profiláctico o terapéutico para la diarrea de la presente invención puede administrarse en forma de una formulación farmacéutica que se utilice convencionalmente, mezclando su principio activo con un transportador farmacéutico líquido o sólido no tóxico, que sea apropiado para la administración oral o inyectable. Ejemplos de estas formulaciones incluyen: una forma de formulación sólida tal como un comprimido, un gránulo, un polvo, y una cápsula; una fórmula de formulación líquida tal como una solución, una suspensión y una emulsión; y una forma de un liofilizado. Estas formulaciones pueden prepararse llevando a cabo ejercicios para su preparación.

15

20

Ejemplos de los transportadores no tóxicos anteriormente mencionados, incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, dextrina, glicéridos de ácidos grasos, polietilenglicol, hidroxietilalmidón, etilenglicol, éster polioxietilénico sorbitan de ácidos grasos, gelatina, albúmina, aminoácidos, agua, y solución fisiológica salina. Además, si es necesario, pueden añadirse apropiadamente agentes aditivos que se utilizan convencionalmente, tales como un agente estabilizante, humectante, emulsificante, cementante y de tonicidad.

25

El compuesto de la presente invención que posee una acción activadora del receptor cálcico, para utilizar como agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, es preferentemente un péptido o un compuesto de peso molecular bajo de la presente invención, y puede ser un compuesto conocido que posee una acción activadora del receptor cálcico. Además, el agente profiláctico o terapéutico para la diarrea de la presente invención puede contener, además del péptido de la presente invención, un tipo, o dos, o más de los activadores del receptor cálcico.

30

Ejemplos de los activadores conocidos del receptor cálcico, antes mencionados, incluyen un catión tal como un catión cálcico y un catión de gadolinio; un péptido básico tal como poliarginina y polilisina; una poliamina tal como putrescina, espermina y espermidina; una proteína tal como protamina; un aminoácido tal como fenilalanina; un péptido tal como glutatión; y un compuesto análogo tal como cinacalcet. En la presente invención, el activador conocido y anteriormente mencionado del receptor cálcico, puede añadirse solo, o como una mezcla de sus dos, o tres, o más, tipos. De los activadores anteriormente mencionados y conocidos del receptor cálcico, se prefiere un catión tal como el cálcico y el de gadolinio, siendo el más preferido el de calcio. En otras palabras, un tipo, por lo menos, del activador conocido del receptor cálcico, que se añade posteriormente, es preferentemente un catión.

35

40

Cuando un activador conocido del receptor cálcico se mezcla con el péptido de la presente invención tal como se describe en ésta, se observa una activación más intensa del receptor cálcico. Cuando el péptido de la presente invención se utiliza como el activador del receptor cálcico la proporción del péptido total de la presente invención con respecto a la totalidad de un activador conocido del receptor cálcico, no se limita particularmente, siempre que se alcance una activación más intensa del receptor cálcico. Por ejemplo, la proporción de la masa del activador conocido del receptor cálcico, con respecto a la totalidad del péptido de la presente invención, se fija preferentemente entre 1:100 y 100:1.

45

50

La administración o la cantidad ingerida del agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, de la presente invención, puede ser cualquiera, siempre que la cantidad sea efectiva para la terapia o la profilaxis, y sea ajustada apropiadamente, dependiendo de la edad, sexo, peso corporal, y síntomas del paciente. Por ejemplo, en el caso de una administración oral, la cantidad total del péptido que va a utilizarse en la presente invención es preferentemente de 0,01 g a 10 g por Kg de peso corporal, por dosis, y más preferentemente, de 0,1 g a 1 g por Kg de peso corporal, por dosis. La frecuencia de administración no está particularmente limitada, pudiéndose llevar a cabo la administración de una o varias veces al día.

55

La cantidad del compuesto que tiene acción activadora del receptor cálcico en el agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, de la presente invención, no está limitada, siempre que la cantidad se adapte a la dosis anteriormente descrita. La cantidad es preferentemente del 0,000001% en masa al 99,9999% en masa y más preferible entre el 0,00001% en masa y el 99,999% en masa y particularmente preferible entre el 0,0001% en masa y el 99,99% en masa, con respecto al peso seco.

60

65

El agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, de la presente invención, puede también utilizarse como alimento

o bebida, que tenga un efecto terapéutico o profiláctico de la diarrea. Por ejemplo, el agente profiláctico o terapéutico puede formularse en un alimento o bebida en un contenedor o embalaje que indica que el agente ejerce un efecto terapéutico o profiláctico para la diarrea. La forma del alimento o de la bebida no está particularmente limitada, y el alimento o la bebida pueden obtenerse en el mismo procedimiento de producción que un alimento general, y con idénticos materiales que aquellos para el alimento general, excepto que se mezcle el compuesto que posea una acción activadora del receptor cálcico. Ejemplos de alimento incluyen un condimento, una bebida tal como un zumo y leche de vaca, confitería, una jalea, un alimento sano, un producto agrícola procesado, un producto de pesca procesado, un producto animal procesado tal como leche de vaca, y un suplemento alimenticio. Además, en la presente invención, los ejemplos de diarrea incluyen síndrome del intestino irritable, diarrea funcional, enfermedad inflamatoria intestinal, meteorismo, diarrea bacteriana y dispepsia.

### Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe más específicamente con referencia a los ejemplos.

#### Ejemplo 1. Preparación de un gen receptor del calcio (ARNc)

El gen que codifica el receptor cálcico se preparó de la forma siguiente: Basándose en la secuencia del ADN registrada en el NCBI (receptor cálcico: NM\_000388), se sintetizaron oligo ADN sintéticos (cebador directo (SEC ID n°: 1) y cebador inverso (SEC ID n°: 2), que se utilizaron para PCR.

Como fuente, se utilizó ADNc renal humano (preparado por Clontech), llevándose a cabo la PCR utilizando los cebadores y la Pfu ultra ADN polimerasa (preparada por Stratagene), en las condiciones siguientes. Después de una reacción a 94°C durante 3 minutos, se repitió 35 veces un ciclo de reacciones a 94°C durante 30 segundos, a 55°C durante 30 segundos, y a 72°C durante 2 minutos, y entonces, se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 7 minutos. Si esta amplificación, mediante PCR, se alcanzó, fue detectado llevando a cabo una electroforesis en agarosa, realizando una tinción con un reactivo que tiñe el ADN, y una subsiguiente irradiación ultravioleta. Las longitudes de la cadena de los productos de PCR, se confirmaron con marcadores de ADN de tamaños conocidos, que se sometieron simultáneamente a electroforesis. Se sometió a digestión el vector plasmídico pBR322 con el enzima de restricción EcoRV (preparado por Takara). El fragmento génico amplificado mediante PCR se unió al sitio de fragmentación plasmídico, utilizando el "Ligation kit" (preparado por Promega). La cepa DH5α de *Escherichia coli* se transformó con cada solución de la reacción de unión, seleccionándose un transformante que albergaba el plásmido en el que donó el producto de amplificación de PCR. Este producto de amplificación mediante PCR se confirmó mediante análisis secuencial del ADN. Utilizando el plásmido recombinante como una matriz, se preparó, utilizando un equipo de preparación ARNc (preparado por Ambion), ARNc del gen receptor del calcio.

#### Ejemplo 2. Preparación de varias muestras

Como muestras de L-aminoácidos, se prepararon 23 tipos de aminoácidos de grado especial, que incluían alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, Ariptófano, tirosina, valina, ornitina y taurina (todos de Ajinomoto Co. Inc.), e hidroxiprolina (Nacarai Tesque, Inc.). Se utilizó un grado especial para D-Cys y D-Trp (Nacarai Tesque, Inc.) y el cloruro cálcico.

Además, como muestras peptídicas, se utilizaron  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (Sigma Aldrich Japan K.K.),  $\gamma$ -Glu-Cys(SNO)-Gly (Dojindo Laboratories),  $\gamma$ -Glu-Ala (Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Gly (Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Cys (Sigma Aldrich Japan K.K.),  $\gamma$ -Glu-Met (Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Abu-Gly (Abu: ácido  $\alpha$ -aminobutírico, Bachem Feinchemikalien AG),  $\gamma$ -Glu-Thr (Kokusai Chemical Co., Ltd.),  $\gamma$ -Glu-Val (Kokusai Chemical Co., Ltd.),  $\gamma$ -Glu-Leu (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Ile (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Gly-Orn (Kokusai Chemical Co., Ltd.), Asp-Gly (producto de síntesis habitual), Cys-Gly (producto de síntesis habitual), Cys-Met (producto de síntesis habitual), Glu-Cys (producto de síntesis habitual), Gly-Cys (producto de síntesis habitual), Leu-Asp (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Val (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Glu (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Lys (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Gly-Gly (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Phe (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Ser (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Pro (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Arg (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Asp (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Met (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Thr (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-His (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Asn (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Gln (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Cys (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Val-Orn (producto de síntesis habitual),  $\gamma$ -Glu-Ser-Gly (producto de síntesis habitual), y  $\gamma$ -Glu-Pen-Gly (producto de síntesis habitual). La glutamina y la cisteína se preparan según su utilización, y las otras muestras se guardaron a -20°C después de su preparación. Se utilizaron los péptidos con una pureza del 90% o superior, excepto para  $\gamma$ -Glu-Cys, que fue del 80% o superior.

Después de disolver cada muestra en solución si el pH de ésta era ácido o alcalino, el pH de la solución se ajustó a un pH aproximadamente neutro, utilizando NaOH o HCl. La solución utilizada para disolver los aminoácidos y péptidos la preparación de los ovocitos de *Xenopus laevis*, y el cultivo de los ovocitos, tenían la composición siguiente: 96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7,2).

**Ejemplo 3. Síntesis de  $\gamma$ -Glu-Val-Gly**

5 Boc-Val-OH (8,69 g, 40,0 mmol) y Gly-OBzl·HCl (8,07 g, 40,0 mmol), se disolvieron en cloruro de metileno (100 ml), manteniéndose la solución a 0°C. Se añadieron trietilamina (6,13 ml, 44,0 mmol), HOBt (1-hidroxibenzotriazol, 6,74 g, 44,0 mmol) y WSC·HCl clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carboiimida, (8,44 g, 44,0 mmol) a la solución, agitándose la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. La solución reactiva se concentró bajo presión reducida, disolviéndose el residuo en acetato de etilo (200 ml). Se lavó la solución con agua (50 ml), con una solución acuosa saturada de ácido al 5% (50 ml x 2 veces), salmuera saturada (50 ml), con una solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% (50 ml x 2 veces), y otra vez con salmuera saturada (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, eliminándose mediante filtración, concentrándose el filtrado bajo presión reducida. El residuo se volvió a cristalizar a partir de acetato de etilo/n-hexano, para obtener Boc-Val-Gly-OBzl (13,2 g, 36,2 mmol) como un cristal blanco.

15 Se añadió Boc-Val-Gly-OBzl (5,47 g, 15,0 mmol) a una solución de 4 N HCl/dioxano (40 ml), agitándose la mezcla a temperatura ambiente durante 50 minutos. Se eliminó el dioxano mediante concentración bajo presión reducida, añadiéndose n-hexano 30 ml al residuo, concentrándose la mezcla bajo presión reducida. Se repitió el procedimiento 3 veces para obtener cuantitativamente H-Val-Gly-OBzl·HCl.

20 H-Val-Gly-OBzl·HCl y Z-Glu-OBzl (5,57 g, 15,0 mmol) anteriormente descritos, se disolvieron en cloruro de metileno (50 ml), manteniéndose la solución a 0°C. Se añadieron a la solución trietilamina (2,30 ml, 16,5 mmol), HOBt (1-hidroxibenzotriazol, 2,53 g, 16,5 mmol) y WSC·HCl (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, 3,16 g, 16,5 mmol), agitándose la solución a temperatura ambiente por la noche durante 2 días. La solución reactiva se concentró bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en acetato de etilo calentado (1500 ml). La solución se lavó con agua (200 ml), con solución acuosa de ácido cítrico al 5%, (200 ml x dos veces), salmuera saturada (150 ml), solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% (200 ml x 2 veces), y otra vez salmuera saturada. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, eliminándose éste mediante filtración, concentrándose el filtrado bajo presión reducida. El cristal precipitado se recuperó mediante filtración, secándose bajo presión reducida para obtener Z-Glu(Val-Gly-OBzl)-OBzl (6,51 g, 10,5 mmol), como un cristal blanco.

30 Z-Glu(Val-Gly-OBzl)-OBzl que se ha descrito antes (6,20 g, 10,03 mmol), se suspendió en etanol (200 ml), añadiendo a la suspensión paladio al 10%/carbono (1,50 g), llevándose a cabo una reacción reductora bajo atmósfera de hidrógeno a 55°C durante 5 horas. Durante la reacción, se añadieron gradualmente 100 ml en un volumen total acuoso. El catalizador se eliminó por filtración utilizando un embudo Kiriya (Kiriya glass Co.), concentrándose el filtrado bajo presión reducida en la mitad de un volumen. La solución reactiva se filtró posteriormente a través de un filtro de membrana, concentrándose el filtrado bajo presión reducida. Después de que se disolviera el residuo en un pequeño volumen de agua, se añadió etanol para precipitar un cristal, recuperándose éste mediante filtración y secado bajo presión reducida para obtener  $\gamma$ -Glu-Val-Gly como un polvo blanco (2,85 g, 9,40 mmol).

40 ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 304,1

45 <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 0,87 (3H, d, J= 6,8 Hz), 0,88 (3H, d, J= 6,8 Hz), 1,99-2,09 (3H, m), 2,38-2,51 (2H, m), 3,72 (1H, t, J= 6,35 Hz), 3,86 (1H, d, J= 17,8 Hz), 3,80 (1H, d, J= 17,8 Hz), 4,07 (1H, d, J= 6,8 Hz).

**Ejemplo 4. Síntesis de  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)-Gly[Cys(S-Me): S-metilcisteína]**

50 Se añadió glutatión reducido (15,0 g, 48,8 mmol) a agua (45 ml) e hidróxido sódico (4,52 g, 2,2 equivalentes, 107 mmol), añadiéndose una porción razonable a la mezcla, bajo burbujeo con nitrógeno. Se añadió yoduro de metilo (4,56 ml, 1,5 equivalentes, 73 mmol) a la mezcla precipitándose la solución y agitándose a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución reactiva se ajustó a un pH de 2 a 3 con ácido clorhídrico concentrado, suplementado con etanol (150 ml) y se guardó por la noche en una nevera. Ya que se separó un producto oleoso, se eliminó el sobrenadante. Cuando el producto oleoso que permanecía se disolvió en agua y se suplementó gradualmente con etanol, precipitó un producto oleoso parcialmente cristalizado. Entonces el sobrenadante se eliminó otra vez. Se disolvió en agua (300 ml) el residuo se absorbió a una columna rellena con una resina de intercambio iónico (Dowex 1-acetato, 400 ml), se lavó con agua, y entonces se eluyó con una solución acuosa de ácido acético 1 N. El eluado se concentró bajo presión reducida, y se precipitó de agua/etanol para obtener  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)-Gly como un polvo blanco (5,08 g, 15,8 mmol).

60 FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 322.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 2,14 (3H, s), 2,15-2,22 (2H, m), 2,50-2,58 (2H, m), 2,86 (1H, dd, J=9,0 Hz, J= 14,0 Hz), 3,03 (1H, dd, J=5,0 Hz, J=14,0 Hz), 3,84 (1H, t, J=6,5 Hz), 3,99 (2H, s), 4,59 (1H, dd, J=5,0 Hz, J=9,0 Hz).

**Ejemplo 5. Síntesis de otros péptidos**

5  $\gamma$ -Glu-Met(O),  $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -Glu-Val-ol,  $\gamma$ -Glu-Ser,  $\gamma$ -Glu-Tau,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O),  $\gamma$ -Glu-t-Leu,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-alilo)-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me),  $\gamma$ -Glu-Cle-Gly y  $\gamma$ -Glu-Aib-Gly se sintetizaron según los Ejemplos 3 y 4.

**Ejemplo 6. Síntesis de  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly**

10 Boc-t-Leu-OH (9,26 g, 40,0 mmol) y Gly-OBzl-HCl (8,06 g, 40,0 mmol) se disolvieron en cloruro de metileno (60 ml), manteniéndose la solución a 0°C. La Trietilamina (5,60 ml, 40,0 mmol), HOBt (1-hidroxibenzotriazol, 6,75 g, 44,0 mmol) y WSC-HCl clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 8,47 g, 44,0 mmol) se añadieron a la solución agitándose la mezcla por la noche a temperatura ambiente. La solución reaccionante se concentró bajo presión reducida, disolviéndose el residuo en acetato de etilo (200 ml). La solución se lavó con agua (50 ml), solución acuosa de ácido cítrico al 5% (50 ml x 2 veces), salmuera saturada (50 ml), solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% (50 ml x 2 veces), y otra vez salmuera saturada (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, eliminándose éste mediante filtración, concentrándose el filtrado bajo presión reducida. El residuo se volvió a cristalizar a partir del acetato de etilo/n-hexano para obtener Boc-t-Leu-Gly-OBzl (15,20 g, 40,1 mmol) como un producto aceitoso viscoso.

20 Se añadió Boc-t-Leu-Gly-OBzl (15,20 g, 40,1 mmol) a una solución de 4 N HCl/dioxano (200 ml), agitándose la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó el dioxano mediante concentración bajo presión reducida, y se añadió n-hexano (30 ml) al residuo, concentrándose la mezcla bajo presión reducida. Se repitió el procedimiento 3 veces para obtener cuantitativamente H-t-Leu-Gly-OBzl-HCl.

25 H-t-Leu-Gly-OBzl-HCl y Z-Glu-OBzl (14,93 g, 40,2 mmol) anteriormente descritos se disolvieron en cloruro de metileno (80 ml), manteniéndose la solución a 0°C. Se añadieron a la solución Trietilamina (5,60 ml, 40,2 mmol), HOBt (6,79 g, 44,2 mmol) y WSC-HCl (8,48 g, 44,2 mmol), agitándose la mezcla a temperatura ambiente por la noche durante 2 días. La solución reactiva se concentró bajo presión reducida, disolviéndose el residuo en acetato de etilo calentado (300 ml). La solución se lavó con agua (100 ml), solución acuosa de ácido cítrico al 5% (100 ml x 2 veces), salmuera saturada (100 ml), solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% (100 ml x 2 veces) y otra vez, salmuera saturada (100 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, eliminándose éste mediante filtración, y concentrándose el filtrado bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para obtener Z-Glu(t-Leu-Gly-OBzl)-OBzl (16,10 g, 25,5 mmol) como un producto aceitoso y viscoso.

35 Z-Glu(t-Leu-Gly-OBzl)-OBzl anteriormente descrito (16,10 g, 25,5 mmol), se suspendió en etanol (300 ml), añadiéndose a la suspensión carbono paladio al 10% (2,00 g), llevándose a cabo una reacción reductora bajo una atmósfera de hidrógeno a temperatura ambiente durante 5 horas. Durante la reacción, se añadieron gradualmente 100 ml en un volumen total de agua. Se eliminó el catalizador mediante filtración, utilizando un embudo Kiriyaama (Kiriyaama glass Co.), concentrándose el filtrado bajo presión reducida a la mitad del volumen. La solución reactiva se filtró ulteriormente a través de un filtro de membrana, concentrándose el filtrado bajo presión reducida. Después de que se disolviera el residuo en un pequeño volumen de agua se añadió etanol para precipitar un cristal, y éste se recuperó mediante filtración, y se liofilizó para obtener  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly como un polvo blanco (6,70 g, 21,1 mmol).

45 ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 318,10.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 0,95 (9H, s), 2,04-2,08 (2H, m), 2,45-2,48 (2H, m), 3,73 (1H, t), 3,87-3,90 (2H, m), 4,07 (1H, s).

**Ejemplo 7. Síntesis de  $\gamma$ -Glu-Abu-GlyA**

50 Boc-Abu-OH (6,10 g, 30,0 mmol) y glicolato de bencilo (H-GlyA-OBzl, 4,39 g, 30,0 mmol) se disolvieron en cloruro de metileno (40 ml), manteniéndose la solución a 0°C. A la solución se añadieron DMAP (4-dimetilaminopiridina, 1,10 g, 9,0 mmol), y WSC-HCl (6,33 g, 33,0 mmol), agitándose la mezcla por la noche a temperatura ambiente. La solución reactiva se concentró bajo presión reducida, disolviéndose el residuo en acetato de etilo (150 ml). Se lavó con agua la solución (50 ml), solución acuosa de ácido cítrico, al 5% (50 ml x dos veces), salmuera saturada (50 ml), solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% (50 ml x dos veces), y, otra vez, salmuera saturada (50 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, eliminándose el sulfato magnésico mediante filtración, y concentrándose éste bajo presión reducida, para obtener Boc-Abu-GlyA-OBzl (9,47 g, 28,1 mmol) como un producto oleoso y viscoso.

60 Al residuo antes mencionado, se añadió una solución de 4 N HCl/dioxano (141 ml), agitándose la mezcla durante una hora a temperatura ambiente. El dioxano se eliminó mediante concentración bajo presión reducida. Se añadió al residuo n-hexano (30 ml), concentrándose la mezcla bajo presión reducida. Se repitió 3 veces el procedimiento para obtener H-Abu-GlyA-OBzl-HCl cuantitativamente.

65 H-Abu-GlyA-OBzl-HCl y Z-Glu-OBzl (10,47 g, 28,1 mmol) anteriormente descritos se disolvieron en cloruro de

- metileno (100 ml), manteniéndose la solución a 0°C. Se añadieron a la solución trietilamina (4,30 ml, 30,9 mmol), HOBt (4,74 g, 30,9 mmol) y WSC·HCl (5,95 g, 30,9 mmol), agitándose la mezcla a temperatura ambiente por la noche, durante 2 días. Se concentró la solución reactiva bajo presión reducida, disolviéndose el residuo en acetato de etilo (200 ml). Se lavó la solución con agua (50 ml), solución acuosa de ácido al 5% (150 ml x dos veces), salmuera saturada (50 ml), solución acuosa de bicarbonato sódico al 5% (50 ml x dos veces), y, otra vez, salmuera saturada (50 ml). Se secó la capa orgánica sobre sulfato magnésico anhidro, eliminándose éste mediante filtración, concentrándose el filtrado bajo presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice, para obtener Z-Glu(Abu-GlyA-OBzl)-OBzl (11,20 g, 19,0 mmol) como un producto oleoso y viscoso.
- 10 Z-Glu(Abu-GlyA-OBzl)-OBzl (11,20 g, 19,0 mmol) descrito anteriormente se suspendió en etanol (150 ml) añadiéndose a la suspensión carbono paladio al 10%, (2,00 g), realizando una reacción reductora bajo atmósfera de hidrógeno, a temperatura ambiente durante 5 horas. Durante la reacción se añadieron gradualmente 50 ml en un volumen total de agua. Se eliminó el catalizador mediante filtración utilizando un embudo Kiriya (Kiriya glass Co.), concentrándose el filtrado bajo presión reducida hasta la mitad del volumen. La solución reactiva se filtró
- 15 posteriormente mediante un filtro de membrana, concentrándose el filtrado bajo presión reducida. Se disolvió el residuo en agua, liofilizándose para obtener  $\gamma$ -Glu-Abu-GlyA (5,00 g, 17,2 mmol) como un polvo blanco.

ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 291,10.

- 20 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 0,86 (3H, t, J=7,40 Hz), 1,60-1,74 (1H, m), 1,82-1,88 (1H, m), 2,04-2,12 (1H, m), 2,45 (2H, t, J=7,40 Hz), 3,79 (1H, t, J=6,36 Hz), 4,31-4,45 (1H, m), 4,57 (2H, s).

#### Ejemplo 8. Síntesis de $\gamma$ -Glu-Val-GlyA

- 25  $\gamma$ -Glu-Val-GlyA se obtuvo como un polvo blanco con un rendimiento del 77,5%, de la misma forma que en el Ejemplo 7, excepto porque Boc-Val-OH se utilizó en vez de Boc-Abu-OH.

ESI-MS: (M-H)<sup>-</sup> = 303,20.

- 30 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 0,90 (6H, t, J=6,52 Hz), 2,05-2,15 (2H, m), 2,15-2,25 (1H, m), 2,45-2,50 (2H, m), 3,80 (1H, t, J=6,52 Hz), 4,36 (1H, t, J=5,64 Hz), 4,61 (2H, s).

#### Ejemplo 9. Síntesis de $\gamma$ -Glu-t-Leu-GlyA

- 35  $\gamma$ -Glu-t-Leu-GlyA se obtuvo como un polvo blanco, con un rendimiento del 73,4%, de la misma forma que en el Ejemplo 7, excepto porque Boc-t-Leu-OH se utilizó en lugar de Boc-Abu-OH.

ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 319,20.

- 40 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 0,94 (9H, s), 2,03-2,10 (2H, m), 2,45-2,50 (2H, m), 3,78 (1H, t), 4,26 (1H, s), 4,60 (2H, s).

#### Ejemplo 10. Síntesis de $\gamma$ -Glu-Abu-LacA

- 45 Se obtuvo  $\gamma$ -Glu-Abu-LacA como un polvo blanco con un rendimiento del 99,0% de la misma forma que en el Ejemplo 7, excepto porque se utilizó bencil (S)-lactato (H-LacA-OBzl) en lugar de glicolato de bencilo (H-GlyA-OBzl).

ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 305,10.

- 50 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 0,91 (3H, t, J=7,40 Hz), 1,40 (3H, d, J=7,08 Hz), 1,60-1,75 (1H, m), 1,80-1,90 (1H, m), 2,00-2,12 (2H, m), 2,40-2,45 (2H, m), 3,74-3,78 (1H, m), 4,25-4,29 (1H, m), 4,89-4,95 (1H, m).

#### Ejemplo 11. Síntesis de $\gamma$ -Glu-Val-LacA

- 55 Se obtuvo  $\gamma$ -Glu-Val-LacA como un polvo blanco, con un rendimiento del 78,0%, de la misma forma que en el Ejemplo 7, excepto porque Boc-Val-OH se utilizó en vez de Boc-Abu-OH, y bencil (S)-lactato (H-LacA-OBzl) se utilizó en lugar de glicolato de bencilo (H-GlyA-OBzl).

ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup> = 319,20.

- 60 <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 0,85-0,92 (6H, m), 1,42 (3H, d, J=7,08 Hz), 2,02-2,11 (3H, m), 2,18-2,25 (1H, m), 2,42-2,50 (2H, m), 3,78 (1H, t, J=6,36 Hz), 4,20-4,31 (1H, m), 4,91-4,97 (1H, m).

#### Ejemplo 12. Síntesis de $\gamma$ -Glu-t-Leu-LacA

- 65  $\gamma$ -Glu-t-Leu-LacA se obtuvo como un polvo blanco, con un rendimiento del 55,0% de la misma forma que en el

Ejemplo 7, excepto porque Boc-t-Leu-OH se utilizó en lugar de Boc-Abu-OH y bencil-(S)-lactato (H-LacA-OBzl), en lugar de glicolato de bencilo (H-GlyA-OBzl).

ESI-MS: (M+H)<sup>+</sup>= 333,20

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 0,96 (9H, s), 1,42 (3H, d, J=7,08 Hz), 2,05-2,10 (2H, m), 2,40-2,50 (2H, m), 3,73-3,78 (1H, m), 4,19 (1H, s), 4,90-5,00 (1H, m).

### Ejemplo 13. Evaluación de la acción activadora del receptor cálcico.

Para la evaluación de la acción activadora del receptor cálcico, se utilizó un procedimiento para medir una corriente iónica de Cl dependiente de la concentración de iones cálcicos, utilizando un sistema de expresión de los ovocitos de *Xenopus laevis*. Si cada activador se añade a los ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el receptor cálcico, los iones Ca intracelulares aumentan. Entonces, el canal de Cl dependiente de la concentración de los iones de calcio, se abre, y los valores de la corriente intracelular, cambian como una corriente iónica. Midiendo el cambio en los valores intracelulares de la corriente, puede determinarse si la acción activadora del receptor cálcico se encuentra presente o no.

Específicamente, se abrió el abdomen de *Xenopus laevis*, tomándose una muestra de los huevos y tratándose entonces con una solución de colagenasa al 1% a 20°C durante 2 horas, para obtener los ovocitos individuales. Utilizando un microcapilar de vidrio se inyectó 50 nl de un ARNc receptor de 1 µg/µl o 50 nl de agua esterilizada por ovocitos y los ovocitos se cultivaron a 18°C durante 2 o 3 días. Para el cultivo, se utilizó una solución obtenida añadiendo 2 mM de ácido pirúvico 10 U/ml de penicilina, y 10 µg/ml de estreptomycin a la solución en el Ejemplo 2. Después del cultivo, se añadió una solución de prueba al ovocito inyectado con ARN o agua esterilizada. Se llevaron a cabo mediciones electrofisiológicas utilizando un amplificador Geneclamp 500 (fabricado por Axon) y un programa AxoScope 9,0 de registro fabricado por Axon). Los ovocitos fueron pinzados con un potencial de membrana a -70 mV mediante el procedimiento de pinzamiento doble del potencial de electrodo, midiéndose la corriente intracelular mediante el canal iónico de Cl dependiente de la concentración del ion de calcio. El valor máximo de la corriente intracelular se definió como el valor de la corriente de respuesta.

### Ejemplo 14. Evaluación de la acción del calcio activadora del receptor cálcico

La acción activadora del receptor cálcico se evaluó utilizando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 13. Es decir, se prepararon ovocitos a los que se inyectó ARNc del receptor cálcico, o agua esterilizada, pinzándose un potencial de membrana de -70 mV mediante el procedimiento de doble pinzamiento del potencial de electrodo. A los ovocitos en los que se había pinzado el potencial, se añadió calcio (2 mM, 5 mM, 10 mM, y 20 mM, midiéndose la corriente de la respuesta de Cl, dependiente de la concentración del ion Ca. La figura 1 muestra los resultados. Estos confirmaron que ARNc del receptor cálcico que se había inyectado en los ovocitos, se expresaba funcionalmente. Además, ya que los ovocitos que se inyectaron con agua, no respondiesen a incluso una concentración alta de calcio. Se confirmó que el receptor cálcico, no se expresaba en los mismos ovocitos.

### Ejemplo 15. Evaluación de la acción activadora del receptor cálcico de los L-aminoácidos

La acción activadora del receptor cálcico de los L-aminoácidos, se evaluó utilizando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 13. Es decir, se prepararon ovocitos inyectados con ARNc del receptor cálcico o con agua esterilizada, pinzándose el potencial de membrana a -70 mV, mediante el procedimiento de pinzamiento doble del potencial de electrodo. A los ovocitos a los que se había pinchado con el potencial, se añadieron alanina (10 mM), arginina (10 mM), asparagina (10 mM, ácido aspártico (10 mM), cisteína (10 mM), glutamina (10 mM), ácido glutámico (10 mM), glicina (10 mM), histidina (10 mM), isoleucina (10 mM), leucina (10 mM), lisina (10 mM), metionina (10 mM), fenilalanina (10 mM), prolina (10 mM), serina (10 mM), teocina (10 mM), triptofano (10 mM), tirosina (10 mM), valina (10 mM), ornitina (10 mM), taurina (10 mM), o hidroxiprolina (10 mM), midiéndose las corrientes respuesta Cl dependientes de la concentración de iones Ca. La figura 2 muestra los resultados. Estos demostraron que la cisteína histidina, fenilalanina, triptofano y tirosina, tienen cada uno una acción activadora del receptor cálcico definido. Como para los aminoácidos anteriormente descritos, la acción activadora se informa en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 25 abr., 2000, 97(9): 4814-9.

### Ejemplo 16. Evaluación de la acción activadora de la D-cisteína sobre el receptor cálcico

La acción activadora sobre el receptor del calcio de la D-cisteína se evaluó utilizando el procedimiento que se describe en el Ejemplo 13. Es decir, los ovocitos inyectados con ARNc del receptor cálcico, o agua esterilizada, se prepararon, pinzándose el potencial de membrana a -70 mV, mediante el procedimiento de pinzamiento doble del potencial de electrodo. A los ovocitos pinzados con el potencial, se añadieron D-cisteína (10 mM), L-cisteína (10 mM), D-triptófano (10 mM), o L-triptófano (10 mM), midiéndose la corriente de respuesta de Cl, dependiente de la concentración de los iones de Ca. La figura 3 muestra los resultados. Estos demostraron que la D-cisteína mostraba una acción activadora definida del receptor cálcico.

**Ejemplo 17. Evaluación de la acción peptídica activadora del receptor cálcico**

La acción activadora del receptor cálcico, de un péptido, se evaluó utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 13. Es decir, se prepararon ovocitos a los que se inyectó ARNc del receptor cálcico, o agua esterilizada, pinzando el potencial de membrana a -70 mV mediante el procedimiento doble de pinzado del potencial del electrodo. A los ovocitos en los que se pinzó el potencial, se añadieron  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Cys(SNO)-Gly (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Ala (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Gly (500  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Cys (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Met (500  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Thr (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Val (50  $\mu$ M),  $\gamma$ -Glu-Orn (500  $\mu$ M), Asp-Gly (1 mM), Cys-Gly (1 mM), Cys-Met (1 mM), Glu-Cys (50  $\mu$ M), Gly-Cys (500  $\mu$ M) o Leu-Asp (1 mM), midiéndose la corriente de respuesta del CI dependiente de la concentración del ion de Ca. En la figura 4 se muestran los resultados, que demostraron que el péptido descrito anteriormente poseía una acción definida activadora del receptor cálcico.

**Ejemplo 18. Evaluación de la acción peptídica de activación del receptor cálcico**

La acción activadora del receptor cálcico, de un péptido, se evaluó de la misma forma que la del Ejemplo 17. Cada uno de los péptidos que se muestran en la Tabla 1, se añadió a los ovocitos en los que se había pinzado el potencial a 1000  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M y 0,1  $\mu$ M, midiéndose la corriente de respuesta de CI dependiente de la concentración del ion Ca. La concentración más baja a la que se detectó la corriente se muestra en la Tabla 1 como "actividad". Los resultados revelaron que cada uno de los 32 tipos de péptido tenía una acción activadora del receptor de calcio.

TABLA 1

Número	Péptido	Actividad
1	$\gamma$ -Glu-Met(O)	1000 $\mu$ M
2	$\gamma$ -Glu-Val-Val	1000 $\mu$ M
3	$\gamma$ -Glu-Val-Glu	1000 $\mu$ M
4	$\gamma$ -Glu-Val-Lys	1000 $\mu$ M
5	$\gamma$ -Glu-Val-Arg	1000 $\mu$ M
6	$\gamma$ -Glu-Val-Asp	1000 $\mu$ M
7	$\gamma$ -Glu-Val-Met	1000 $\mu$ M
8	$\gamma$ -Glu-Val-Thr	1000 $\mu$ M
9	$\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val	1000 $\mu$ M
10	$\gamma$ -Glu-Val-NH <sub>2</sub>	1000 $\mu$ M
11	$\gamma$ -Glu-Val-ol	1000 $\mu$ M
12	$\gamma$ -Glu-Ser	300 $\mu$ M
13	$\gamma$ -Glu-Tau	300 $\mu$ M
14	$\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O)	300 $\mu$ M
15	$\gamma$ -Glu-Val-His	100 $\mu$ M
16	$\gamma$ -Glu-Val-Orn	100 $\mu$ M
17	$\gamma$ -Glu-Leu	100 $\mu$ M
18	$\gamma$ -Glu-Ile	100 $\mu$ M
19	$\gamma$ -Glu-t-Leu	100 $\mu$ M
20	$\gamma$ -Glu-Cys(S-alilo)-Gly	100 $\mu$ M
21	$\gamma$ -Glu-Val-Asn	30 $\mu$ M
22	$\gamma$ -Glu-Gly-Gly	30 $\mu$ M
23	$\gamma$ -Glu-Val-Phe	30 $\mu$ M
24	$\gamma$ -Glu-Val-Ser	30 $\mu$ M
25	$\gamma$ -Glu-Val-Pro	30 $\mu$ M
26	$\gamma$ -Glu-Ser-Gly	30 $\mu$ M
27	$\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)	30 $\mu$ M
28	$\gamma$ -Glu-Val-Cys	10 $\mu$ M
29	$\gamma$ -Glu-Val-Gln	10 $\mu$ M
30	$\gamma$ -Glu-Abu-Gly	3 $\mu$ M
31	$\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)-Gly	3 $\mu$ M
32	$\gamma$ -Glu-Val-Gly	0,1 $\mu$ M

**Ejemplo 19. Efecto terapéutico del péptido sobre la diarrea que posee una acción activadora del receptor cálcico, para el modelo de diarrea inducida por el agente anticáncer**

A cada uno de los ratones Balb/c, se administró un agente anticáncer para inducir la diarrea, estudiándose el efecto inhibitorio sobre diarrea de  $\gamma$ -Glu-Val-Gly (al que en lo sucesivo se hace referencia como " $\gamma$ EVG"). A cada uno de los ratones Balb/c de 6 semanas de edad, que se había alimentado con una dieta de nutrientes proteicos (caseína al 4%) durante una semana, se le administró intraperitonealmente durante 3 días consecutivos 5-FU (1 mg/animal/día).

Los síntomas diarreicos se desarrollaron alrededor del 5º día después de la tercera administración del agente anticáncer, apareciendo los síntomas de la diarrea, en todos los casos, en el día 7. La presencia o ausencia de diarrea, se determinó basándose en la presencia o ausencia de la unión de las heces en el área cefálica de la cola. Como prueba estadística, se utilizó una de "ji-cuadrado" ( $\chi^2$ ) para el grupo de control (presencia o ausencia de diarrea) considerándose como significativo un resultado de  $p < 0,05$ .

Cada administración de  $\gamma$ EVG al 0,01%, se empezó con la ingesta libre de agua a la vez que la primera administración del agente anticáncer, y se continuó hasta la finalización del experimento.

Todos los ratones (10/10) mostraron los síntomas diarreicos en el grupo de control, mientras que 2 de 5 animales no exhibieron esos síntomas en el grupo al que se había administrado  $\gamma$ EVG al 0,01%. Estos resultados indican que  $\gamma$ EVG posee un efecto terapéutico significativo sobre la diarrea, en el modelo diarreico inducido por el agente anticáncer.

TABLA 2

Efecto de la administración de  $\gamma$ EVG sobre el modelo diarreico murino

Medicamento	Proporción de individuos que desarrollaron diarrea
Grupo control	10/10
$\gamma$ EVG al 0,01%	3/5*

\*  $p < 0,05$  (prueba de "ji-cuadrado")

**Ejemplo 20. Efecto terapéutico sobre la diarrea del péptido que tiene una acción activadora del receptor cálcico en el modelo de defecación murina inducida por 5-HTP**

Se utilizaron ratones machos ICR (de 5 semanas de edad). A cada uno de ellos, se administró oralmente  $\gamma$ EVG, que se había disuelto en una solución acuosa de carboximetilcelulosa al 0,5% y después de 1 hora, se administró subcutáneamente 5-HTP (5-hidroxi-triptófano, 10 mg/Kg y 5 ml/Kg). Después de 30 minutos, se evaluó el índice de formación de las heces (0: normal, o sin heces, y 1: diarrea o heces líquidas). Como control, a cada uno de los animales se administró un vehículo (solución acuosa de carboximetilcelulosa al 0,5%) libre de medicamento.

Se preparó  $\gamma$ EVG, de forma que las concentraciones fueran del 1% y del 0,1% (peso/vol, que se interpretan con idéntico significado).

Como prueba estadística, se utilizó una de ji-cuadrado ( $\chi^2$ ) para el grupo de administración del vehículo (presencia o ausencia de diarrea y de heces líquidas), considerándose como significativo  $p < 0,05$ .

La figura 5 muestra los resultados. El índice de la forma de las heces del grupo de administración del vehículo aumentó significativamente comparado con el de un grupo sano. La administración de  $\gamma$ EVG al 0,1 o al 1%, mejoró el índice de forma de las heces de manera dependiente de la dosis. Además, el  $\gamma$ EVG al 1%, mejoró significativamente la diarrea.

**Ejemplo 21. Influencia del activador CaSR sobre la absorción líquida en el procedimiento del asa del intestino grueso de la rata**

<Procedimiento>

El ciego y el intestino grueso se extirparon del abdomen de cada una de las ratas macho SD (IGS) bajo anestesia con pentobarbital, y el sitio que se encontraba 5 cm del área, justo por debajo del ciego, se unió, para formar una gran asa del intestino grueso. Inmediatamente después de que se formara el asa intestinal, se administró intraperitonealmente PGE2 (4  $\mu$ g/ml/Kg, SIGMA) y después de 30 minutos, un medicamento, que se había disuelto en 2 ml de solución de Tyrode (NaCl: 136,9 mM, KCl: 2,7 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 1,8 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 1,04 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,04 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,04 mM, glucosa: 5,55 mM,  $\text{NaHCO}_3$ : 11,9 mM), se inyectó en el asa intestinal que se había preparado (la solución medicamentosa se ajustó de forma que el pH llegara a ser de entre el 6,5 y el 7,5). Como un control, se administró la solución de Tyrode libre de cualquier medicamento (vehículo). Después de 1 hora, el peso del asa, su peso después de la eliminación de la solución, y el área del asa se midieron para calcular un peso de la solución por área unitaria que permaneciera en el asa intestinal.

La cantidad de solución que estaba todavía presente por área unitaria, se calculó con la ecuación siguiente:

Cantidad de solución que permanecía por área unitaria ( $\text{g/cm}^3$ ) = (Peso del asa intestinal - Peso del asa intestinal después de la retirada de la solución) / área del asa.

La absorción del líquido se evaluó calculando una proporción inhibitoria a partir de la ecuación siguiente:



Proporción inhibitoria (%)= 100-(cantidad que permanece de la solución por área unitaria bajo administración del medicamento-cantidad solución que permanece por área unitaria en la base (promedio)/(Cantidad de solución que permanece por área unitaria bajo administración del vehículo (promedio)-Cantidad de solución que permanece por área unitaria en base (promedio))x100.

(Base= caso en el que no se da estimulación (no tratamiento con PGE2)).

Las figuras 6 a 8 muestran los resultados  $\gamma$ EVG promovió la absorción del líquido de forma dependiente de la dosis. Además, GSH  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly y cinacalcet también promovieron la absorción del líquido. Así, se encontró que la absorción del líquido promovida por aquellos grupos de compuestos proporcionaron un efecto inhibitorio sobre la diarrea.

**Ejemplo 22. Efecto inhibitorio de la diarrea, del activador del receptor cálcico para el modelo de diarrea inducido por un agente anticáncer**

Para cada ratón Balb/c, se administró un agente anticáncer para inducir diarrea; y se estudió un activador del receptor cálcico al que en lo sucesivo se hará referencia como “agonista CaSR” con respecto a su efecto inhibitorio sobre la diarrea. A cada uno de ratones Balb/c de 6 semanas de edad, alimentados con una dieta nutritiva baja en proteínas (dieta de caseína al 4%) durante una semana, se administró intraperitonealmente 5-FU (1 mg/animal/día) durante 3 días consecutivos. Los síntomas diarreicos se desarrollaron alrededor del día 5, después de la tercera administración del agente anticáncer, apareciendo los síntomas diarreicos en todos los casos en el día 7. La presencia o ausencia de la diarrea se determinó basándose en la presencia o ausencia de la unión de las heces al área cefálica de la cola. Como prueba estadística, se llevó a cabo una “ji-cuadrado” ( $\chi^2$ ) para el grupo de control (presencia o ausencia de diarrea), considerándose  $p < 0,05$  como significativa.

La administración del agonista CaSR empezó con la ingesta de agua libre, al mismo tiempo que la administración de la dieta nutritiva baja en proteínas, y continuó hasta que el experimento finalizó.

Todos (9/9) los ratones exhibieron los síntomas diarreicos en el grupo de control, mientras 2 de los 5 ratones no mostraron esos síntomas, tanto en el grupo al que se administró cinacalcet al 0,05% como en el que recibió  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly al 0,5%. Estos resultados indican que el agonista CaSR posee un significativo efecto inhibitorio sobre la diarrea en el modelo de ésta inducido por el agente anticáncer.

TABLA 3

Medicamento	Proporción de individuos que desarrollaron diarrea
Grupo control	9/9
Cinacalcet al 0,05%	3/5*
$\gamma$ -Glu-Cys-Gly al 0,5%	3/5*

\*  $p < 0,05$   $\chi^2$  para el grupo de control (presencia o ausencia de diarrea).

**Ejemplo 23. Medición de la actividad del péptido agonista CaSR**

Varios péptidos que se sintetizaron en el Ejemplo 2 y en los 6 al 10; se midieron con respecto a sus actividades, de la forma siguiente. Al ADNc del CaSR humano obtenido mediante el procedimiento que se describe en el Ejemplo 1 del documento de patente WO 2007/055393A1, se incorporó a un vector de expresión para las células animales que tenían un promotor CMV, introduciéndose el gen en las células HEK 293 que crecieron hasta el 70% de la máxima densidad celular, utilizando FuGINE 6 (F. Hoffmann-La Roche, Ltd.). Después del cultivo de entre 4 a 48 horas, las células se sembraron en una placa de 96 pocillos, en una cantidad de 0,6 a 1,0 x 10<sup>5</sup> células/pocillo, y se cultivaron durante 1 día. Después de esto, se tiñeron con un equipo de ensayo de “Calcio 3”. La presencia o ausencia de la actividad del péptido agonista CaSR, se confirmó mediante un procedimiento de imagen cálcica utilizando FLEXSTATION (Manual de instrucciones de MDS Inc.). Además, la concentración que proporciona el 50% de la máxima actividad, se determinó como EC50 a partir de una curva característica de dosis.

TABLA 4

Compuestos	EC50, $\mu$ M
$\gamma$ -Glu-Val-Gly	0,023-0,055
$\gamma$ -Glu-Cle-Gly	0,5-1,5
$\gamma$ -Glu-Aib-Gly	0,349-1,167
$\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly	0,043-0,077
$\gamma$ -Glu-Pen-Gly	0,159-0,233
$\gamma$ -Glu-Val-GlyA	0,14

γ-Glu-t-Leu-GlyA	0,05
γ-Glu-Abu-GlyA	0,065-0,079
γ-Glu-Val-LacA	0,057
γ-Glu-t-Leu-LacA	0,038
γ-Glu-Abu-LacA	0,102
* El valor experimental que incluye sólo un valor numérico, indica un valor con n= 1, y los otros valores experimentales indican un abanico de valores con n= 2 a 3	

**Aplicabilidad industrial**

5 La presente invención proporciona un agente profiláctico o terapéutico para la diarrea, que es muy seguro para el organismo.

**Listado de secuencias**

10 <110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> AGENTE PROFILÁCTICO O TERAPÉUTICO PARA LA DIARREA

<130> EPA-64832

15 <150> JP2007-123765

<151> 2007-05-08

<160> 2

20 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 49

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> cebador hCASR\_N

30 <400> 1

actaatacga ctactatag ggaccatggc atttatagc tgctgctgg

49

35 <210> 2

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> cebador HCASR\_C

<400> 2

45 ttatgaattc actacgtttt ctgtaacag

29

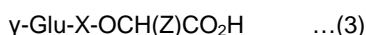
## REIVINDICACIONES

1. Agente, que comprende un compuesto que posee una acción activadora del receptor cálcico para su utilización en un procedimiento destinado al tratamiento profiláctico o terapéutico de la diarrea,

5 en el que el compuesto se selecciona de entre un péptido o un derivado peptídico,

10 en el que el péptido es de un tipo o de dos, o más, seleccionados de entre el grupo constituido por  $\gamma$ -Glu-X-Gly (X representa un aminoácido o un derivado de aminoácido),  $\gamma$ -Glu-Val-Y (Y representa un aminoácido o un derivado de aminoácido),  $\gamma$ -Glu-Ala,  $\gamma$ -Glu-Gly,  $\gamma$ -Glu-Cys,  $\gamma$ -Glu-Met,  $\gamma$ -Glu-Thr,  $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Glu-Orn, Asp-Gly, Cys-Gly, Cys-Met, Glu-Cys, Gly-Cys, Leu-Asp,  $\gamma$ -Glu-Met(O),  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu-Val,  $\gamma$ -Glu-Val-NH<sub>2</sub>,  $\gamma$ -Glu-Val-ol,  $\gamma$ -Glu-Ser,  $\gamma$ -Glu-Tau,  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me)(O),  $\gamma$ -Glu-Leu,  $\gamma$ -Glu-Ile,  $\gamma$ -Glu-t-Leu, y  $\gamma$ -Glu-Cys(S-Me), y

15 en el que el derivado peptídico presenta una estructura de la fórmula siguiente (3):

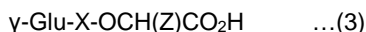


en el que X representa un aminoácido o un derivado de aminoácido y Z representa H o CH<sub>3</sub>.

20 2. Agente para la utilización según la reivindicación 1, en el que X representa Cys(SNO), Cys(S-alilo), Gly, Cys(S-Me), Cys, Abu, t-Leu, Cle, Aib, Pen o Ser, e Y representa Gly, Val, Glu, Lys, Phe, Ser, Pro, Arg, Asp, Met, Thr, His, Orn, Asn, Cys o Gln.

25 3. Agente para la utilización según la reivindicación 1 o 2, en el que el péptido es  $\gamma$ -Glu-Val-Gly o  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly.

4. Compuesto, que presenta una estructura de la fórmula siguiente (3):



30 en el que X representa un aminoácido o un derivado de aminoácido, y Z representa CH<sub>3</sub>; o

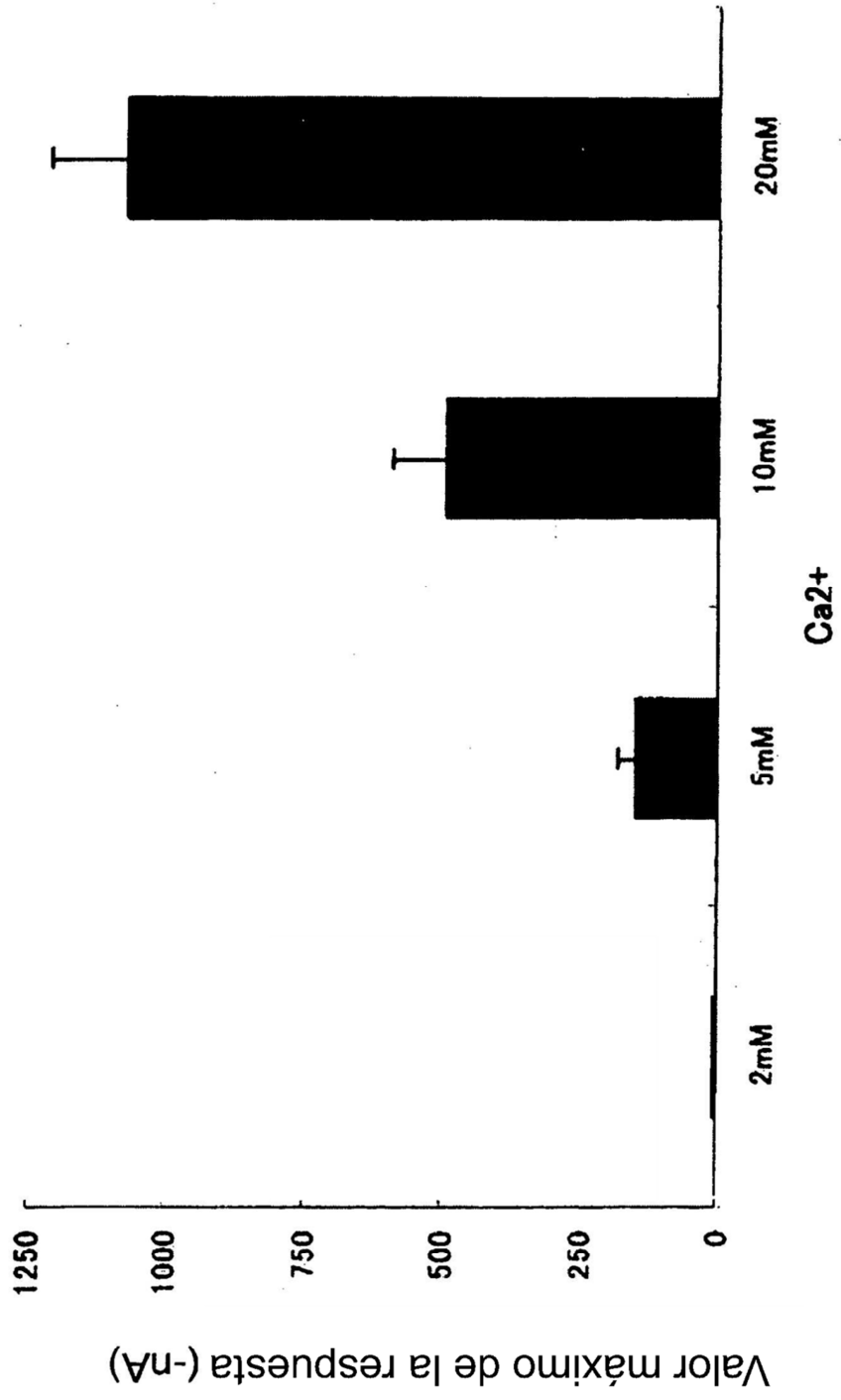
en el que X representa t-Leu o Abu y Z representa H.

35 5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que X representa t-Leu o Abu y Z representa CH<sub>3</sub>.

6. Compuesto según la reivindicación 4 o 5, que se selecciona de entre el grupo constituido por  $\gamma$ -Glu-Val-GlyA,  $\gamma$ -Glu-t-Leu-GlyA,  $\gamma$ -Glu-Abu-GlyA,  $\gamma$ -Glu-Val-LacA,  $\gamma$ -Glu-t-Leu-LacA, y  $\gamma$ -Glu-Abu-LacA.

40 7. Compuesto, que está representado por  $\gamma$ -Glu-t-Leu-Gly.

Fig.1



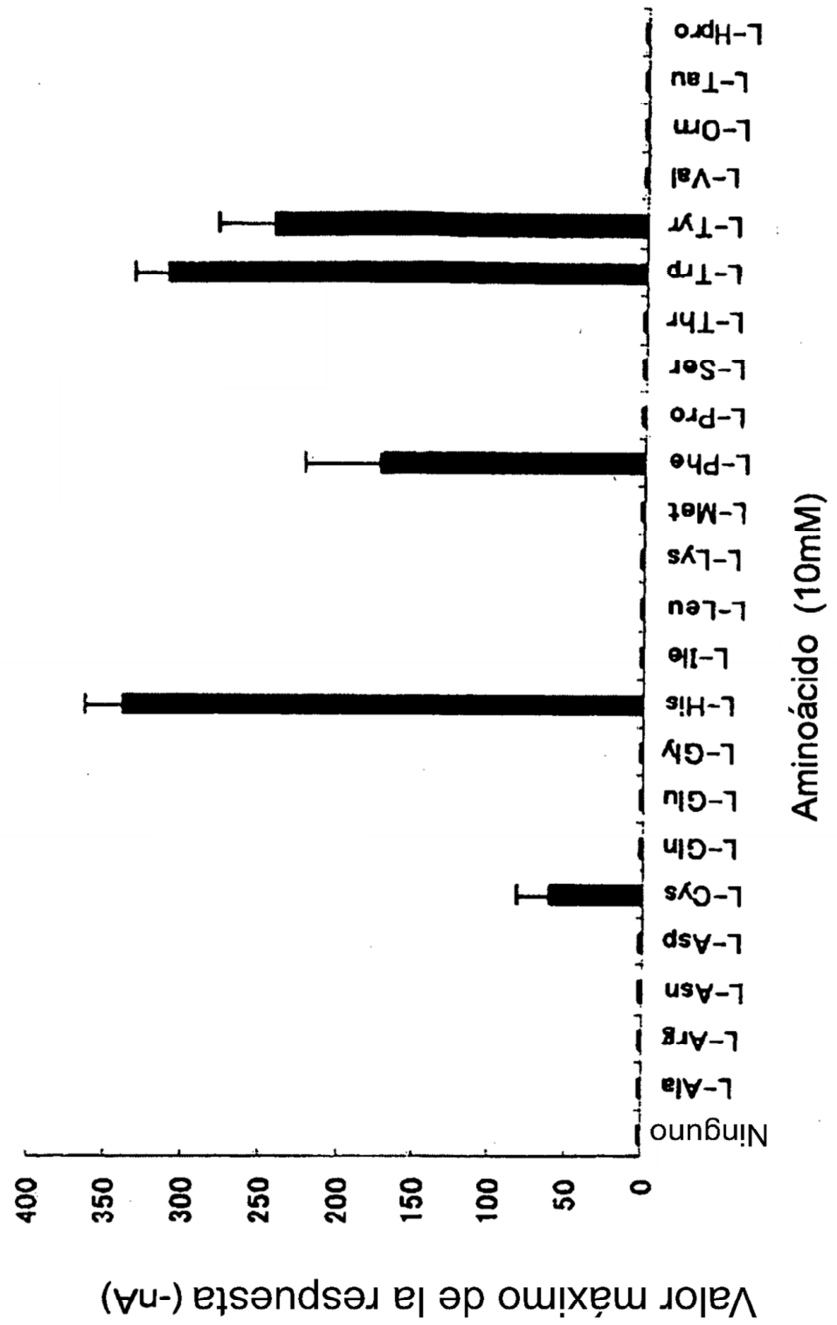


Fig.2

Fig.3

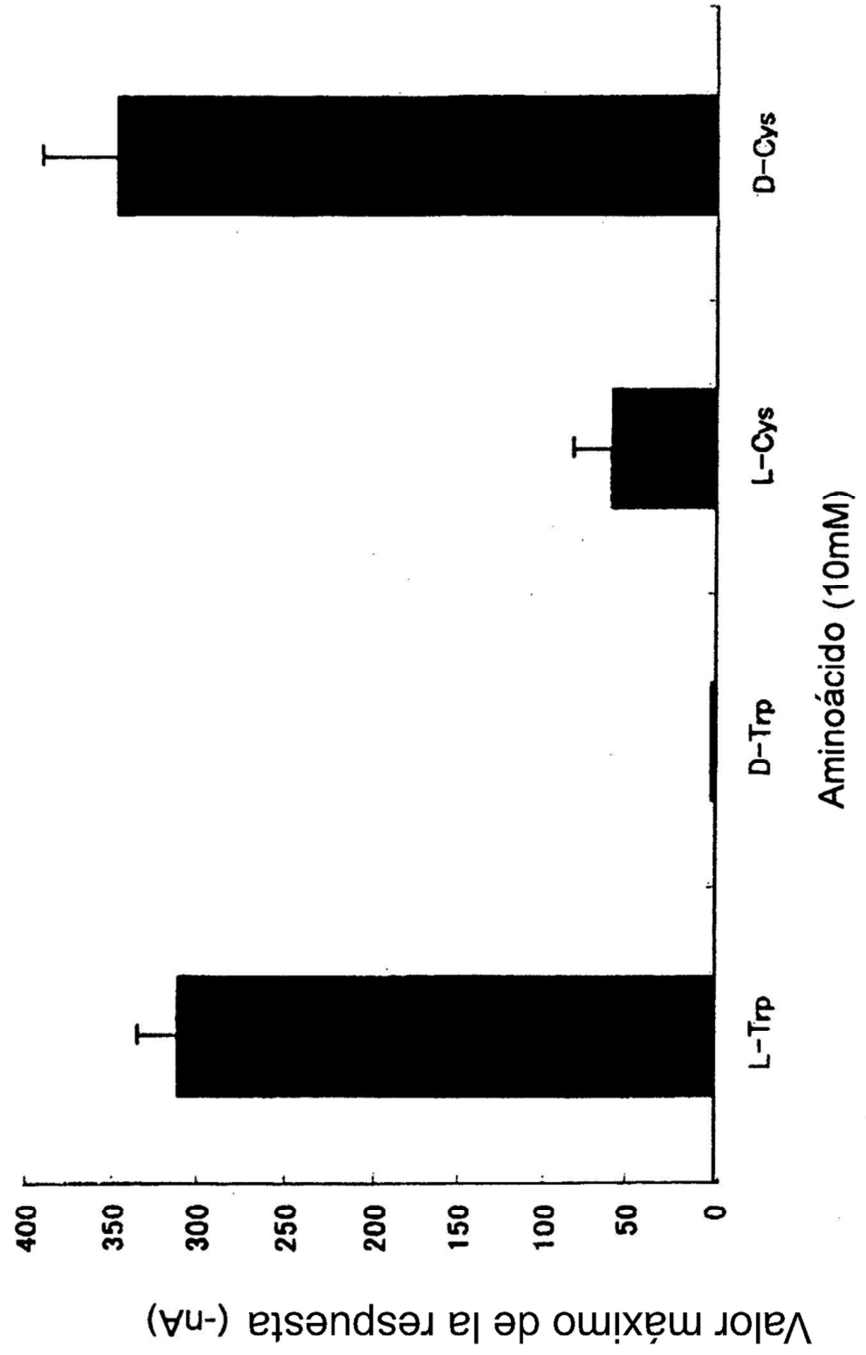


Fig.4

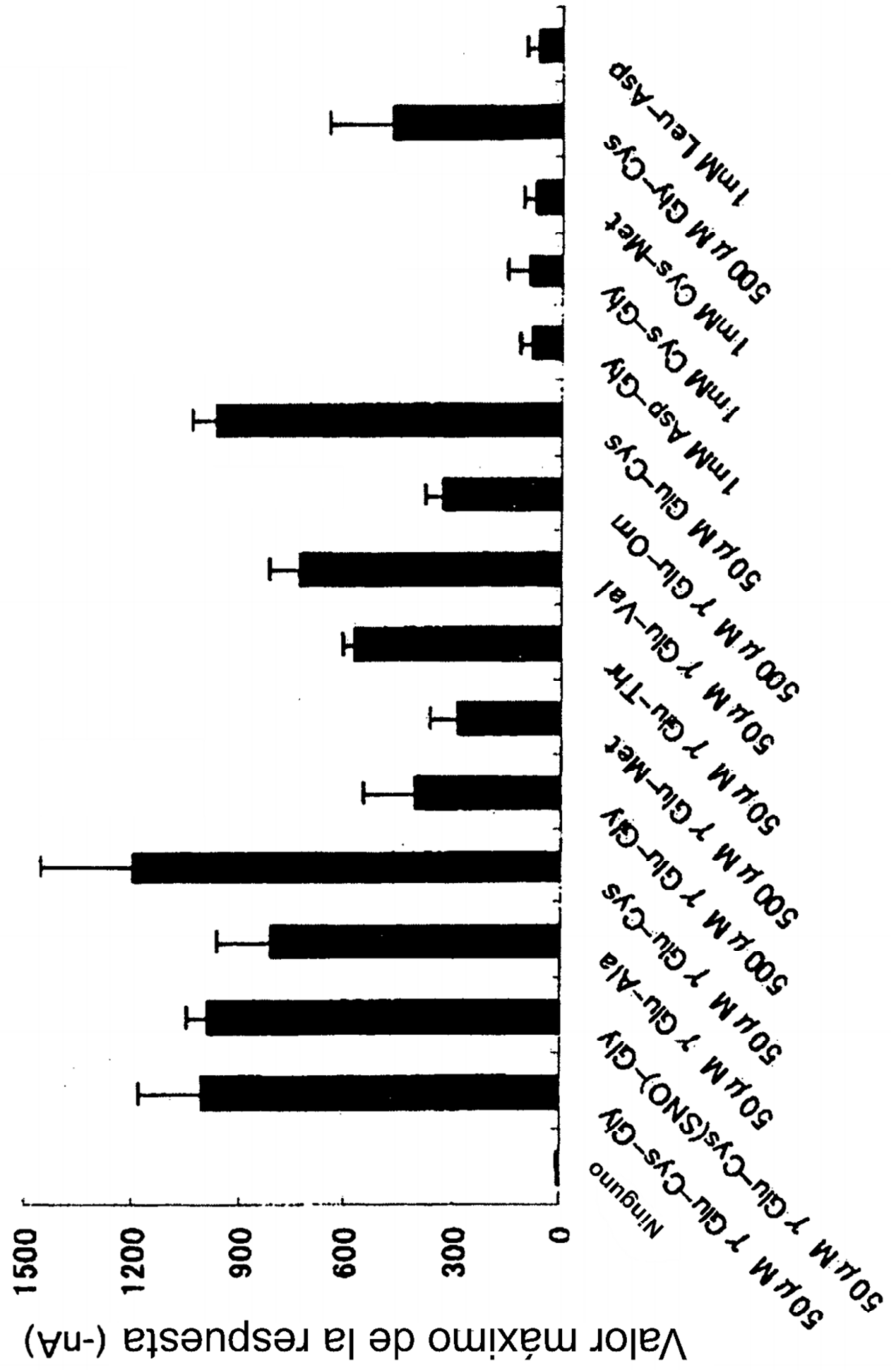


Fig.5

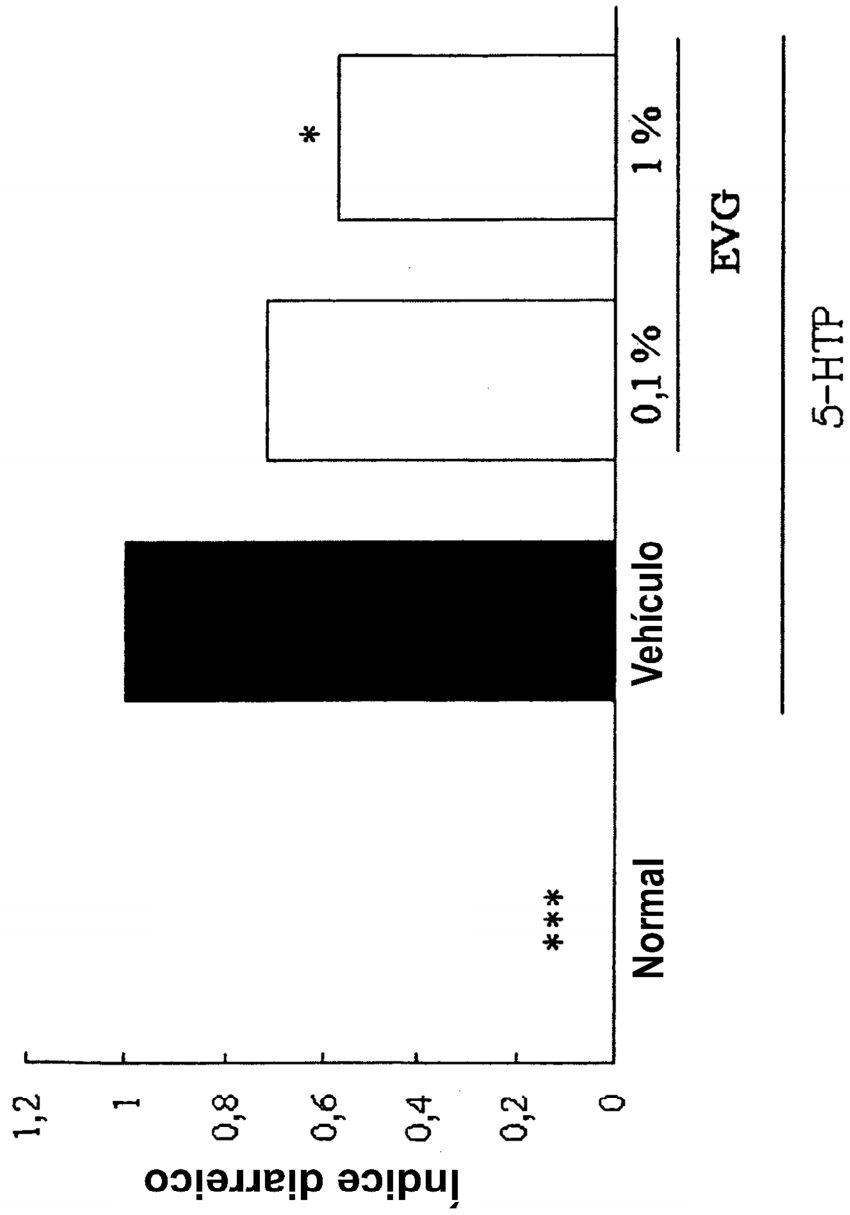
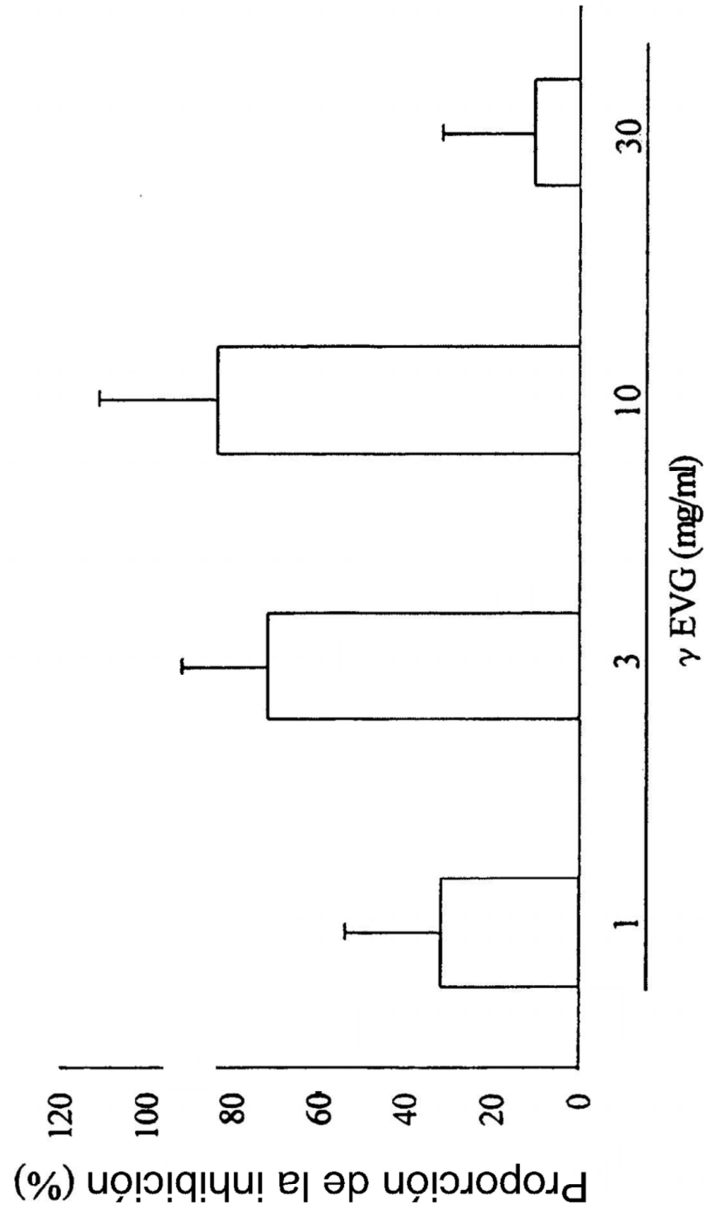




Fig.6



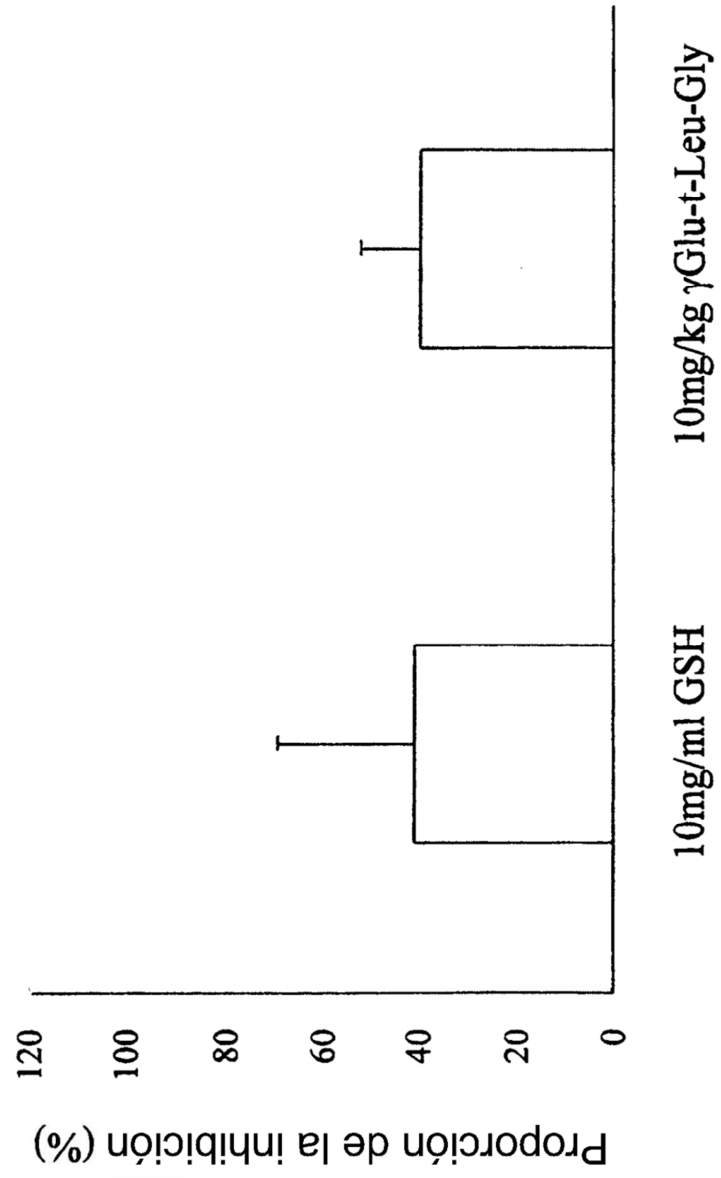


Fig.7

Fig.8

