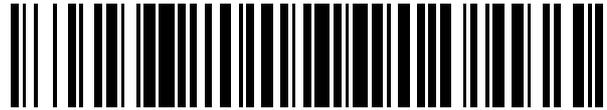


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 901**

51 Int. Cl.:

A61K 33/10 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2008 E 10163143 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2251018**

54 Título: **Carbonato de calcio amorfo estable que comprende aminoácidos fosforilados, péptidos fosforilados sintéticos y proteínas gastrofólicas**

30 Prioridad:

22.10.2007 IL 18685007

14.08.2008 IL 19346108

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

13.02.2015

73 Titular/es:

AMORPHICAL LTD. (100.0%)

P.O.B. 15021

Beer Sheva 84120, IL

72 Inventor/es:

BEN TOV, SHMUEL;

SAGI, AMIR;

BERMAN, AMIR y

SHECHTER, ASSAF

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 528 901 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

Carbonato de calcio amorfo estable que comprende aminoácidos fosforilados, péptidos fosforilados sintéticos y proteínas gastrolíticas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos que estabilizan la forma amorfa del carbonato de calcio, ADN para codificarlo, composiciones que comprenden carbonato cálcico amorfo y péptidos fosforilados, y a procedimientos de preparar los mismos. Se proporcionan composiciones farmacéuticas y nutracéuticas que comprenden carbonato de calcio amorfo y aminoácidos o péptidos fosforilados.

Antecedentes de la invención

15 El calcio juega uno de los papeles centrales en la transducción de señales y adicionalmente es un elemento estructural importante en sistemas biológicos. De los protozoos a los vertebrados, los depósitos de calcio ayudan a mantener rígidas las formas corporales de los animales, siendo el fosfato de calcio el componente principal de los endoesqueletos en los vertebrados y el carbonato de calcio en los exoesqueletos en los invertebrados. Los exoesqueletos calcificados con minerales de carbonato de calcio como los constituyentes principales están extendidos entre equinodermos, moluscos y artrópodos, proporcionando protección y sirviendo como almacenamiento de calcio. Algunos crustáceos almacenan carbonato de calcio temporalmente, en un estado amorfo, que los hace mejor disponibles, particularmente para movilización rápida durante la mineralización de sus nuevas estructuras exoesqueléticas después de muda. La formación de carbonato de calcio en los cuerpos vivientes de, por ejemplo, cangrejo de río es bastante intrigante, dado que los materiales amorfos son usualmente termodinámicamente inestables. El carbonato de calcio amorfo (ACC) tiende a transformarse en sus polimorfos cristalinos, principalmente calcita y aragonita. El documento WO 2005/115414 emplea órganos de crustáceos para proporcionar composiciones con ACC estable que está fácilmente disponible para consumo humano. Sugawara y col. Angew. Chem. Int. ED. 2006, 45, 2876 describen los efectos del péptido recombinante rCap-1 sobre las morfologías del carbonato cálcico. En vista de la importancia metabólica general y biomecánica del calcio y dado que ACC es una forma potencialmente más soluble y absorbible de carbonato de calcio como suplementos dietéticos, es un objeto de la invención proporcionar nuevos procedimientos para preparar carbonato de calcio amorfo.

Es otro objeto de esta invención proporcionar composiciones farmacéuticas y nutracéuticas que comprenden ACC estable.

35 Otros objetos y ventajas de la presente invención aparecerán según se desarrolla la descripción.

Sumario de la invención

40 La presente invención se refiere a una composición que comprende carbonato de calcio amorfo (ACC) y al menos un péptido fosforilado como se define en la reivindicación 1. Dicho péptido fosforilado puede comprender fosfo-serina o fosfo-treonina o ambas. Dichos péptidos fosforilados estabilizan la forma amorfa de dicho carbonato de calcio en la composición de la invención. En un aspecto de la invención, dicho péptido fosforilado procede de gastrolito de crustáceos. En una realización, la composición de la invención comprende ACC, al menos un péptido fosforilado de la invención y quitina o quitosana.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a péptidos de crustáceos y su uso al afectar al estado cristalino del carbonato cálcico y en la preparación de formulación. La invención también se refiere a fragmentos funcionales de dichos péptidos. Las proteínas aisladas relacionadas a continuación incluyen GAP65 (donde GAP representa una proteína gastrolítica); en el presente documento se proporcionan secuencias aminoácidas deducidas de dichas nuevas proteínas, y se representan como SEC. ID. N°: 1. La invención proporciona un péptido de crustáceo aislado y purificado que tiene básicamente una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la SEC. ID. N°: 1, y homólogos del mismo. Un homólogo de secuencia de acuerdo con la invención es un péptido con cualquier inserción, eliminación y sustitución, se conserva hasta al menos un 90% de la secuencia. La invención incluye adicionalmente un péptido aislado y purificado que comprende en su secuencia una subsecuencia, siendo dicha subsecuencia un fragmento de dichos péptidos GAP de crustáceos anteriores, que tiene al menos diez aminoácidos de longitud. Dicha subsecuencia puede tener una secuencia seleccionada entre, por ejemplo, las SEC. ID N°: 2 a 8, u otros fragmentos de secuencias SEC. ID. N°: 1. La invención proporciona una composición que comprende de uno o más péptidos como se ha definido anteriormente, o mezclas de los mismos, junto con carbonato cálcico amorfo (ACC). Dicho péptido estabiliza la forma amorfa de dicho carbonato cálcico en dicha composición. La expresión "fragmento, derivado o variante funcionalmente equivalente" como se usa en el presente documento, incluye péptidos con modificaciones que no interfieren en su capacidad para inhibir la cristalización de carbonato cálcico.

La invención se refiere a un péptido que tiene una secuencia aminoácida SEC. ID. N°: 1, y a péptidos que son su secuencia homóloga que tiene, preferiblemente, al menos un 90% de homología. Una secuencia de ADN que codifica un péptido de acuerdo con la invención también forma parte de la invención. En la invención se proporciona una

preparación de carbonato cálcico que contiene un péptido de la invención.

En una realización preferida de la invención, se proporciona una preparación de carbonato cálcico que comprende ACC, siendo dicha preparación estable al menos durante un mes. Se desvela un procedimiento de preparación de carbonato cálcico amorfo estable, que comprende mezclar en fase acuosa en cualquier orden una sal soluble que comprende calcio, una fuente de carbonato, y un péptido fosforilado de la invención. Dicha fuente puede comprender, por ejemplo, una sal carbonato disuelta en la fase líquida, o dicha fuente puede comprender dióxido de carbono gaseoso.

La invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende la composición citada anteriormente, que contiene uno o más péptidos fosforilados como se define en el presente documento o mezclas de los mismos, junto con ACC. La composición anteriormente citada, en otro aspecto de la invención, se usa ventajosamente como una formulación nutracéutica, por ejemplo como un aditivo alimentario. Dicha formulación farmacéutica se administra preferentemente oralmente y puede comprender cargas o disolventes o aditivos. Dicha formulación farmacéutica se usa preferentemente para su uso en el tratamiento de afecciones seleccionadas del grupo constituido por dolor, enfermedades proliferativas, trastornos neurológicos, trastornos inmunológicos, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, trastornos nutricionales, trastornos reproductivos, trastornos musculoesqueléticos y problemas dentales. Dicho tratamiento puede conducir a desaparición de factores causantes o a mitigar los síntomas. Dicha enfermedad proliferativa puede ser, por ejemplo, carcinoma de mama o carcinoma broncogénico. Dicho tratamiento puede comprender ralentizar o inhibir la proliferación celular en un tumor. En lo que respecta a dicho dolor, puede ser dolor postoperatorio, dolor después de herida, dolor asociado con cáncer y dolor neuropático. El trastorno neurológico mencionado se selecciona, por ejemplo, a partir de enfermedades desmielinizantes, demencias y trastornos del movimiento. Dicha afección puede ser una enfermedad degenerativa seleccionada a partir de esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Dicha afección puede comprender un trastorno de hueso o de médula ósea, que puede ser, por ejemplo fractura u osteoporosis. Dicha afección puede ser un trastorno neurodegenerativo.

Dicho nuevo péptido GAP65, o sus derivados, se usan, en un aspecto de la invención, en la fabricación de medicamentos.

El término "derivados" como se usa en el presente documento, incluye también productos peptídicos obtenidos por alquilación, esterificación, neutralización, ciclación u oligomerización.

La invención proporciona un procedimiento de inhibición de la cristalización de carbonato de calcio en una mezcla que comprende un carbonato y una sal de calcio, que comprende mezclar en dicha mezcla una cantidad de un péptido fosforilado de la invención. Dicho péptido fosforilado comprende preferentemente fosfo-serina o fosfo-treonina. La invención propone, en una realización, un procedimiento de inhibición de la cristalización de carbonato cálcico, que comprende mezclar en la mezcla de cristalización o precipitación una cantidad un péptido de la invención. Se proporciona un procedimiento de inhibición de la cristalización de carbonato cálcico de acuerdo con la invención, que comprende proporcionar una sal cálcica soluble en agua, y poner en contacto dicha sal con un péptido de la invención.

En un aspecto de la invención, se proporcionan aditivos alimentarios o alimentos funcionales, que comprenden una mezcla de carbonato de calcio y un péptido fosforilado; teniendo dicho péptido, en una realización, una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC. ID. Nº: 1, y homólogos o fragmentos del mismo como se define en la reivindicación 1.

Breve descripción de las figuras

Las anteriores y otras características y ventajas de la invención serán más evidentes fácilmente a través de los siguientes ejemplos, y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la Fig. 1 muestra el aislamiento de proteínas solubles gastrolíticas, purificación y secuenciación parcial de GAP65; Fig. 1A - tinción de Coomassie de SDS-PAGE del perfil de proteínas solubles del gastrolito, comparado con las proteínas de referencia de peso molecular (izquierda), SDS-PAGE de fracción 17 que contiene GAP65 purificado por cromatografía en columna DEAE teñida con Coomassie, "tiñe todo", y "pas" (derecha); Fig. 1B - cromatograma de GAP65 obtenido por nanopulverización Qtof2 tras digestión con tripsina, se obtuvieron secuencias de los péptidos de picos significativos a través de análisis EM/EM;

la Fig. 2 comprende la secuencia de aminoácidos deducida completa de GAP65 y su análisis bioinformático; Fig. 2A - secuencia de aminoácidos deducida de la fase de lectura abierta de GAP65, la secuencia señal predicha está en negrita, las cajas grises son sitios de fosforilación posibles, las cajas negras en aminoácidos n.º 72 y 173 son sitios de O-glicosilación predichos, las cajas claras son sitios de N-glicosilación predichos; Fig. 2B - un esquema de la secuencia de GAP65 que muestra los dominios predichos: ChtBD2 es dominio de unión a quitina 2, LDLa es dominio de receptor de lipoproteína de baja densidad de clase A y la última es dominio de desacetilasa de polisacáridos; Fig. 2C-3D estructura del dominio de LDLa basado en homología al receptor de lipoproteína, en la izquierda está la estructura RMN de repetición similar a complemento CR3 a partir de la proteína relacionada con el receptor de

lipoproteínas de baja densidad, en la derecha está la estructura predicha del dominio LDLa de GAP65;

la Fig. 3 muestra expresión específica de GAP65 y su localización en el epitelio columnar del gastrolito durante la premuda inducida; Fig. 3A - detección de expresión de GAP65 durante premuda usando RT-PCR, ARN se muestreó de disco epitelial de gastrolito, hepatopáncreas, tejido sub-epidérmico, conducto espermático y pared estomacal, se usó factor de elongación 2 (Eft2) para asegurar la extracción de ARN, se usó control para contaminación genómica; Fig. 3B - localización de expresión de GAP65 por hibridación *in situ* en premuda inducida y machos en intermuda intactos, el panel izquierdo representa la tinción de hematoxilina y eosina (H&E), el panel medio representa el control negativo en sentido correcto - sonda de GAP65, los dos paneles derechos representan la sonda antisentido GAP65 con el último siendo un alargamiento de un área específica, la barra representa 200 μm salvo para sonda de premuda inducida donde la barra representa 100 μm ;

la Fig. 4 muestra el nivel de transcripción relativo de GAP65 (designado GASP65) en el disco gastrolítico tras silenciar GAP65, cuantificación relativa de nivel de transcripción de GAP65 usando RT-PCR en tiempo real en el disco gastrolítico de cangrejo inyectado con (izquierda a derecha): ecdisona y ARNs de GAP65, ecdisona y vehículo de ARNs, ecdisona y ARNs de vitelogenina de *C. quadricarinatus* (CqVg), vehículo de ecdisona y vehículo de ARNs y las letras representan significancia estadística;

la Fig. 5 son fotos que muestran deformidades morfológicas de los gastrolitos tras silenciamiento de GAP65, los gastrolitos representativos se diseccionan de cangrejo de río inyectado bien con ecdisona y ARNs de GAP65 (izquierda), bien con ecdisona y vehículos de RNAs (medio), bien con vehículo de ecdisona y vehículo de ARNs (derecha); Fig. 5A - vista lateral de gastrolitos completos diseccionados del cangrejo de río; Fig. 5B y 5C - formación de imágenes de rayos X del gastrolito anterior antes de disección (vista dorsal);

la Fig. 6 muestra micrográficas de microscopio electrónico de barrido (SEM) de deformidades estructurales de gastrolitos tras silenciamiento de genes de GAP65; los gastrolitos representativos se diseccionaron de cangrejo de río inyectado con ecdisona + GAP65 RNAs (izquierda) y ecdisona + vehículo RNAs (derecha); Fig. 6A y 6B - secciones cruzadas de la parte central del gastrolito que manifiestan la disposición del mineral y la matriz (X 50, X 200, respectivamente); Fig. 6C - reordenamiento mineral que comprende nanoesférulas (X 15000); la ecdisona sin GAP muestra apariencia de gastrolito normal, mientras que el gastrolito tratado con ecdisona + RNAs de GAP65 parece deformado;

la Fig. 7 muestra imágenes de SEM de carbonato de calcio *in vitro* precipitado en presencia/ausencia de la proteína purificada de gastrolito; Fig. 7A - carbonato de calcio precipitado con fracción enriquecida en GAP65 (izquierda), carbonato de calcio precipitado con la cantidad equivalente de tripsina como un control (derecho); Fig. 7B - una imagen de SEM de ACC 40 días después de la precipitación, demostrando estructuras amorfas típicas con nanosferas de 50-500 nm;

la Fig. 8. muestra espectros de Raman del ACC obtenido por precipitación con fracción enriquecida de GAP65; Fig. 8A - espectros de Raman de carbonato de calcio obtenida por precipitación con fracción enriquecida de GAP65; Fig. 8B - 27 días después de la precipitación; Fig. 8C - 6,5 meses después de la precipitación;

la Fig. 9. es una comparación de los espectros de Raman (alrededor del pico de 1085) de ACC de 6,5 meses de edad (inducido por GAP65) con calcita;

la Fig. 10. muestra secuenciación parcial de proteínas gastrolíticas, están presentes cromatogramas obtenidos por nanopulverización Qtof2 tras digestión con tripsina, se obtuvieron secuencias de los péptidos a partir de picos significativos a través de análisis EM/EM; la Fig. 10A muestra GAP22; la Fig. 10B muestra GAP21; la Fig. 10C muestra GAP12;

la Fig. 11 muestra espectros de Raman del carbonato de calcio precipitado a partir de la solución de cloruro de calcio y de carbonato de sodio en presencia de extracto gastrolítico;

la Fig. 12 es Tabla 1, que muestra composiciones aminoacídicas de proteínas GAP;

la Fig. 13. muestra secuencia de nucleótidos de ADNc de GAP-22 y la secuencia aminoacídica deducida correspondiente en fase de lectura abierta; los asteriscos indican codones de parada y la secuencias destacadas en gris son las regiones no traducidas; los péptidos señal teóricos en el extremo N-terminal están subrayados;

la Fig. 14 muestra secuencia de nucleótidos de ADNc de GAP21 y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente en fase de lectura abierta; los símbolos tienen el mismo significado que en la Fig. 13; y

la Fig.15. se refiere a las secuencias GAP; la Fig. 15A muestra secuencia de nucleótidos de ADNc de GAP12 y la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente en fase de lectura abierta; los símbolos tienen el mismo significado que en la Fig. 13; la Fig. 15B es alineamiento de secuencia de GAP12 y GAP21, las posiciones de aminoácidos de las dos proteínas se muestran a la derecha y a la izquierda, las identidades de secuencia están

indicadas por "***", las sustituciones conservadas están indicadas por ":" y las sustituciones semiconservadas están indicadas por V;

Fig. 16 a Fig. 27 muestran espectros de Raman descritos en detalle en los Ejemplos 9 a 20; y

Fig. 28 a Fig. 32 muestran espectros de Raman de muestras preparadas de acuerdo con los Ejemplos 9, 10 y 18-20, respectivamente, que se almacenaron después de la precipitación a temperatura ambiente según se describe.

Descripción detallada de la invención

Se ha encontrado que algunos aminoácidos o péptidos fosforilados afectan la precipitación de carbonato de calcio *in vitro*, conduciendo a la formación de forma amorfa de carbonato de calcio. Particularmente, los efectos se han observado cuando dichos péptidos comprenden varias proteínas presentes en el gastrolito premuda tardía de *Cherax quadricarinatus*. Los péptidos que tienen pesos moleculares aparentes de aproximadamente 65 kDa, 22 kDa, 21 kDa y 12 kDa inducen la precipitación de nanoesferas de material de carbonato cálcico amorfo; en comparación, una proteína inerte proporciona cristales de CaCO₃. Las nanopartículas muestran un desplazamiento Raman típico para CaCO₃ amorfo.

Las proteínas anteriores, representadas como GAP65, GAP22, GAP21, GAP12, respectivamente, de acuerdo con sus pesos moleculares aparentes estimados por SDS-PAGE, están implicadas en la precipitación y estabilización de ACC. El extracto gastrolítico que contiene dichas cuatro proteínas inhibe la cristalización de carbonato cálcico y estabiliza la forma amorfa del carbonato cálcico (ACC). Se detectó ACC por espectrometría de Raman en un precipitado de CaCO₃ preparado a partir de una solución que contenía CaCl₂, Na₂CO₃ y el extracto gastrolítico (figura 11). La presencia de ACC se valida por la presencia de un pico predominante en aproximadamente 1080 cm⁻¹. Se descubrió que las expresiones de los genes GAP eran específicas para el disco epitelial gastrolítico y el tejido sub-epidérmico, ambos son tejidos relacionados con la cutícula. También se estudiaron expresiones específicas de los péptidos GAP en varios tejidos diana por medio de RT-PCR. Por ejemplo, la expresión de GAP65 se descubrió en más tejidos relacionados con la cutícula, mientras que la expresión de GAP22 se encontró más bien en el disco epitelial gastrolítico.

Se obtuvieron las secuencias de ADNc de los genes correspondientes y se descubrieron sus proteínas deducidas (figuras 2, 13-15). Se descubrió que las cuatro proteínas contenían péptidos señal en su extremo N (aminoácidos subrayados en las figuras 13-15, en negrita en la figura 2). Una búsqueda de similitud en bases de datos de dominios conservados reveló que GAP65 contiene tres dominios conservados: Dominio de unión a quitina 2, Dominio del receptor de lipoproteína de baja densidad de clase A, y Dominio polisacárido desacetilasa. Por otro lado, GAP 12, GAP 21 y GAP 22 no muestran ninguna similitud significativa para ningún dominio conocido. El alineamiento Blast de GAP 12 y GAP 21 reveló una identidad del 46,3% en las secuencias aminoácidas deducidas de estas proteínas (figura 15). El análisis físico-químico de las proteínas deducidas reveló que los pesos moleculares calculados de GAP 12, 21 y 65 son inferiores a los esperados, 9,9, 19,5 y 60,8 kDa respectivamente, mientras que de GAP 22 es superior al esperado, 28,6 kDa (Tabla 1). GAP 12, GAP 21 y GAP 65 tienen un pI ácido, por lo tanto, están cargados negativamente al pH fisiológico del gastrolito (cerca de pH 8,5). GAP 12 y GAP 21 tienen un elevado porcentaje de aminoácidos no polares alifáticos (glicina, alanina y valina) y un elevado porcentaje del aminoácido polar, pero no cargado, prolina (resaltado en gris en la Tabla 1). GAP65 tiene un alto contenido de aminoácidos ácidos. GAP22 tiene un pI básico, por lo tanto, está cargado positivamente al pH fisiológico del gastrolito. Sus características principales son un alto porcentaje del aminoácido polar, pero no cargado, prolina y del cargado positivamente arginina.

Debido a las características especiales de las nuevas proteínas, en esta memoria descriptiva se desvela también un procedimiento de inhibición de la cristalización de carbonato cálcico, que comprende mezclar en la mezcla de cristalización o precipitación una cantidad de GAP65 o un fragmento funcional de la misma, o un derivado, o una variante de la misma. En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un procedimiento de inhibición de la cristalización de carbonato cálcico, que comprende poner en contacto una sal cálcica soluble en agua con GAP65 o un fragmento funcional, derivado o variante de la misma.

GAP65 se purificó a partir de extracto de proteína soluble gastrolítica mediante cromatografía de intercambio iónico, y se identificó como un glucopéptido cargado negativamente, que contenía aproximadamente el 12% en mol de Asp + Glu, en base a la SEC. ID N° 1. La secuenciación de los péptidos por MS-MS proporcionó siete subsecuencias oligopeptídicas (SEC. ID N°: 2-8; figura 1B) que se usaron para la construcción de cebadores degenerativos para la adquisición de una secuencia génica codificada GAP65 completa en base al ARNm del disco epitelial gastrolítico. La secuencia aminoácida deducida total reveló un péptido de 548 aminoácidos de largo (SEC. ID N°: 1; figura 2A). El análisis bioinformático de la secuencia GAP65 sugirió la presencia de tres dominios conocidos (figura 2B): Dominio de unión a quitina 2 (ChtBD2) de los aminoácidos 29-102, dominio del receptor de lipoproteína de baja densidad de clase A (LDLa), de los aminoácidos 122-159, y dominio polisacárido desacetilasa de los aminoácidos 195-332. El dominio LDLa tiene una propiedad de unión a calcio predicha. La expresión de GAP65 se ensayó en cangrejos en premuda en varios tejidos diana por medio de RT-PCR, y se detectó en el disco epitelial gastrolítico y en el tejido sub-epidérmico, ambos son tejidos relacionados con la cutícula (figura 3A). La hibridación *in situ* visualizó la ubicación de la expresión de GAP65 en el disco gastrolítico de un cangrejo en premuda inducida y intermuda intacta (figura 5B). Los niveles de transcripción relativos de GAP65 en el disco epitelial gastrolítico tras la silenciamiento usando ARNs de GAP65 se

midieron usando RT-PCR en tiempo real (figura 4). La función de GAP65 en la formación de gastrolitos se ensayó mediante una técnica de ARNi usando inyecciones *in vivo* de ARNdS de GAP65 en cangrejos en intermuda (figura 5). El inicio de la formación de gastrolitos se consiguió mediante la inyección de ecdisona. Pueden observarse deformidades morfológicas del gastrolito en un cangrejo inyectado tanto con ARNdS de GAP65 como ecdisona (la figura 5A muestra el gastrolito diseccionado, la figura 5B y 5C son vistas en rayos X).

Se descubrió que GAP65 afecta básicamente a la microestructura del gastrolito de los cangrejos. Las micrografías de un microscopio electrónico de barrido (SEM) de gastrolitos diseccionados de cangrejos a los que se les inyectó ARNdS de GAP65 junto con ecdisona, o únicamente ecdisona, revelaron varias anomalías estructurales causadas por la ausencia de GAP65 (figura 6). El empaquetamiento del ACC en esférulas, y el tamaño de las esférulas, es importante para el empaquetamiento denso del gastrolito; la ausencia de GAP65 condujo a esférulas mayores y una estructura menos condensada en comparación con el gastrolito normal.

Con el fin de elucidar la función de GAP65 en el proceso de biomineralización, se realizó una precipitación de carbonato cálcico *in vitro* para probar la estabilización de ACC. Las imágenes del microscopio por electrones de los precipitados indicaron claramente una composición polimorfa diferente del carbonato cálcico para la precipitación en presencia/ausencia de fracciones enriquecidas con GAP65 (figura 7). La precipitación de carbonato cálcico en ausencia de GAP, concretamente en presencia de una proteína inerte, dio como resultado una cristalización rápida que proporcionó cristales de calcita y/o vaterita tan grandes como de 10 μm . Por otro lado, la precipitación de carbonato cálcico en presencia de GAP65 dio como resultado CaCO_3 amorfo observado como una capa fina que consistía en esférulas de 40-60 nm. La naturaleza amorfa del carbonato cálcico en dichas esférulas se corroboró por espectros de Raman, que mostraron el pico ACC distinto en 1070 cm^{-1} , y adicionalmente mediante el empleo de difracción de polvo de rayos X (XRD), que indicó la ausencia de picos de difracción de materiales cristalinos. La presencia de GAP65 en las esférulas de ACC formadas por la precipitación *in vitro* se confirmó mediante la purificación de la proteína de las esférulas y su identificación por SDS-PAGE.

Los depósitos de CaCO_3 obtenidos por precipitación en presencia de GAP65 se caracterizaron inicialmente por microscopía polarizada, identificando calcita, vaterita y ACC. Las observaciones se confirmaron mediante espectroscopía de Raman y XRD de polvo. El ACC constituía aproximadamente al menos el 50% del CaCO_3 total. El ACC permaneció estable en condiciones ambientales durante al menos 1 mes.

Por lo tanto, la memoria descriptiva desvela nuevas proteínas asociadas al metabolismo del calcio en cangrejos, que afectan al estado cristalino del carbonato cálcico. Se desvela un procedimiento de inhibición de la cristalización de carbonato cálcico, que comprende mezclar en la mezcla de cristalización o precipitación una cantidad de proteínas GAP o fragmentos funcionalmente equivalentes de las mismas, o derivados, o variantes de las mismas. También se desvela un procedimiento de preparación de ACC mezclando dicha nueva proteína en una mezcla de precipitación, concretamente una mezcla en la que se produce la precipitación de CaCO_3 , y en la que la precipitación del material cristalino se producirá sin dicha proteína. Un ejemplo no limitante de dicha mezcla incluye una solución acuosa de cloruro cálcico que comprende GAP65 en la que se añade una solución de carbonato sódico. Por supuesto, el orden de mezcla de los componentes puede variar, así como los tipos de fuentes iónicas. La concentración de GAP65 en la mezcla puede ser, por ejemplo, aproximadamente del 0,05 al 5% en peso en base al peso del CaCO_3 . La concentración de GAP65 en la mezcla de precipitación puede ser, por ejemplo, aproximadamente de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Se desvela una composición que contiene ACC y un aminoácido o péptido fosforilado, por ejemplo una proteína GAP. En un aspecto importante de la divulgación, se proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de trastornos asociados al metabolismo o señalización del calcio, que comprende ACC y una cantidad estabilizadora de aminoácido o péptido fosforilado, por ejemplo una proteína GAP o sus derivados. La formulación se usa preferiblemente para administración oral. La formulación desvelada se usa como un medio terapéutico, o como un complemento terapéutico, o como un complemento nutricional.

En una realización preferida de la invención, ACC preparado de acuerdo con la invención está comprendido en una formulación para su uso en el tratamiento de afecciones asociadas con metabolismo de calcio o con señalización de calcio. Dichas afecciones pueden estar seleccionadas del grupo constituido por dolor, enfermedades proliferativas, trastornos neurológicos, trastornos inmunológicos, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, trastornos nutricionales, trastornos reproductivos, trastornos musculoesqueléticos y problemas dentales. Dicho tratamiento puede comprender mitigar los síntomas de las enfermedades. Dicha enfermedad proliferativa se puede seleccionar a partir de sarcomas, carcinomas, linfomas y melanomas. Dicho carcinoma es, por ejemplo, carcinoma de mama o carcinoma broncogénico. Dicho tratamiento puede conducir a encoger tumores, detener su crecimiento, o ralentizar o inhibir la proliferación celular en los tumores. Dicho dolor puede estar seleccionado de dolor postoperatorio, dolor después de herida, dolor asociado con cáncer y dolor neuropático. Dicho trastorno neurológico puede estar seleccionado de enfermedades desmielinizantes, demencias, y trastornos del movimiento; siendo dichos trastornos, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, u otras enfermedades degenerativas. Dicha afección a tratarse puede comprender un trastorno óseo o un trastorno de la médula ósea, tal como fractura u osteoporosis. En una realización preferida, una composición de la invención se usa para tratar un trastorno neurodegenerativo.

La divulgación se refiere a una composición de materia que comprende ACC y una cantidad estabilizadora de un péptido fosforilado (PP), por ejemplo, una composición que comprende uno o más PP, tales como péptidos GAP o sus fragmentos funcionales, derivados o variantes. La divulgación se refiere también a ACC estabilizado con PP, tal como GAP, para su uso como un medicamento o en la elaboración de un medicamento, o para usar como un aditivo alimentario.

El procedimiento para la preparación de ACC puede comprender las etapas:

- i) Formar una solución acuosa con iones de calcio (con solución de CaCl_2).
- ii) Adición de "aditivos" solubles o insolubles (ácidos fosfoamino, quitosana, quitina, péptidos sintéticos, péptidos/proteínas fosforiladas o fragmentos de los mismos, etc.).
- iii) Adición de iones de carbonato (con solución de Na_2CO_3 u otra fuente de carbonato, como por ejemplo CO_2 , o $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$).
- iv) Agitación.
- v) Precipitación de suspensión de CaCO_3 (por centrifugación, filtración etc.).
- vi) Deshidratación de suspensión (por liofilizador, flujo de aire, secado por pulverización, etc.).

El análisis del producto puede comprender poner a prueba el CaCO_3 resultante por diversos procedimientos (como XRD, difracción de electrones, SEM) para verificar su naturaleza amorfa. Se encontró que la espectroscopía de Raman (RS) es el procedimiento más eficaz y fiable para caracterizar ACC. Las características de desplazamiento de Raman del mineral comunicadas aquí son el pico de carbonato a 1080 cm^{-1} cuya forma aguda es indicadora de ACC y proporcional a su contenido. El pico de fosfato a 950 cm^{-1} , es proporcional al contenido de fosfato en la muestra. Todavía, la proporción entre 1080 a 950 cm^{-1} es proporcional, pero no directamente indicadora de la proporción de $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$.

Los iones de calcio y de carbonato, en las soluciones a partir de las que se precipitó el carbonato de calcio, estaban usualmente en el intervalo desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 500 mM . La proporción molar de aminoácido fosforilado (PAA) frente a calcio estaba usualmente en el intervalo de $0,01$ - $0,5$. Una concentración más alta de PAA inhibió la precipitación espontánea. La quitosana, cuando estuvo presente, estaba en el intervalo del $0,03$ - $0,3\%$.

Los péptidos que se extrajeron de gastrolitos de *Cherax* desmineralizados mediante diferentes enzimas proteolíticas (tripsina, papaína y proteasa de *Streptomyces*) indujeron la formación de ACC. Se sugiere que los ácidos fosfoamino y los fosfopéptidos pueden inducir la formación de ACC y pueden estabilizarlo. Es posible que las proteínas intactas tengan funciones adicionales. Los espectros de Raman y el análisis EDS muestran una cantidad significativa de fosfato cálcico similar al ACC inducido por la matriz insoluble total (ISM), lo que sugiere que el fosfato en la ISM está relacionado con las proteínas.

El carbonato de calcio precipitado se comprobó durante largos periodos de tiempo para el estado amorfo/cristalino. Se encontró que los ejemplos de ACC obtenidos por procedimientos de la invención fueron estables a temperatura ambiente durante más de siete meses, manteniendo su estado amorfo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se prepararon gastrolitos de *Cherax quadricarinatus* según se describe [documento WO 2005/115414]. La separación de SDS-PAGE de proteínas solubles a partir de gastrolitos reveló la presencia de al menos 6 proteínas distintas prominentes (Fig. 1A izquierda) con la más abundante estando en el tamaño de aproximadamente 65 kDa (proteína gastrolítica 65, GAP65). La purificación adicional de GAP65 del contenido en proteínas solubles gastrolíticas se llevó a cabo usando cromatografía HPLC DEAE con gradiente de NaCl de hasta 1 M . La elución GAP65 comienza a $\text{NaCl } 300\text{ mM}$ pero continua principalmente a 600 mM (fracción 17). La fracción 17 enriquecida en GAP65 se analizó por SDS-PAGE y se tiñó con Coomassie (tinción de proteínas no específica), "tiñe todo" (tinción proteica cargada negativamente) y "pas" (tinción glicoproteica), como se muestra en la Fig 1A derecha. Esta tinción sugiere que GAP65 es la proteína principal en esta fracción enriquecida y es una glicoproteína cargada negativamente. La digestión de tripsina de GAP65 seguida por separación usando nanopulverización Qtof2 y secuenciación de los péptidos usando EM-EM generó 7 secuencias peptídicas predichas (Fig. 1B) que se usaron para la construcción de cebadores degenerativos para la adquisición de una secuencia génica codificada de GAP65 completa basada en ARNm de disco epitelial gastrolítico. La Fig. 2A manifiesta la secuencia aminoacídica deducida de fase de lectura abierta que muestra una secuencia señal predicha del extremo N-terminal de la proteína (negrita). Aproximadamente el $4,6\%$ de aminoácidos totales de GAP65 se predijeron como sitios de fosforilación posibles (cajas grises), mientras que solamente se encontraron tres sitios de N-glicosilación predichos (cajas claras incluyendo tres letras) y dos sitios de O-glicosilación predichos (cajas oscuras en aminoácidos número 72 y 173). La carga negativa se origina en parte a partir de los residuos con carácter ácido aspártico y glutámico, que comprenden aproximadamente el 12% molar de la proteína. Análisis bioinformáticos de secuencia de GAP65 sugirieron la presencia de tres dominios conocidos (Fig. 2B): dominio 2 de unión a quitina (ChtBD2) de aminoácidos 29-102, dominio de receptor de

lipoproteína de baja densidad de clase A (LDL_A) de aminoácidos 122-159 y dominio de desacetilasa polisacárida de aminoácidos 195-332. La Fig 2C revela la estructura tridimensional predicha del dominio LDL_A en base a la homología a estructura de RMN de repetición CR3 similar al complemento de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de densidad baja. Este dominio de LDL_A es el único dominio en GAP65 que tiene una propiedad de unión a calcio predicha.

Ejemplo 2

La expresión específica de GAP65 se probó en cangrejo de río en premuda en varios tejidos objetivo por medio de RT-PCR (Fig. 3A). La expresión de GAP65 se detectó en el disco epitelial gastrolítico y en el tejido subepidérmico, ambos son tejidos relacionados con la cutícula. La expresión de GAP65 no se detectó en el hepatopáncreas, pared estomacal y conducto espermático. La localización de expresión de GAP65 en el disco gastrolítico de cangrejo de río en premuda inducido y cangrejo de río en intermuda intacto por hibridación *in situ* se presentan en la Fig. 3B. El panel izquierdo representa tinción de hematoxilina y eosina del disco gastrolítico, el panel medio es la sonda en sentido correcto control donde no se detecta ninguna expresión. Los dos paneles izquierdos representan la sonda antisentido con el último siendo un alargamiento de un área específica. La sonda antisentido revela que la expresión de GAP65 se puede detectar solamente en las células epiteliales columnares del disco gastrolítico de un cangrejo de río inducido, mientras que, en cangrejo en intermuda intacto esta expresión no se detecta.

Ejemplo 3

Los niveles transcritos de GAP65 relativos en el disco epitelial gastrolítico tras anulación usando ARNds se midieron usando RT-PCR en tiempo real y se presentaron en Fig. 4. Los niveles de GAP65 se evaluaron en cangrejos de río inyectados con ecdisona y ARNds GAP65, ecdisona y vehículo de ARNds, ecdisona y vitelogenina de *C. quadricarinatus* (*CqVg*) y un control inyectado con ambos vehículos. *CqVg*, un gen específico hepatopancreático encontrado mayoritariamente en hembras reproductivas, sirvió como un control para silenciamiento específica de secuencias. Los niveles de transcritos de cangrejo de río inyectado con ecdisona y ARNds de GAP65 fueron significativamente más bajos que los niveles encontrados en el cangrejo de río inyectado con ecdisona y vehículo de ARNds. En el cangrejo de río inyectado con ecdisona y dsRNA de *CqVg*, los niveles de transcrito GAP65 fueron similares a los niveles detectados en la ecdisona y el grupo inyectado con vehículo de ARNds. En el cangrejo de río inyectado con vehículos control los niveles de transcritos de GAP65 fueron mayores que los niveles encontrados en el cangrejo de río inyectado con ecdisona y ARNds de GAP65 pero más bajos que los niveles detectados tanto en el cangrejo de río inyectado con ecdisona y ARNds como en el cangrejo de río inyectado con ecdisona y ARNds de *CqVg*. Sin embargo, el grupo de vehículos control no era estadísticamente significativamente diferente de los otros tres grupos.

Ejemplo 4

Con el fin de probar el papel de GAP65 en formación de gastrolitos, se aplicó una técnica de ARNi usando *in vivo* inyecciones de ARNds de GAP65 a cangrejo de río en intermuda. La iniciación de formación de gastrolitos se logró por inyección de ecdisona. En la Fig. 5 se puede ver gastrolito de cangrejo de río inyectado bien con ecdisona + ARNds de GAP65, bien con ecdisona + vehículo de ARNds, o bien con vehículos tanto de ecdisona como de ARNds. La Fig. 5A es una vista lateral de un gastrolito representativo diseccionado a partir de cada grupo de tratamiento. A partir de esta imagen se pueden observar deformidades morfológicas del gastrolito en cangrejo de río inyectado tanto con ARNds de GAP65 como con ecdisona, mientras que en cangrejo de río inyectado solamente con ecdisona y vehículo de ARNds, el gastrolito apareció normal sin deformidades. En los vehículos de control inyectados el gastrolito apareció sin desarrollar o en un estado de crecimiento inicial. La Fig. 5B representa vista de rayos X dorsal del cangrejo de río y el gastrolito antes de disección mientras que la Fig. 5C presenta imágenes con más contraste de las imágenes del panel B. En el cangrejo de río inyectado tanto con dsRNA de GAP65 como con ecdisona, hay algunas regiones en las que se registra detección de mineral menos densa mientras se mantiene la forma discoidal del gastrolito. En el cangrejo de río inyectado con ecdisona + vehículo de ARNds, el gastrolito aparece normal sin ningún efecto en densidades de mineral. El gastrolito de vehículo de control fue demasiado pequeño para detectarse por la formación de imágenes de rayos X.

Ejemplo 5

Imágenes de microscopio electrónico de barrido de gastrolitos disecados a partir de cangrejo de río con ARNds de GAP65 y ecdisona y a partir de cangrejo de río inyectado solamente con ecdisona y vehículo de ARNds, se presentan en la Fig. 6. Las Fig. 6A-B representan imágenes de una sección transversal a través de la parte central del gastrolito. En el gastrolito del cangrejo de río inyectado con ARNds de GAP65 y ecdisona se pueden observar anomalías estructurales graves cuando se comparan con el gastrolito del cangrejo de río inyectado solamente con ecdisona y vehículo de ARNds. La estructura laminada mineral densa observada en el gastrolito de ecdisona y el vehículo inyectado se reemplaza con una estructura de mineralización columnar empaquetada débilmente, que se asemeja a pajas huecas, en el gastrolito de ecdisona y en el cangrejo de río inyectado con ARNds de GAP65. El empaquetamiento del ACC en esférulas y el tamaño de las esférulas, es importante para el empaquetamiento denso del gastrolito. Se presenta aumento X 15000 comparando el tamaño de las esférulas entre los dos tratamientos en la Fig. 6C. En el gastrolito dispuesto menos densamente de cangrejo de río inyectado con ecdisona y ARNds de GAP65

el tamaño de esférulas varió entre aproximadamente 100-300 nm mientras que en el ACC normal depositado en gastrolito de cangrejo de río inyectado con ecdisona y vehículo de ARNs las esférulas tienen distribución de tamaño más estrecha, varió desde 40-60 nm.

5 Ejemplo 6

Con el fin de dilucidar el papel de GAP65 en el procedimiento de biomineralización, se estableció un ensayo de precipitación de carbonato de calcio *in vitro* que puso a prueba la estabilización de ACC. La Fig. 7 presenta resultados de precipitación de carbonato de calcio en presencia de GAP65 y en presencia de otra proteína (tripsina). Las imágenes de SEM en la Fig. 7A indican el polimorfo distinto de carbonato de calcio en cada tratamiento. La precipitación de carbonato de calcio en presencia de GAP65 dio como resultado la deposición de forma amorfa (ACC), observada como una capa fina que se compone de esférulas de 100-500 nm. Los experimentos de precipitación llevados a cabo en las mismas condiciones pero en presencia de tripsina dieron como resultado cristalización rápida, observada como cristales individuales de 10 nm grandes de esferulitas de calcita y vaterita. La Fig. 7B confirma la naturaleza del ACC en carbonato de calcio precipitado en presencia de GAP65. El análisis de Raman está mostrando el espectro distinto de ACC con un pico amplio transparente a 1070 cm^{-1} . La presencia de GAP65 en las esférulas ACC formadas por la precipitación *in vitro* se confirmó por purificación de la proteína de la fracción mineral del precipitado y su evaluación por SDS-PAGE contra la fracción enriquecida de GAP65 original.

20 Ejemplo 7

La estabilidad de ACC precipitado con GAP65 se probó con espectroscopía de Raman en las muestras mantenidas a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μl de CaCl_2 1 M a agua doblemente destilada (concentración final: 10 mM). Se añadieron 80 μl de la solución de extracción de proteínas (1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (concentración final $\sim 10\text{ }\mu\text{l}/\text{ml}$). 100 μl de Na_2CO_3 1 M (concentración final: 10 mM) se añadió después de una agitación intensiva. El vial se centrifugó durante 5 minutos a 400 rpm, el precipitado se frotó sobre una lámina de cristal e instantáneamente se secó con flujo de aire. Los depósitos de CaCO_3 se caracterizaron inicialmente por microscopía polarizada como una mezcla de calcita, vaterita y ACC. Las observaciones se confirmaron por espectroscopía de Raman. El ACC estaba en forma de una "corteza" delgada y se estimó que comprendía aproximadamente al menos el 50 % del CaCO_3 total. El ACC permaneció estable a temperatura ambiente durante al menos 1 mes, según muestran los espectros de Raman del ACC un día después de precipitación, 27 días después de precipitación y 6,5 meses después de precipitación. (Fig. 8A, 8B, 8C). La comparación de espectros de Raman (alrededor del pico de 1085) de ACC de 6,5 meses de edad con calcita (Fig. 9) indicó mezcla que comprende aparentemente ACC y vaterita (cuando se considera un acotamiento de pico en el pico 1085 que es posiblemente una aparición de una separación de pico que caracteriza vaterita).

35 Ejemplo 8

El extracto gastrolítico inhibe cristalización de carbonato de calcio y estabiliza la forma amorfa de carbonato de calcio (ACC). Se detectó ACC por espectroscopía de Raman en un precipitado de CaCO_3 preparado a partir de una solución que contiene CaCl_2 , Na_2CO_3 y el extracto de gastrolitos (Fig. 11). La presencia de ACC está validada por la presencia de un pico ancho predominante a aproximadamente 1080 cm^{-1} . El pico a 560 se atribuye al sustrato de vidrio. Las expresiones de los genes GAP se encontró que son específicas para el disco epitelial gastrolítico y para el tejido subepidérmico, ambos son tejidos relacionados con la cutícula. La expresión específica de GAP21, GAP22 y GAP65 en varios tejidos objetivo se comprobó por medio de RT-PCR, de forma similar a como se describe en el Ejemplo 2. Las expresiones GAP21 y GAP65 se encontraron en ambos tejidos relacionados con cutícula. La expresión de GAP22 se encontró solamente en el disco epitelial gastrolítico. Las secuencias de ADNc de los genes correspondientes se obtuvieron y se encontraron sus proteínas deducidas (Figs. 13-15). Se encontró que todas las cuatro proteínas contienen péptidos señal en su extremo N-terminal (aminoácidos subrayados en las Figs. 13-15 y en negrita en Fig. 2). Buscar similitud en bases de datos de dominios conservados reveló que GAP65 contiene tres dominios conservados, dominio de unión a quitina 2, dominio receptor de lipoproteínas de baja densidad de clase A y dominio de desacetilasa polisacáridica. GAP 12, GAP21 y GAP22, por otro lado, no muestran ninguna similitud a dominio conocido alguno.

La alineación BLAST de GAP12 y GAP21 reveló una identidad del 46,3 % en las secuencias de aminoácidos deducidas de estas proteínas (Fig. 15B).

Análisis físico-químicos de las proteínas deducidas revelaron que los pesos moleculares calculados de GAP12, 21 y 65 son más pequeños que los esperados, 9,9, 19,5 y 60,8 kDa respectivamente, mientras que aquel de GAP22 es más alto que el esperado, 28,6 kDa (Tabla 1, Fig. 12). GAP12, GAP21 y GAP65 tienen un pI ácido, por lo tanto están cargadas negativamente al pH fisiológico del gastrolito (cerca de pH 8,5). GAP12 y GAP21 tienen un porcentaje alto de aminoácidos no polares, alifáticos (glicina, alanina y valina) y un porcentaje alto del aminoácido prolina polar pero no cargado (destacado en gris en Tabla 1). GAP65 tiene un contenido alto de aminoácidos ácidos, pero ninguna otra característica distinguible. GAP22 tiene un pI básico, por lo tanto está cargada positivamente al pH fisiológico del gastrolito. Sus características principales son un porcentaje alto del aminoácido polar pero no cargado prolina y del aminoácido positivamente cargado arginina. De acuerdo con análisis bioinformáticos, GAP12 y 21 muestran similitudes en composición de aminoácidos a otras proteínas conocidas por estar implicadas en precipitación de calcio en crustáceos.

Ejemplo 9

5 Se añadieron 100 μ l de CaCl_2 1 M a 10 ml agua doblemente destilada (DDW), alcanzando la concentración final de 10 mM. Se añadieron 200 μ l de solución de P-serina (P-Ser) (100 mM) a la solución, alcanzando 2 mM de P-Ser. 100 μ l de Na_2CO_3 1 M (concentración final: 10 mM) se añadieron tras una agitación intensa. El vial se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. La solución superior se retiró y la precipitación se extendió formando un frotis sobre un portaobjetos de vidrio y se secó instantáneamente por flujo de aire. La RS mostró ACC (Fig. 16). La muestra se almacenó a temperatura ambiente y se puso a prueba por estabilidad de ACC cinco meses después de la precipitación (Fig. 28).

Ejemplo 10

15 Se añadieron 100 μ l de CaCl_2 1 M a 10 ml de DDW (concentración final: 10 mM). Se añadieron 100 μ l de solución de P-treonina (P-Thr) (100 mM) a la solución, alcanzando P-Thr 1 mM. 100 μ l de Na_2CO_3 1 M (concentración final: 10 mM) se añadieron tras una agitación intensa. El vial se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. La solución superior se retiró y la precipitación se extendió formando un frotis sobre un portaobjetos de vidrio y se secó instantáneamente por flujo de aire. La RS mostró ACC (Fig. 17). La muestra se almacenó a temperatura ambiente y se puso a prueba por estabilidad de ACC 4,5 meses después de la precipitación (Fig. 29).

Ejemplo 11

20 Se añadieron 100 μ l de CaCl_2 1 M a 10 ml de DDW (concentración final: 10 mM). Se añadieron 200 μ l de solución de P-serina (100 mM) a la solución. 100 μ l de Na_2CO_3 1 M (concentración final: 10 mM) se añadieron tras una agitación intensa. El vial se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. La solución superior se retiró y la precipitación se congeló en nitrógeno líquido y lo congelado se secó en un liofilizador. La RS mostró ACC (Fig. 18).

Ejemplo 12

30 Las condiciones según se describen en el Ejemplo 11 se modificaron cambiando las concentraciones finales de CaCl_2 y Na_2CO_3 desde 10 mM hasta 100 mM. La RS mostró ACC (Fig. 19).

Ejemplo 13

35 Las condiciones según se describen en el Ejemplo 10 se modificaron cambiando el procedimiento de deshidratación de sometimiento a flujo de aire a liofilización. La RS mostró ACC (Fig. 20).

Ejemplo 14

40 Un sistema que comprende CaCl_2 20 mM, Na_2CO_3 20 mM, P-Ser 2 mM con quitosana (3 % en peso disuelto en ácido acético 0,2 M) que se añadió a la solución de precipitación, después de la adición de calcio a una concentración final de 0,3 % en peso. La RS mostró ACC (Fig. 21).

Ejemplo 15

45 Las condiciones según se describen en el Ejemplo 14 se modificaron empleando las concentraciones finales de CaCl_2 0,5 M, Na_2CO_3 0,5 M y P-Ser 3 mM. Esta composición representa el límite de concentración superior. La RS mostró ACC (Fig. 22).

Ejemplo 16

50 Los gastrolitos se diseccionaron a partir de cangrejos de río inducido endocrinológicamente, pesado, aclarado con agua destilada y mantenido a -20 °C. Después la capa externa del gastrolito se raspó eliminando cualquier material externo residual, los gastrolitos se congelaron usando nitrógeno líquido y se molieron a polvo usando un mortero y una maja. La desmineralización se llevó a cabo por agitación de cada gramo de polvo de gastrolito fue en 20 ml de acetato de amonio 0,02 M, EGTA al 0,5 M, pH 7,0, en hielo. Cuando la disolución de CaCO_3 se completó, la suspensión se centrifugó (2000 rpm, 15-20 minutos, 4 °C) y el sobrenadante se recogió. La matriz insoluble residual (ISM) se usó como aditivo a la solución calcificante (etapa ii). 200 μ l de la ISM (estimados: ~30 μ g de proteína) se añadieron a 10 ml de la mezcla de cristalización comprendiendo CaCl_2 10 mM y Na_2CO_3 10 mM, seguido por deshidratación por flujo de aire. La RS mostró ACC (Fig. 23).

Ejemplo 17

65 Las condiciones según se describen en el Ejemplo 16 se modificaron cambiando las concentraciones finales de CaCl_2 y Na_2CO_3 desde 10 mM hasta 20 mM y el volumen de ISM a 100 μ l (~ 15 μ g de proteína), deshidratando por medio de

lío-filización. La RS mostró ACC (Fig. 24).

Ejemplo 18

5 La ISM se trató con diversas enzimas proteolíticas con el fin de liberar las proteínas de unión a quitina (bien formación de enlaces de hidrógeno o bien formación de enlaces covalentes) a partir de la fase insoluble de quitina y demostrando la actividad de los péptidos resultante en inducción y estabilización de ACC (Fig. 25).

10 Se añadieron 28 ml de acetato de amonio (2 mM) a 7 ml de ISM. A partir de esta solución se mezclaron 10 ml de tripsina (3,8 mg/ml) en acetato de amonio (2 mM). Las suspensiones de la ISM con las enzimas proteolíticas se incubaron durante 2 horas a 4 °C en condición agitada. Después de la incubación los viales se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm. Se retiró el sobrenadante que contenía las proteínas digeridas de ISM; se añadió 1 ml del sobrenadante (equivalente a 100 µl de matriz insoluble y a ~ 150 µg de proteína) a 10 ml de CaCl₂ (10 mM). 100 de Na₂CO₃ 1 M (concentración final: 10 mM) se añadieron tras una agitación intensa. El vial se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm, la precipitación se extendió formando un frotis sobre un portaobjetos de vidrio e instantáneamente se secó con flujo de aire. La RS mostró ACC (Fig. 25). La muestra se almacenó a temperatura ambiente y se puso a prueba para estabilidad de ACC siete meses después de la precipitación (Fig. 30).

Ejemplo 19

20 Se añadieron 28 ml de acetato de amonio (2 mM) a 7 ml de ISM. A partir de esta solución se mezclaron 10 ml con 10 ml de proteasa a partir de *Streptomyces griseus* (Sigma P6911, 0,6 mg/ml) en acetato de amonio (2 mM). Las suspensiones de la ISM con las enzimas proteolíticas se incubaron durante 2 horas a 4 °C en agitación. Después de la incubación los viales se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante que contiene las proteínas digeridas por ISM se eliminó; se añadió 1 ml del sobrenadante a 10 ml de CaCl₂ (10 mM). 100 µl de Na₂CO₃ 1 M (concentración final: 10 mM) se añadieron tras una agitación intensa. El vial se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm, la precipitación se extendió formando un frotis sobre un portaobjetos de vidrio e instantáneamente se secó con flujo de aire. La RS mostró el pico de ACC (a 1080) y el pico secundario adicional, posiblemente de fosfato de calcio (pico a 950) (Fig. 26). La muestra se almacenó a temperatura ambiente y se puso a prueba para estabilidad de ACC siete meses después de la precipitación (Fig. 31).

Ejemplo 20

35 Se añadieron 28 ml de acetato de amonio (2 mM) a 7 ml de ISM. A partir de esta solución se mezclaron 10 ml de papaína (0,26 mg/ml) en acetato de amonio (2 mM). Las suspensiones de la ISM con las enzimas proteolíticas se incubaron durante 2 horas a 4 °C en condición agitada. Después de la incubación los viales se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante que contiene ahora las proteínas digeridas por ISM se eliminó; se añadió 1 ml del sobrenadante a 10 ml de CaCl₂ (10 mM). 100 µl de Na₂CO₃ 1 M (concentración final: 10 mM) se añadieron tras una agitación intensa. El vial se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm, la precipitación se extendió formando un frotis sobre un portaobjetos de vidrio e instantáneamente se secó con flujo de aire. La RS mostró ACC y posiblemente fosfato de calcio (Fig. 27). La muestra se almacenó a temperatura ambiente y se puso a prueba para estabilidad de ACC siete meses después de la precipitación (Fig. 32).

45 Mientras esta invención se ha descrito en términos de algunos ejemplos específicos, son posibles muchas modificaciones y variaciones. Se entiende también que dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede realizarse de otra manera que según se describe específicamente.

Listado de secuencias

50 <110> Amorial Ltd
Bentov, Shmuel
Sagi, Amir
Berman, Amir
Shechter, Assaf

55 <120> CARBONATO DE CALCIO ESTABLE AMORFO QUE COMPRENDE AMINOÁCIDOS FOSFORILADOS, PÉPTIDOS FOSFORILADOS SINTÉTICOS Y PROTEÍNAS GASTROLÍTICAS

60 <130> Documento 22681-WO-07

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

65 <210> 1
<211> 548

ES 2 528 901 T3

<212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 1

5

Met Ile Arg Arg Val Thr Thr Pro Leu Leu Ala Leu Leu Leu Ala Gly
 1 5 10 15
 Trp Val Val Ala Gln Thr Thr Asp Met Asp Pro Glu Gln Tyr Cys Ala
 20 25 30
 Arg Arg Asp Asp Glu Tyr Phe Arg Lys Asp Phe Gly Asp Pro Ala Glu
 35 40 45
 Phe Ala Ser Asp Tyr Arg Ala Asn Cys Gly Val Tyr Tyr Arg Cys Val
 50 55 60
 Pro Ala Pro Ala Gly Lys Arg Ser Ile Ser Ala Ser Gln Cys Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Leu Phe Phe Asp Val Gln Gln Gln Ile Cys Glu Arg Lys Ser Lys
 85 90 95
 Val Thr Asn Cys Glu Gln Ile Asp Lys Glu His Pro Pro Gln Pro Phe
 100 105 110
 Trp Pro Leu Arg Glu Gly Glu Glu Ser Gln Cys Lys Ser Gly Glu Ile
 115 120 125
 Met Cys Gly Ser Gly Glu Cys Leu Pro Gln His Arg Phe Cys Asp Glu
 130 135 140
 Asn Ser Asp Cys Ala Asp Gly Ser Asp Glu Asn Ile Cys Thr Pro Asp
 145 150 155 160
 Lys Asp Pro Asn Arg Ala Asp Val Cys Glu Pro Arg Thr Cys Leu Trp
 165 170 175

Ser Gln Gly Cys Phe Cys Ser Val Asp Gly Thr Arg Ile Pro Gly Asp
 180 185 190

Leu Thr Val Asp Gln Thr Pro Gln Met Ile Thr Ile Thr Phe Thr Gly
 195 200 205

Ala Ile Asn Glu Arg Asn Phe Arg Ile Phe Gln Asp Val Phe Lys Asp
 210 215 220

Thr Val Lys His Lys Gly Asn Asp Cys Thr Pro Lys Gly Thr Phe Phe
 225 230 235 240

Ile Ser His Gly Phe Ser Asn Tyr Ser Ala Ile Gln Glu Leu Asn Arg
 245 250 255

Val Gly His Glu Ile Ala Val Ser Ser Ile Thr Asn Asn Asp Asn Pro
 260 265 270

Asp Tyr Trp Ser Lys Leu Ser Ala Leu Asp Tyr Glu Ala Glu Met Asp
 275 280 285

Gly Ala Arg Leu Ile Ile Glu Lys Phe Ala Asn Ile Thr Ala Asn Glu
 290 295 300

Val Leu Gly Ile Arg Val Pro Lys Gln Arg Val Gly Gly Asn Arg Gln
 305 310 315 320

Phe Arg Met Met Val Asp Trp Gly Phe Leu Tyr Asp Ser Ser Ile Ser
 325 330 335

Ala Pro Met Gly Arg Leu Pro Leu Trp Pro Tyr Thr Leu Met His Arg
 340 345 350

Met Pro His Lys Cys Leu Gly Asn Asp Gln Asn Cys Pro Ser Gln Asn
 355 360 365

Phe Thr Val Trp Glu Met Val Ile Asn Glu Met Asp Arg Arg Asp Asp
 370 375 380

Pro Gln Phe Asp Glu Arg Leu Thr Gly Cys His Phe Val Asp Gln Cys
 385 390 395 400

Ala Asn Ile Gln Ser Pro Glu Gln Phe Arg Ala Phe Leu Asp Asn Asn
 405 410 415

Leu Ala Arg His Tyr Arg Thr Asn Arg Ala Pro Leu Gly Leu His Phe
 420 425 430

Thr Ser Gly Tyr Phe Glu Thr Arg Arg Asp Phe Leu Arg Glu Phe Val
 435 440 445

Lys Trp Val Arg Glu Thr Ala Leu Ser Gly Asp Tyr Phe Phe Val Thr
 450 455 460

Met Gln Gln Val Ile Asn Trp Met Glu Ala Pro Thr Glu Leu Thr Ala
 465 470 475 480

Ile Asn Asn Phe Gln Glu Trp Lys Gly Lys Cys Glu Val Lys Gly Gln
 485 490 495

Pro Tyr Cys Ser Leu Pro Asn Pro Cys Pro Lys Lys Val Pro Arg Ile
 500 505 510

Phe Pro Asn Glu Glu Glu Met Phe Leu Tyr Thr Cys Met Glu Cys Pro
 515 520 525

Asn Thr Tyr Pro Trp Leu Gly Asp Pro His Gly Asn Gly Phe Leu Asp
 530 535 540

Ile Pro Asp Phe
 545

<210> 2

<211> 11

5 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 2

10 Leu Phe Gln Asp Val Phe Lys Asp Ala Glu Lys
 1 5 10

<210> 3

<211> 13

15 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 3

20 Leu Ser Ala Leu Asp Tyr Glu Ala Glu Met Asp Gln Arg
 1 5 10

<210> 4

<211> 15

25 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 4

30 Ala Pro Leu Gly Leu His Phe Thr Ser Gly Tyr Phe Glu Thr Arg
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 19

35 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 5

Met Met Val Asp Trp Gly Phe Leu Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Pro
1 5 10 15

Met Gly Arg

<210> 6

<211> 11

5 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 6

10 His Gly Val Glu Leu Ala Val Ser Ser Leu Thr
1 5 10

<210> 7

<211> 16

15 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 7

20 His Met Val Asp Gln Cys Ala Asn Leu Lys Ser Pro Glu Lys Phe Arg
1 5 10 15

<210> 8

25 <211> 13

<212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 8

30 Glu Leu Phe Phe Asp Val Gln Gln Gln Leu Cys Glu Arg
1 5 10

<210> 9

35 <211> 285

<212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 9

40

Met Thr Thr Ile Met Leu Val Ile Leu Leu Val Gly Ala Cys Val Ala
1 5 10 15

Ile Pro Pro Gly Arg Pro Thr Asp Ser Ile Arg Phe Val Arg Gln Thr
20 25 30

Lys Pro Leu Pro Arg Pro Gln His Pro Gln Ile Ser Pro Thr Pro Pro
35 40 45

Ala Gly Tyr Gln Pro Lys Pro Gln Val Asp Pro Thr Pro His Pro Gly

<211> 6
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

5 <400> 11

Ser Gln Leu Thr Lys Pro
 1 5

10 <210> 12
 <211> 5
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

15 <400> 12

Glu Leu Pro Pro Lys
 1 6

20 <210> 13
 <211> 17
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

25 <400> 13

Gln Gly Ser Val Pro Thr Thr Gln Leu Gln Val Lys Pro Asp Pro Pro
1 5 10 15

Lys

30 <210> 14
 <211> 16
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

<400> 14

35 Pro Leu Val Asp Pro Leu His Gly Asn Cys Pro Cys Cys Asn Tyr Arg
 1 5 10 15

40 <210> 15
 <211> 19
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

45 <400> 15

Trp Asp Ser Gly Phe Ala Pro Leu Pro Thr Gly Pro Leu Val Glu Arg
1 5 10 15

Pro Arg Val

50 <210> 16
 <211> 15
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

<400> 16

55 Glu Asp Ser Ser Phe Ala Gln Leu Trp Phe Thr Val Glu Pro Arg
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 202
 <212> PROTEÍNA
 5 <213> Cherax quadricarinatus
 <400> 17

Met Arg Ala Val Val Cys Val Leu Leu Ala Ile Ser Gly Met Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Ser Ala Arg Gly Glu Thr Phe Ala His Ala Arg Pro Ser Val
 20 25 30
 Asn Ser Phe Gln Asp Ser Ala Ser Leu Ser Ala Asp Pro Ser Ala Ala
 35 40 45
 Ala Ala Pro Arg Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala
 50 55 60
 Ala Ala Pro Ala Gln Gln Asn Tyr Gly Pro Asn Phe Phe Gly Pro Gly
 65 70 75 80
 Leu Asn Asn Pro Leu Ala Phe Pro Leu Asn Pro Leu Val Ala Gln Gln
 85 90 95
 Ala Gln Arg Ile Ala Ser Phe Asn Pro Asn Leu Arg Val Phe Val Asp
 100 105 110
 Ile Asp Gly Ser Val Gln Leu Thr Asp Gln Phe Gly Arg Glu Val Asp
 115 120 125
 Glu Val Leu Asp Glu Phe Gly Arg Asp Val Ser Glu Leu Leu Asp Val
 130 135 140
 Glu Glu Gln Gln Glu Ala Leu Leu Arg Arg Arg Gln Gln Gln Leu Asp
 145 150 155 160
 Leu Gln Leu Leu Gln Gln Phe Asn Asn Pro Ala Phe Gly Gly Ser Val
 165 170 175
 Gly Gly Gln Ala Ala Val Gly Gly Gln Thr Gly Val Gly Gly Gly Phe
 180 185 190
 Pro Arg Gln Arg Ser Phe Arg Ile Val Val
 195 200

10 <210> 18
 <211> 11
 <212> PROTEÍNA
 15 <213> Cherax quadricarinatus
 <400> 18

Glu Val Glu Glu Leu Leu Asp Glu Phe Gly Arg
 1 5 10

20 <210> 19

<211> 12
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

5 <400> 19

Ser Thr Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Arg
 1 5 10

10 <210> 20
 <211> 12
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

15 <400> 20

Pro Leu Asn Pro Leu Val Ala Gln Gln Ala Gln Arg
 1 5 10

20 <210> 21
 <211> 17
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

25 <400> 21

Val Phe Val Asp Val Asp Gly Ser Ala His Phe Thr Asp Gln Phe Gly
1 5 10 15

Arg

30 <210> 22
 <211> 17
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

35 <400> 22

Asp Val Ser Glu Leu Leu Asp Val Gln Glu Gln Gln Glu Gln Leu Ala
1 5 10 15
Arg

40 <210> 23
 <211> 10
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

<400> 23

45 Cys Asn Leu Asn Asn Pro Leu Ala Leu Val
 1 5 10

50 <210> 24
 <211> 113
 <212> PROTEÍNA
 <213> Cherax quadricarinatus

<400> 24

Met Lys Ile Phe Ile Leu Leu Val Val Ile Gly Val Val Ser Ala Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Ala Gly Gln Val Gly Gly Ala Ala Pro Ala Gln Gly Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Ala Gly Val Gly Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Asn Pro Tyr
 35 40 45

Gly Pro Lys Val Tyr Gly Ser Gly Leu Asn Asn Pro Phe Ala Phe Pro
 50 55 60

His Asn Thr Trp Glu Val Ser Arg Ala Ala Ala Val Ala Ala Thr Asn
 65 70 75 80

Pro Asn Leu Tyr Val Arg Val Glu Ser Asp Gly Gly Trp Glu Phe Thr
 85 90 95

Asn Arg Phe Gly Glu Lys Val Asp Val Tyr Asn Ser Phe Gly Gln Glu
 100 105 110

Leu

<210> 25

<211> 12

5 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 25

10 Val Glu Ser Asp Gly Gly Trp Glu Phe Thr Asn Arg
 1 5 10

<210> 26

<211> 14

15 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 26

20 Ala Ala Ala Val Ala Ala Ala Thr Asn Pro Leu Asn Tyr Val Arg
 1 5 10

<210> 27

<211> 21

25 <212> PROTEÍNA

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 27

Val Tyr Gly Ser Gly Leu Asn Asn Pro Phe Ala Phe Pro His Ser Gln
 1 5 10 15

Trp Glu Val Ser Arg
 20

30

<210> 28

<211> 12

<212> PROTEÍNA

ES 2 528 901 T3

<213> Cherax quadricarinatus

<400> 29

5 Ala Gly Val Gly Gly Lys Pro Ala His Pro Val Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que estabiliza la forma amorfa del carbonato cálcico, en el que dicho péptido es uno de los siguientes:
- 5 i) un péptido que comprende una secuencia aminoacídica representada por SEC ID N°: 1,
ii) un homólogo, variante o derivado que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de homología con respecto a dicha SEC ID N°: 1, y
iii) un péptido que comprende un fragmento que tiene una subsecuencia de al menos diez aminoácidos de SEC ID N°: 1.
- 10 2. Un péptido aislado y purificado de gastrolito de crustáceo o cutícula que estabiliza la forma amorfa de carbonato cálcico, en el que dicho péptido es uno de los siguientes
- 15 i) un péptido que tiene una secuencia representada por SEC ID N°: 1,
ii) un homólogo que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de homología con respecto a dicha SEC ID N°: 1, y
iii) un péptido que comprende un fragmento que tiene una subsecuencia de al menos diez aminoácidos de SEC ID N°: 1.
- 20 3. Una composición que comprende carbonato cálcico amorfo (ACC) y un péptido fosforilado seleccionado entre
- 25 i) un péptido que comprende una secuencia aminoacídica representada por SEC ID N°: 1,
ii) un homólogo, variante o derivado que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de homología con respecto a dicha SEC ID N°: 1; y
iii) un péptido que comprende un fragmento que tiene una subsecuencia de al menos diez aminoácidos de SEC ID N°: 1.
- 30 4. Un ADN que codifica un péptido de acuerdo con la reivindicación 2.
- 30 5. Un procedimiento de preparación de carbonato cálcico amorfo estable, que comprende mezclar en fase acuosa en cualquier orden una sal soluble que comprende calcio, una fuente de carbonato, y un péptido fosforilado seleccionado entre
- 35 i) un péptido que comprende una secuencia aminoacídica representada por SEC ID N°: 1,
ii) un homólogo, variante o derivado que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de homología con respecto a dicha SEC ID N°: 1; y
iii) un péptido que comprende un fragmento que tiene una subsecuencia de al menos diez aminoácidos de SEC ID N°: 1.
- 40 6. Una formulación farmacéutica o una formulación nutricional o un aditivo alimentario o un alimento funcional o un complemento dietético que comprende la composición de la reivindicación 3.
- 45 7. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de afecciones seleccionadas del grupo constituido por dolor, enfermedades proliferativas, trastornos neurológicos, trastornos inmunológicos, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, trastornos nutricionales, trastornos reproductivos, trastornos musculoesqueléticos y problemas dentales.
- 50 8. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha enfermedad proliferativa es carcinoma de mama o carcinoma broncogénico.
- 50 9. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho dolor está seleccionado de dolor postoperatorio, dolor después de herida, dolor asociado con cáncer y dolor neuropático.
- 55 10. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho trastorno neurológico se selecciona de enfermedades desmielinizantes, demencias y trastornos del movimiento.
- 60 11. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha afección es una enfermedad degenerativa o un trastorno neurodegenerativo seleccionado de esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.
- 60 12. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha afección comprende un trastorno óseo o un trastorno de la médula ósea.
- 65 13. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho trastorno comprende fractura u osteoporosis.

14. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho carbonato de calcio amorfo está estable al menos durante 1 mes.

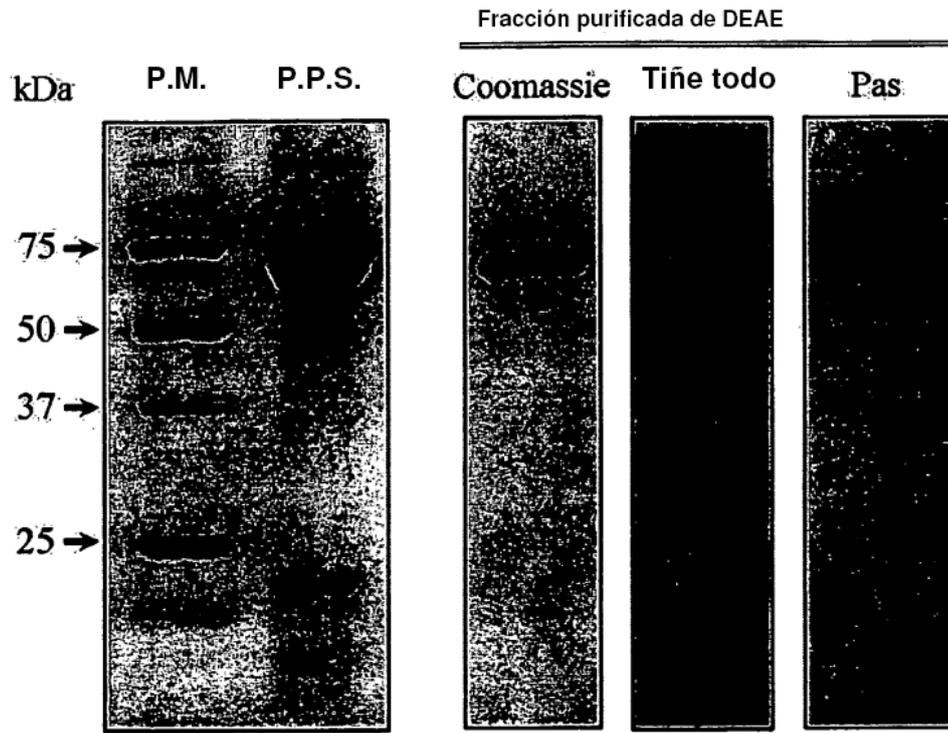


Fig. 1A

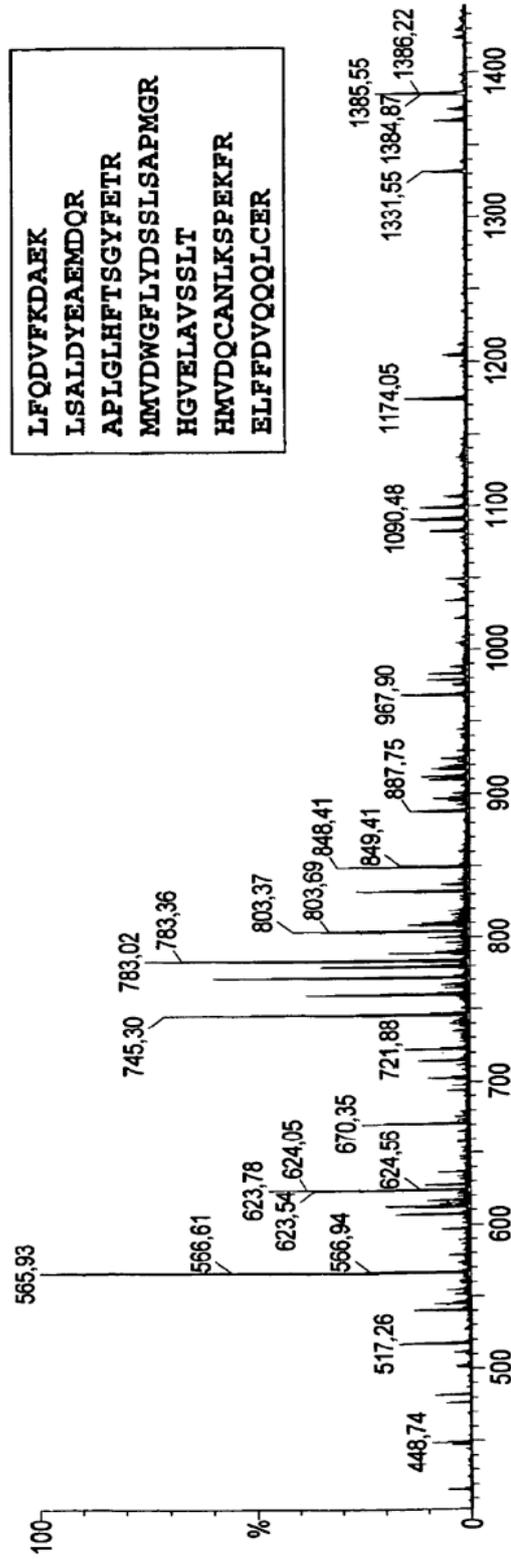


Fig. 1B

M I R R V **T** **T** **T** P L L A L L A G W V V A Q **T** **T** **T** D 24
 M D P E Q Y C A R R D D E **Y** **F** R K D F G D P A E F A S D **Y** **R** A N C G V Y 60
 Y R C V P A P A G K R **S** **I** **S** **A** **S** **Q** C Q S E L F F D V Q Q Q I C E R K **S** **K** 96
 V T N C E Q I D K E H P P Q P F W P L R E G E E **S** **Q** C K S G E I M C G S 132
 G E C L P Q H R F C D E N S D C A D G **S** **D** E N I C **T** **T** **P** D K D P N R A D V 168
 C E P R **T** **C** L W S Q G C F C S V D G T R I P G D L **T** **V** D Q T P Q M I T I 204
 T F T G A I N E R N F R I F Q D V F K D **T** **V** K H K G N D C **T** **P** K G T F F 240
 I S H G **F** **S** **N** **Y** **S** **A** I Q E L N R V G H E I A V S **S** **I** T N N D N P D **Y** **W** S 276
 K L **S** **A** L D **Y** **E** A E M D G A R L I I E K F A **N** **I** **T** A N E V L G I R V P K 312
 Q R V G G N R Q F R M M V D W G F L Y D S S **I** **S** **A** P M G R L P L W P Y T 348
 L M H R M P H K C L G N D Q N C P S Q **N** **F** **T** V W E M V I N E M D R R D D 384
 P Q F D E R I **T** **G** C H F V D Q C A N I Q S P E Q F R A F L D N N L A R H 420
 Y R T N R A P L G L H F T S G Y F E **T** **R** R D F L R E F V K W V R E T A L 456
S **G** D Y F F V T M Q Q V I N W M E A P T E L T A I N N F Q E W K G K C E 492
 V K G Q P **Y** **C** S L P N P C P K K V P R I F P N E E E M F L **Y** **T** C M E C P 528
 N T Y P W L G D P H G N G F L D I P D F 548

Fig. 2A

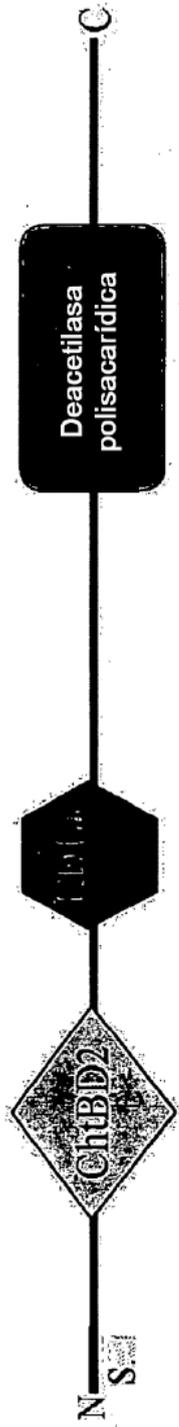


Fig. 2B

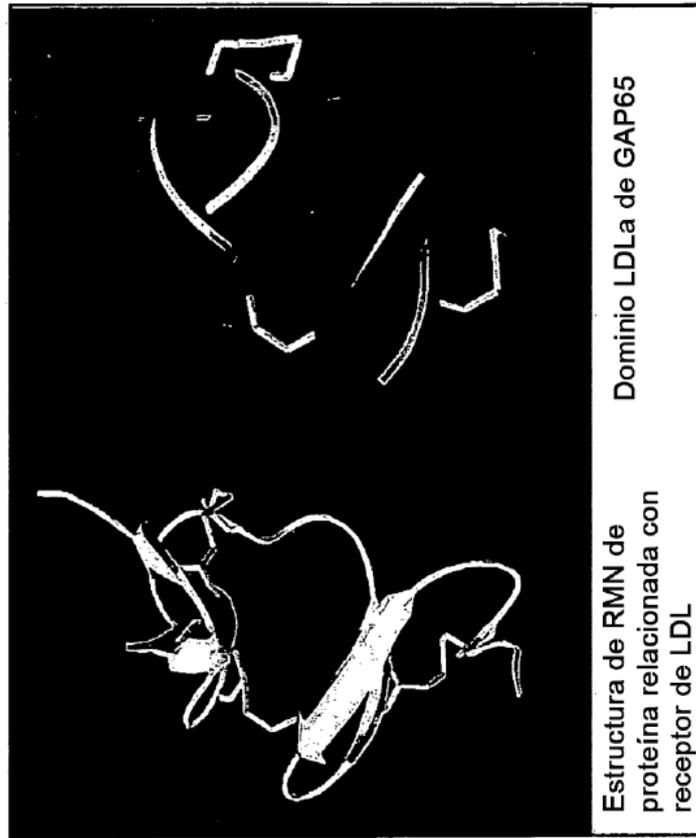


Fig. 2C

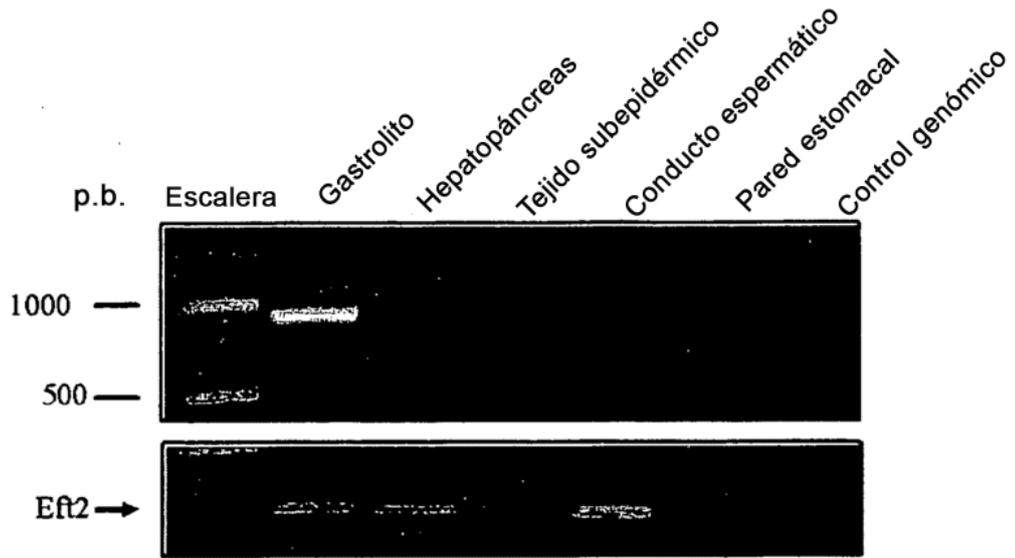


Fig. 3A

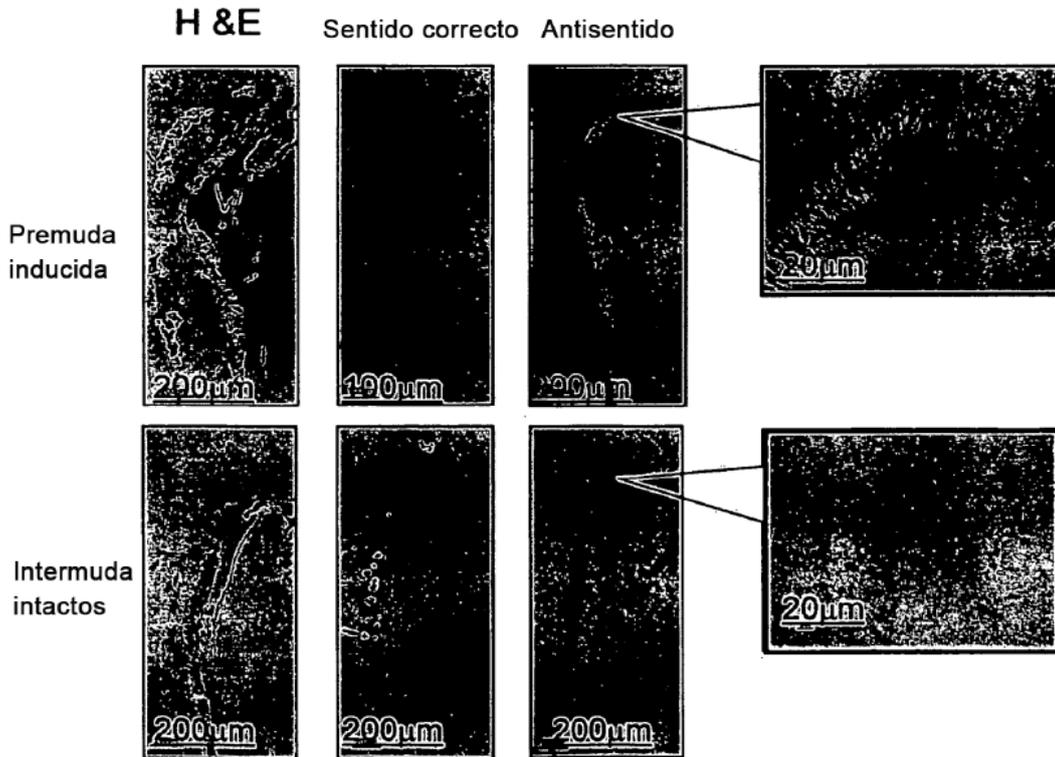


Fig. 3B

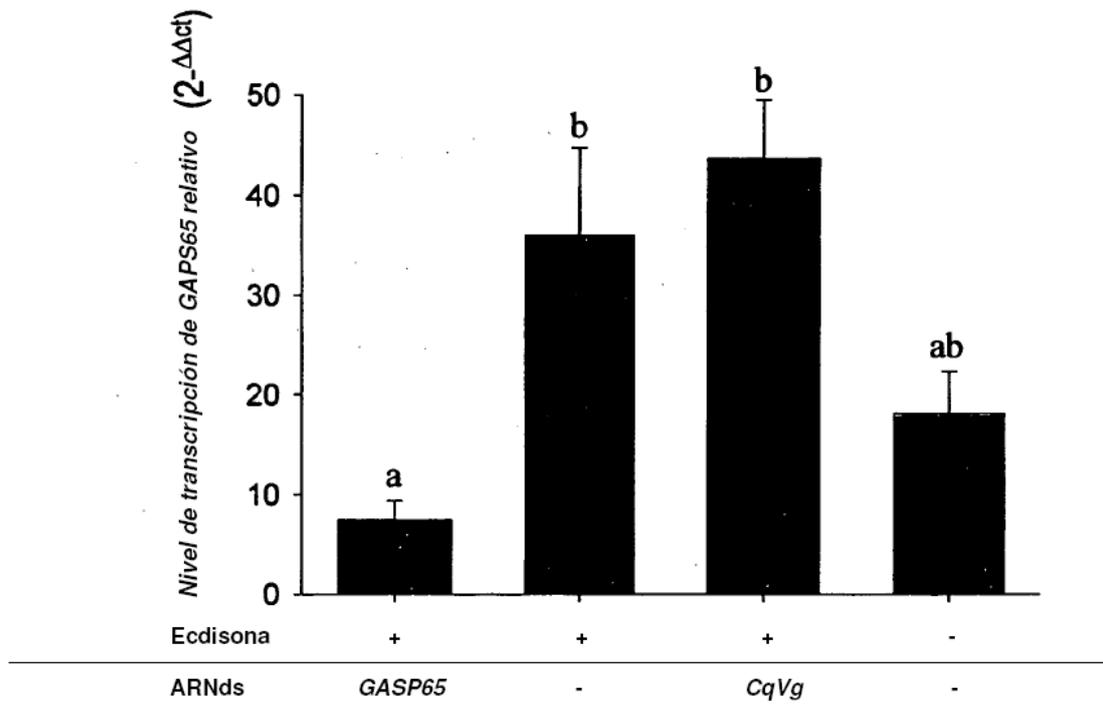


Fig. 4

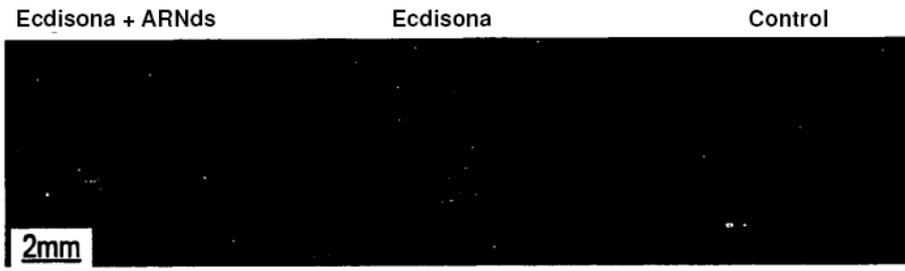


Fig. 5A

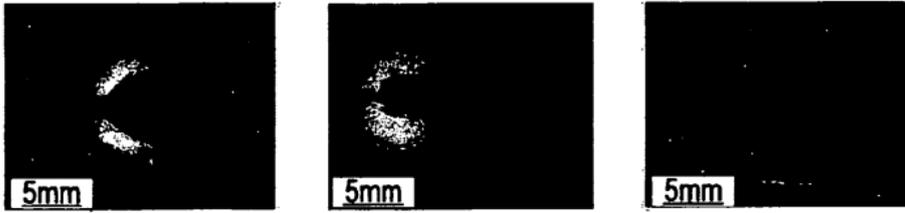


Fig. 5B

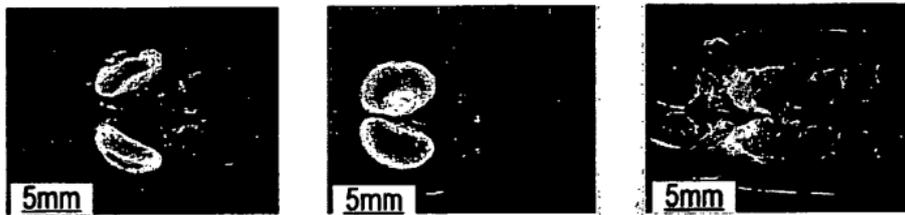
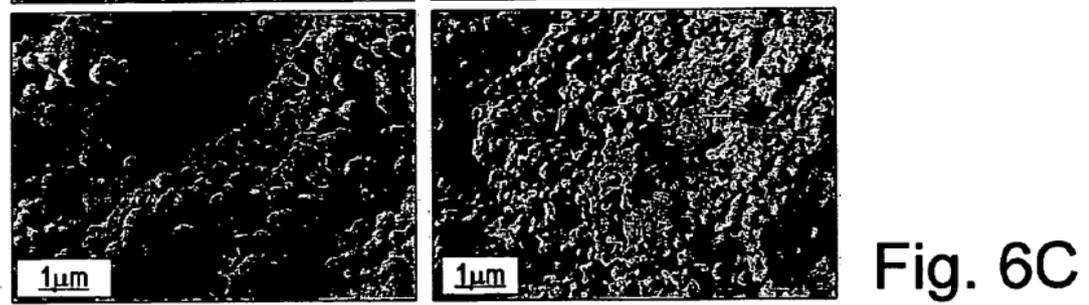
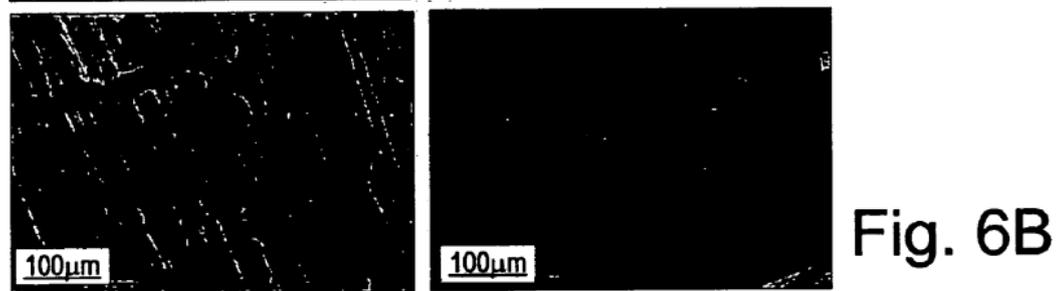
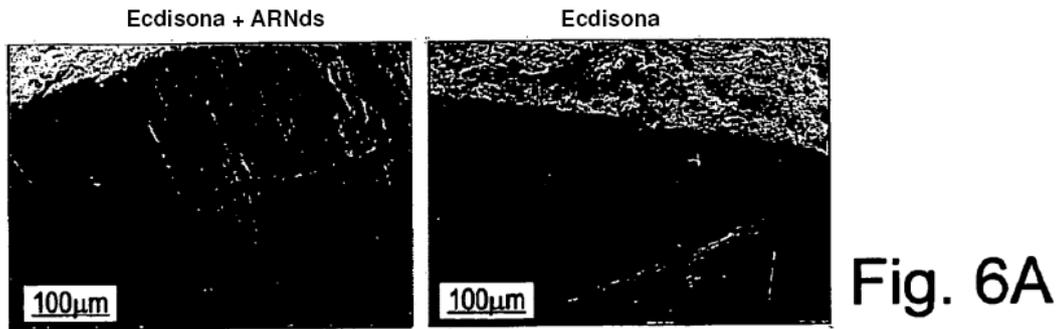


Fig. 5C



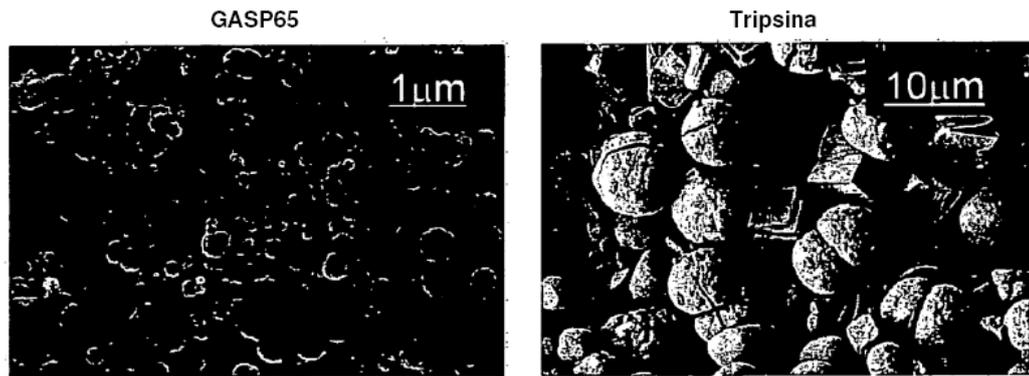


Fig. 7A

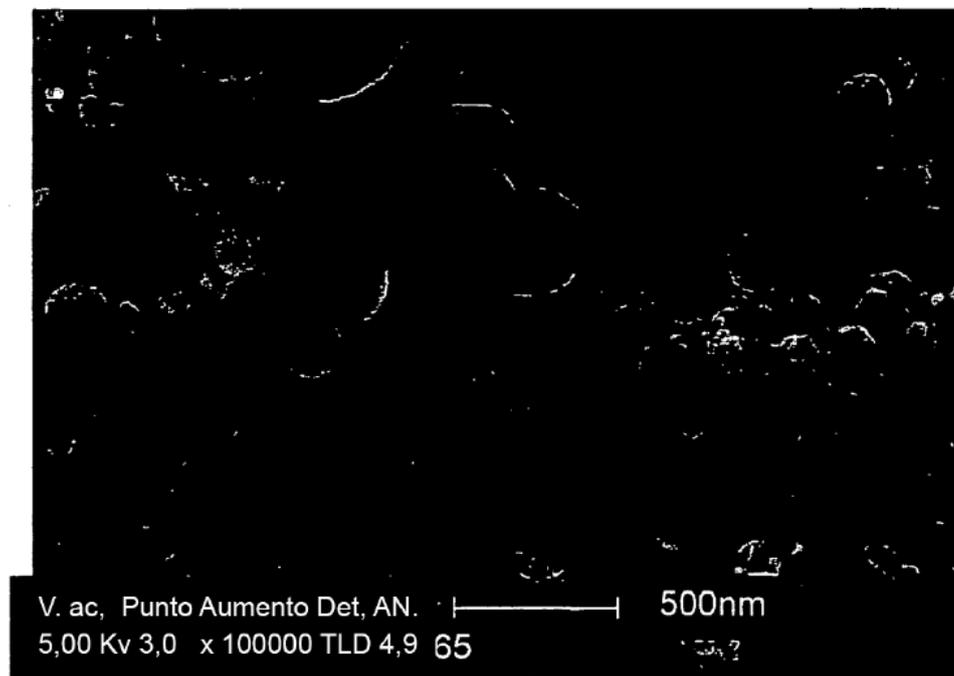


Fig. 7B

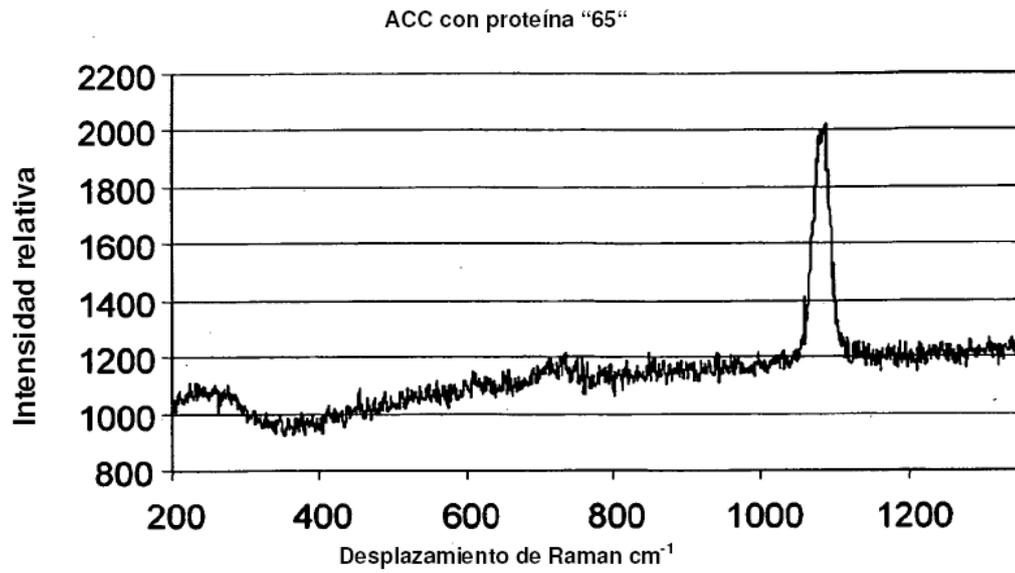


Fig. 8A

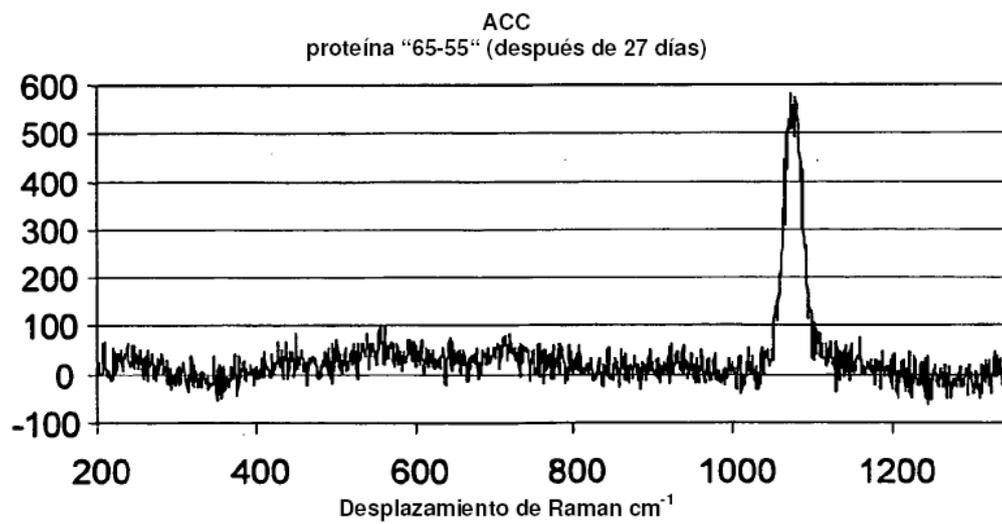


Fig. 8B

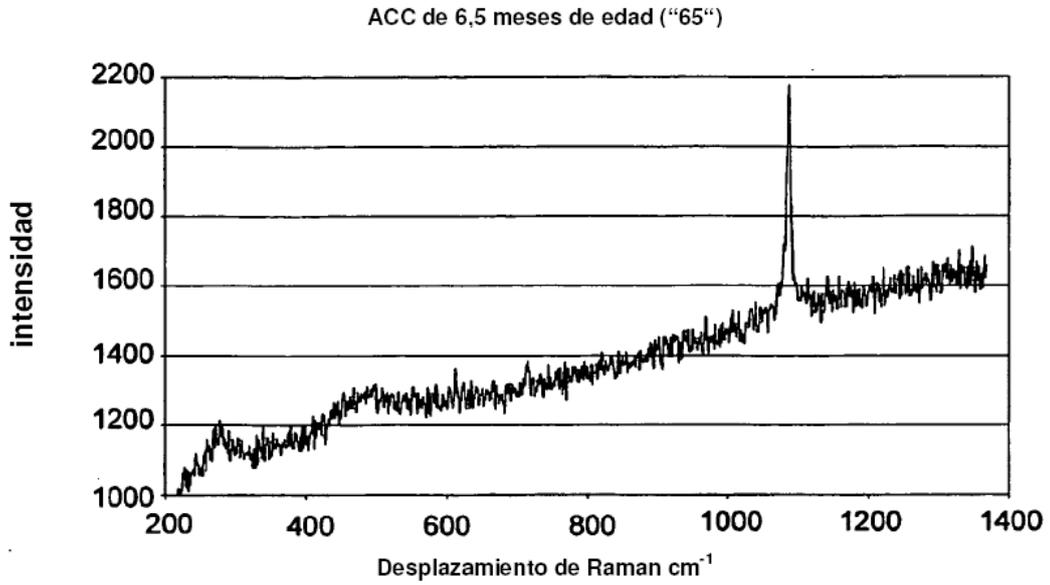


Fig. 9A

comparación de ACC de 6,5 meses de edad (inducida por 65), y calcita

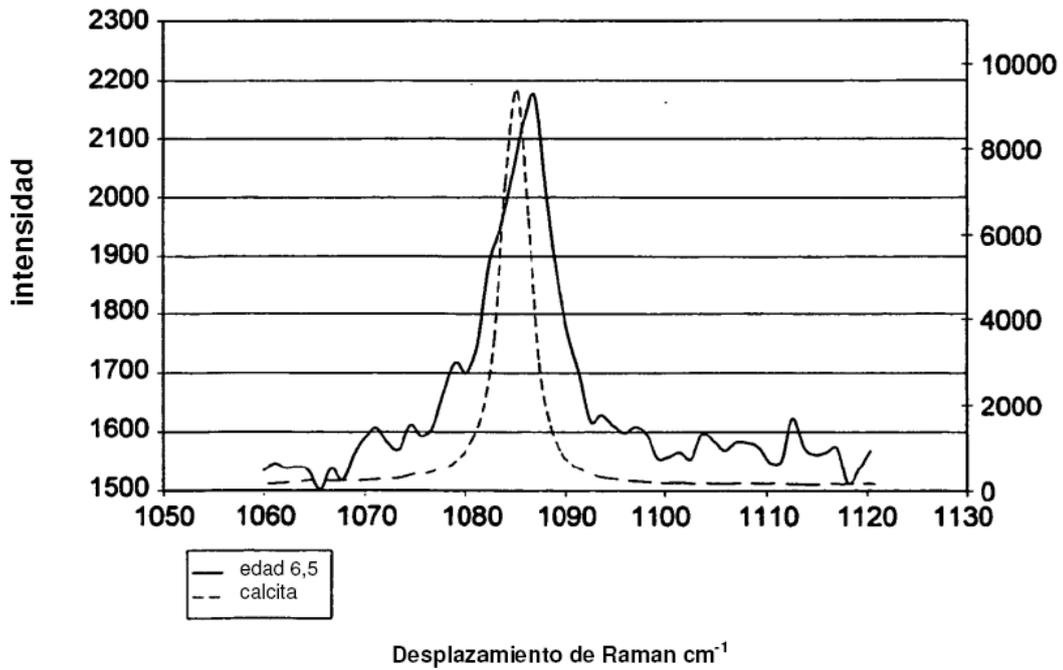


Fig. 9B

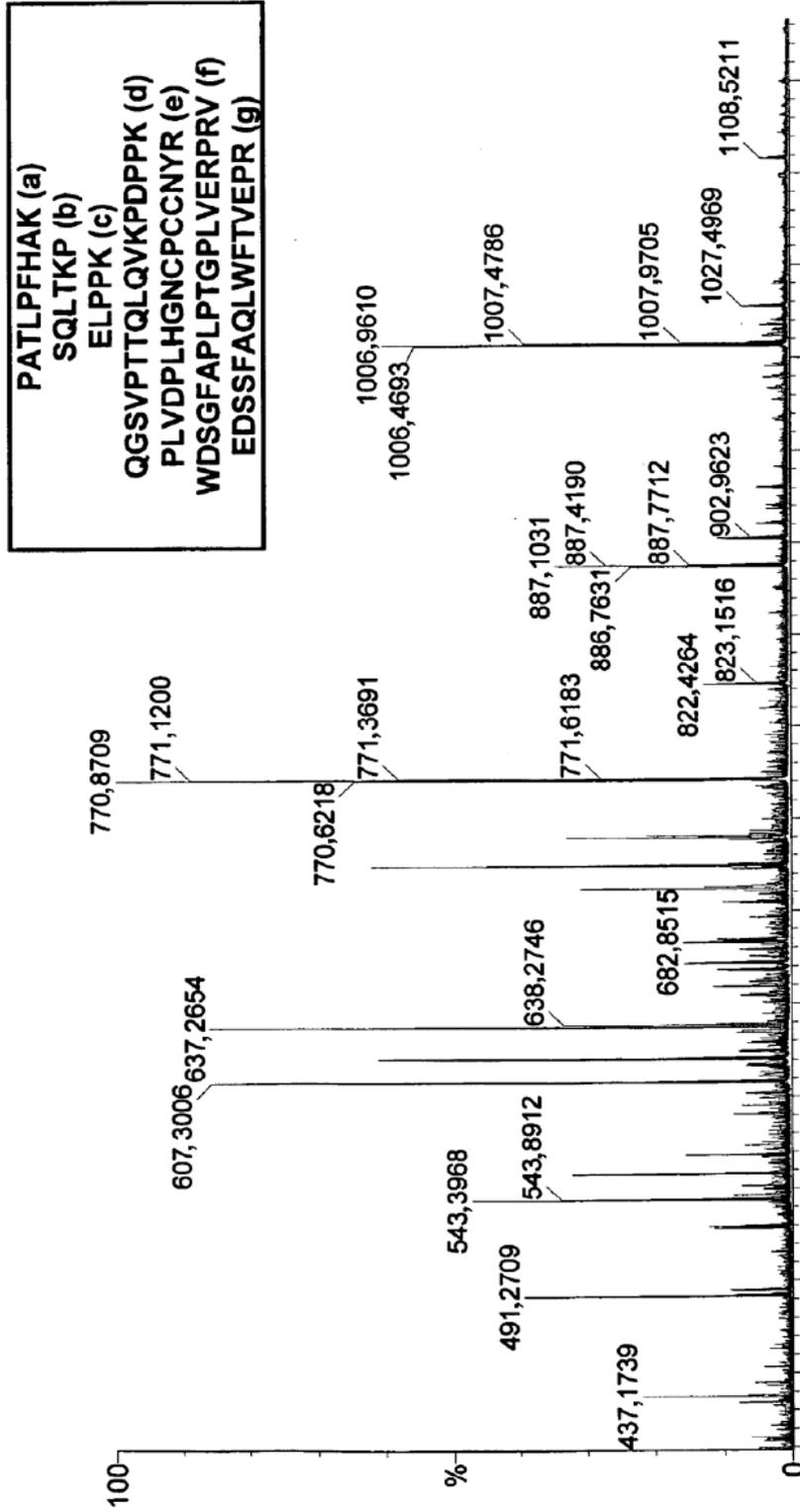


Fig. 10A

EVEELLDEFGR (a)
STAAAPAAAAAR (b)
PLNPLVAQQAQR (c)
VFVDVDSAHFTDQFGR (d)
DVSELLDVQEQQQLAR (e)
CNLNNPLALV (f)

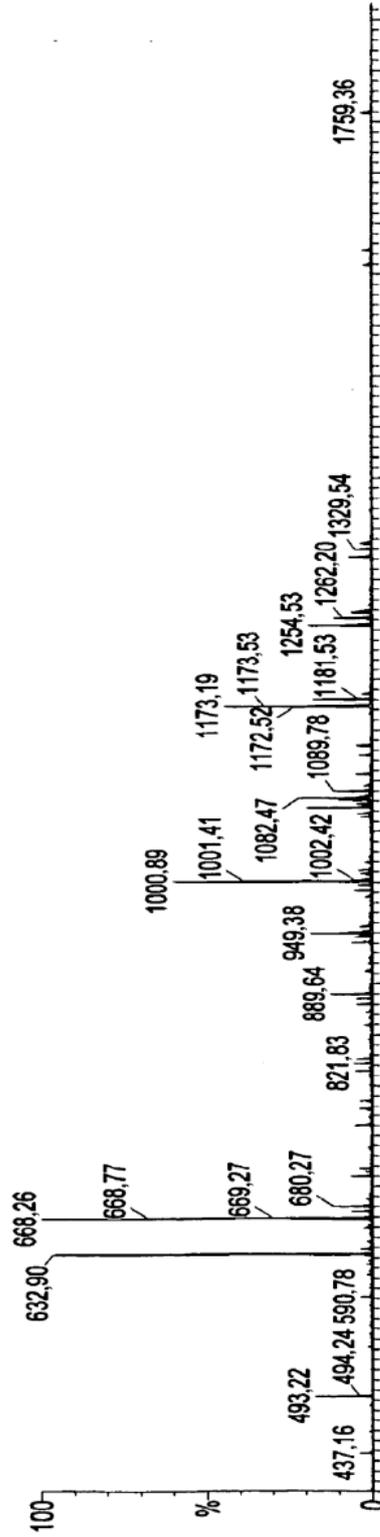


Fig. 10B

VESDGGWEFTNR (a)
AAVAATNPLNYVR (b)
VYGSLNPFAPHSQWEVSR (c)
AGVGGKPAHPVK (d)

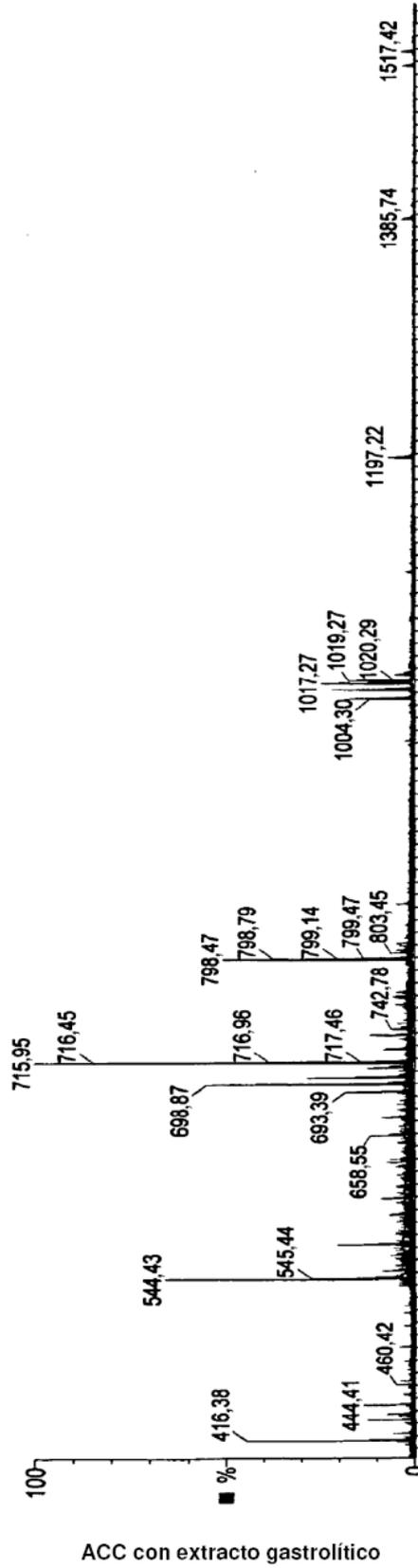


Fig. 10C

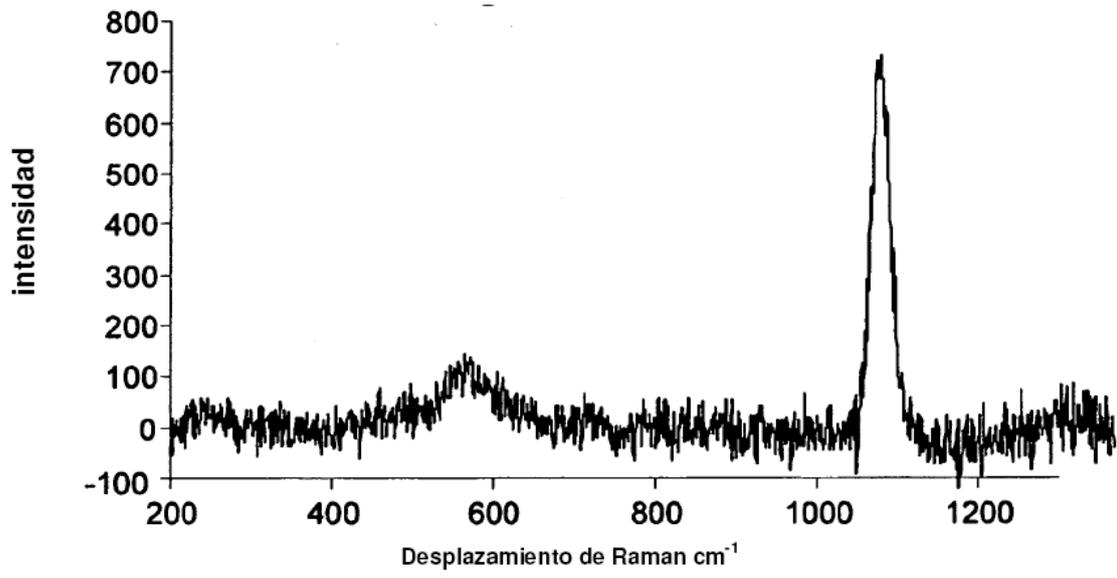


Fig. 11

Tabla 1: Comparación de composiciones aminoacídicas de proteínas GAP.

	Aminoácido	GAP12 (9,9 kDa) pI-5,09	GAP21 (19,5 kDa) pI-4,8	GAP22 (28,6 kDa) pI-11,45	GAP65 (60,8 kDa) pI-5,01
Alifáticos no polares	Glicina	-18,4 %	9,2 % (17)	5,6 % (15)	6,1 %
	Alanina	15,3 %	15,7 %	8,2 % (22)	4,7 %
	Valina	10,2 %	7,6 % (14)	4,5 % (12)	4,5 %
	Leucina	4,1 % (4)	8,6 % (16)	5,9 % (16)	5,1 %
	Isoleucina	0 % (0)	1,6 % (3)	4,8 % (13)	4,7 %
	Metionina	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	2,8 %
	Fenilalanina	5,1 % (5)	7 % (13)	1,1 % (3)	6,4 %
Aromática	Tirosina	4,1 % (4)	0,5 % (1)	0,4 % (1)	3,0 %
	Triptófano	2 % (2)	0 % (0)	0 % (0)	1,9 %
Polares no cargados	Serina	4,1 % (4)	6,5 % (12)	6,7 % (18)	5,3 %
	Prolina	8,2 % (8)	8,1 % (15)	25,7 %	6,8 %
	Treonina	3,1 % (3)	1,6 % (3)	8,2 % (22)	5,3 %
	Cisteína	0 % (0)	0 % (0)	0 % (0)	4,9 %
	Asparagina	8,2 % (8)	5,4 % (10)	0,7 % (2)	5,9 %
Cargados positivamente	Glutamina	4,1 % (4)	10,8 %	4,8 % (13)	5,3 %
	Lisina	2 % (2)	0 % (0)	5,6 % (15)	4,0 %
	Histidina	1 % (1)	0,5 % (1)	1,9 % (5)	2,1 % ^
	Arginina	3,1 % (3)	7 % (13)	9,3 % (25)	6,4 %
Cargados negativamente	Aspartato	2 % (2)	5,4 % (10)	3,3 % (9)	7,6 %
	Glutamato	5,1 % (5)	4,3 % (8)	3,3 % (9)	7,0 %

Fig. 12

ES 2 528 901 T3

<u>AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAGCGGGGAGTCCAGSTCCAGCTTCCTCAGCAGTTGGAG</u>	60
<u>ACACAATATACGGGCGCTCTGGCTAGTTCCACACCTGATGACGACCATAATGTTGGTGATC</u>	120
<u>M T T I M L V I</u>	8
CTCCTTGTGGGGCGTGTGTCGCCATACCACCCGGCCGTCCAACAGACAGCATCAGGTTC	180
<u>L L V G A C V A I P P G R P T D S I R F</u>	28
GTTGGCAGACAAAACCTTTACCCCGTCCGCAACACCCACAGATCTCGCCACACCCCT	240
V R Q T K P L P R P Q H P Q I S P T P P	48
GCTGGCTACCAACCAAGCCCGAGGTAGATCCAACCCCGCACCCAGGTATGTCATCCAG	300
A G Y Q P K P Q V D P T P H P G H V I Q	68
ACTCTACCAGCACATCCAAGTTCAAACCTGACCAGGCGTCTCCACGACCCTCGCGACAC	360
T L P A H P S S K L T R P A P R P S R H	88
CAACGCAGCGCAGACGAAGTTCGACAGGGAAGTGTCTACCACCGCAATAGGCAAGCCC	420
Q R S A D E V R Q G S V P T T A I G K P	108
CAGACTCTGCCTCCCAAGTCCCAACTTACAAAACCGAGTGTACGGCCACAACTCGTCCA	480
Q T L P P K S Q L T K P A V R P Q T R P	128
GCTACTCTTCTGGGAATCTGGCTAAACCTGCTCAGCGATCCAAGAGTCTGAAGACAGC	540
A T L P G N L A K P A Q R S K S L E D S	148
AGCTTCGCTCTCTTCTACTGGGCCATTGTGGAACCAAGACCTTCCCAGGAGAGCTG	600
S F A P L P T G P I V E P R P S P G E L	168
ACAAAACAGCTAGTCGCCCCATTGTTGATCCCATACCTCCCGCAGGAGAACTGACAAAA	660
T K P A S R P I V D P I P P A G E L T K	188
CCAGCTAGTCGCCCCATTGTTGATCCCATACCTCCCGCAGGAGAACTGACAAAACAGCT	720
P A S R P I V D P I P P A G E L T K P A	208
AGTCGCCCCATTGTTGATCCCATACCTCCCGCAGGAGAACTGACAAAACAGCTAATCGT	780
S R P I V D P I P P A G E L T K P A N R	228
CCCAAGAGTGTGGATAGTGGTTTTGCTCCACTACCTACTGGACCCATTGTAGAACCAGA	840
F K S V D S G F A P L P T G P I V E P R	248
CCACCTCGGGAGAGCTAACAAAACAGCTCCTCGTCTAGGCCTCGTCCAGGGGACTTA	900
P P P G E L T K P A P R P R P R P G D L	268
ACAAAACAGCCACTCGTCCCAGGCCTCGTCTGCGCGTCCCACACAGGCATAA <u>ACTTTC</u>	960
T K P A T R P R P R P A R P T Q A *	285
<u>CTCTATCCGGACGTCTCATTGACCTGATAAGCGATAAAATC</u>	1003

Fig. 13

<u>TACGGGGGCATTGGTCTCTGCAGCATCGGTCTTCATCATGAGGGCAGTCGTGTGTGTG</u>	60
<u>M R A V V C V</u>	7
CTTCTCGCTATTTCCGGAATGGCAAGTCCCCAGTCAGCGAGAGGGCGAAACGTTTGGCGCAT	120
<u>L L A I S G M A S A Q S A R G E T F A H</u>	27
GCCAGACCATCTGTCAACAGCTTCCAGGACTCTGCTTCCCTCTCTGTGATCCTTCTGTCT	180
<u>A R P S V N S F Q D S A S L S A D P S A</u>	47
GCTGCGGCTCCTCGAGCAGCCCCGTCAGCAGCCCCGTCGCGCAGCTCCTGCCGAGCTCCC	240
<u>A A A P R A A P A A A P A A A P A A A P</u>	67
GCACAGCAGAACTATGGGCCAAATTTCTTCGGTCCAGGACTCAACAATCCATTGGCCTTC	300
<u>A Q Q N Y G P N F F G P G L N N P L A F</u>	87
CCTCTCAATCCATTGGTAGCACAGCAAGCCAGAGGATCGCTTCCCTCAACCCCAACCTC	360
<u>P L N P L V A Q Q A Q R I A S F N P N L</u>	107
AGAGTGTTCGTTGATATTGACGGCTCAGTTCAGCTCACTGATCAGTTCGGCCGCGAAGTT	420
<u>R V F V D I D G S V Q L T D Q F G R E V</u>	127
GATGAGGTCTTGGATGAGTTCGGCCGCGATGTATCTGAACTTCTCGATGTCGAAGAGCAG	480
<u>D E V L D E F G R D V S E L L D V E E Q</u>	147
CAAGAGGCACTTCTTCGACGTCGCCAGCAGCAACTGACCTACAGCTGCTGCAGCAGTTC	540
<u>Q E A L L R R R Q Q Q L D L Q L L Q Q F</u>	167
AACAACCTGCCTTTGGTGGTAGTGTGGTGGACAAGCTGCTGTTGGCGGACAACTGGT	600
<u>N N P A F G G S V G G Q A A V G G Q T G</u>	187
GTTGGGGGAGGATTCCCACGACAGAGATCCTTCAGAATCGTGGTGTAA <u>GACCGCAATGAT</u>	660
<u>V G G G F P R Q R S F R I V V *</u>	202
<u>ACACCTCTTTCAAAGGTGGTAGCTACCACCTATATCACCGTTCCGGTTTTTCCTGTCGCCCT</u>	720
<u>TCATAACCTCGCTTCCTGATAGTCGCGGTCACTGACCGTGTGATCTGTACTTTAGGTCA</u>	780
<u>CCTGCTTTAATTCTTCTTATTTTCCTTCATCTGATAAGTCTTCCATAATCTGCAACCTC</u>	840
<u>GTCACCTGTTCTTATCTCTATCCAGAGTATCCTAGCAGACTATCCACGTCCTTTATGCTA</u>	900
<u>GCAGTCTCCCCCAACATATTCGGTTCCTCTATTCGAAACGACCCCAATTCGTTTACATAT</u>	960
<u>TAAACAGCTGTACAGGTCTTTACAATAAATGCTGAATACATTATTTGTATAAATTTATTA</u>	1020
<u>ATAAAGCAAGCATAAACACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAGTAG</u>	1080
<u>TCGCGGCTTCATAACCACTCTGCCCTAATAGTAGAGTCGTTATAG</u>	1125

Fig. 14

```

ACGCGGGACAGGTCAGCTATTAGAGTCGCACCAGCAACATCCTCTCCAGCAACATGAAGA 60
                                     M K I 3
TTTTTCATTCTCCTTGTGGTGATTGGTGTGGTGTGCAGCCAGCTTGGTGCTGGCCAGGTGG 120
F I L L V V I G V V S A Q L G A G Q V G 23
GAGGTGCTGCTCCAGCMCAGGGTGCTGGAGGTGCTGCTGGTGTGGTGGTCCWGGGGCAG 180
G A A P A Q G A G G A A G V G G P G A A 43
CTCCTGTAAACCCCTACGGACCTAAAGTGTATGGTCTGGCCTCAACAATCCCTTCGCCT 240
P V N P Y G P K V Y G S G L N N P F A F 63
TCCCTCACAACACGTGGGAAGTGAGTCGTGCTGCGGCGGTGGCAGCTACCAACCCCAACC 300
P H N T W E V S R A A A V A A T N P N L 83
TCTATGTGCGCGTGGAGTCTGACGGAGGCTGGGAATTCACCAACCGCTTCGGAGAGAAGG 360
Y V R V E S D G G W E F T N R F G E K V 103
TTGATGTGTACAACAGCTTCGGCCAAGAGCTTGACTAGTGCAGTCTTTATCTCGTTCTGT 420
D V Y N S F G Q E L * 113
CATTACCTCATCTCGCCTCTATGAAGCCTGTCACCTCAATAATTTACCCCTCCCATACA 480
TCTGGATGTAAAAAACACAGGTTCTGTTGCTCTACAGCCCTGGCTATACAGCAGGICT 540
GCTGCTACACAGCCCTGGCTATGCAGCAGGTCCTGCTGATACACAGCCCTGGCTATACAG 600
AGGTCCTGCTGCTACACAGCCCTGGCTGTGCAGCAGGTCCTGCTGATACACAGCCCTGGCT 660
TGCAGCAGGTCCTGCTGCTACACAGCCCTGGCTATGGAGCAGGTCCTGCTGCTACACAGCC 720
TGGTTATGCAGCAGTCTGCTGTGCAATCATTAGATACCAATGGAGTCAGAATAAGAA 780

```

Fig. 15A

```

GAP 12 33 YGPKVYGSGLNPNPFAFPHNTWEVSRAAAVAATN 65
GAP 21 55 YGNPFFGPGPLNNPLAFPLNPLVAQQAQRIASFN 87
***:..*.*****:*** *. ...* :*: *

GAP 12 66 PNLYVRVESDGGWEFTNRFGEKVD-VYNSFGQEL 98
GAP 21 88 PNLRVFDIDGSVQLTDQFGREVDEVLDEFGRDV 121
*** * *: ** . :*:**:* * :.***:

```

Fig. 15B

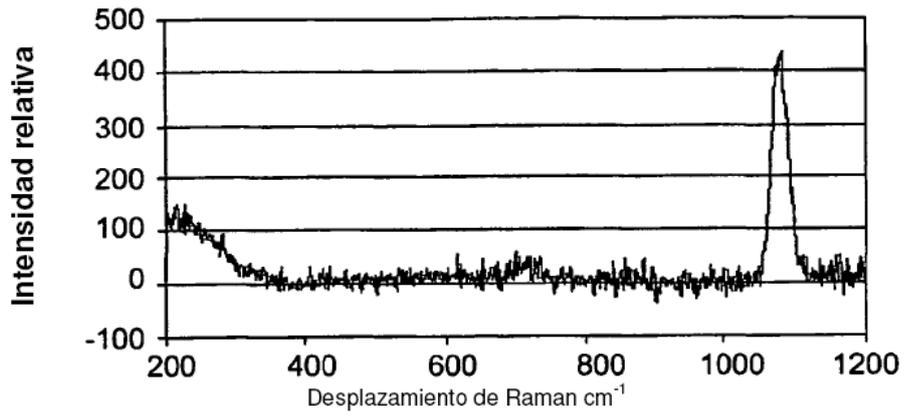


Fig. 16

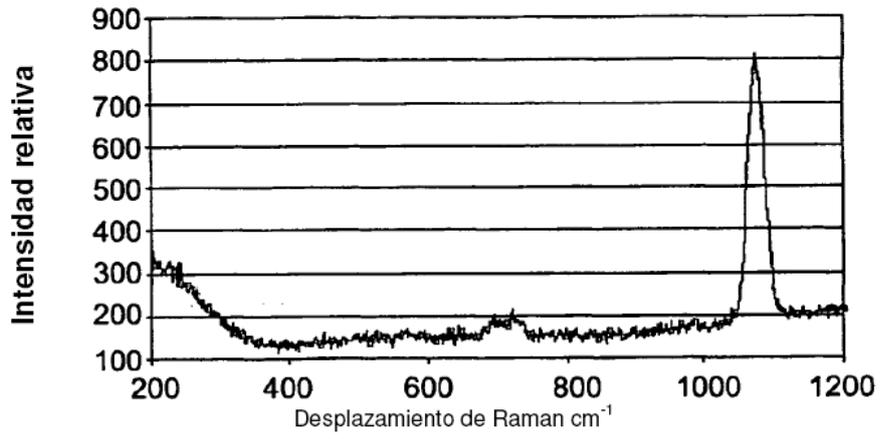


Fig. 17

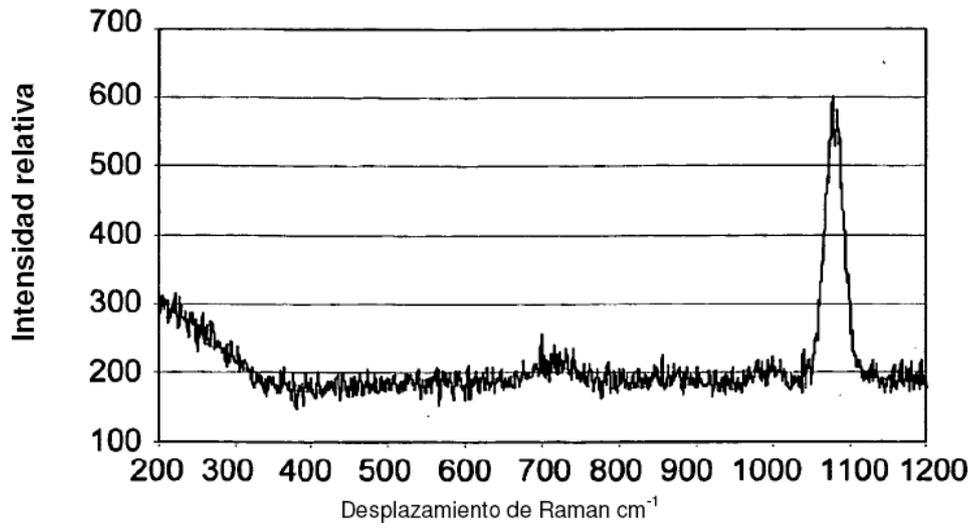


Fig. 18

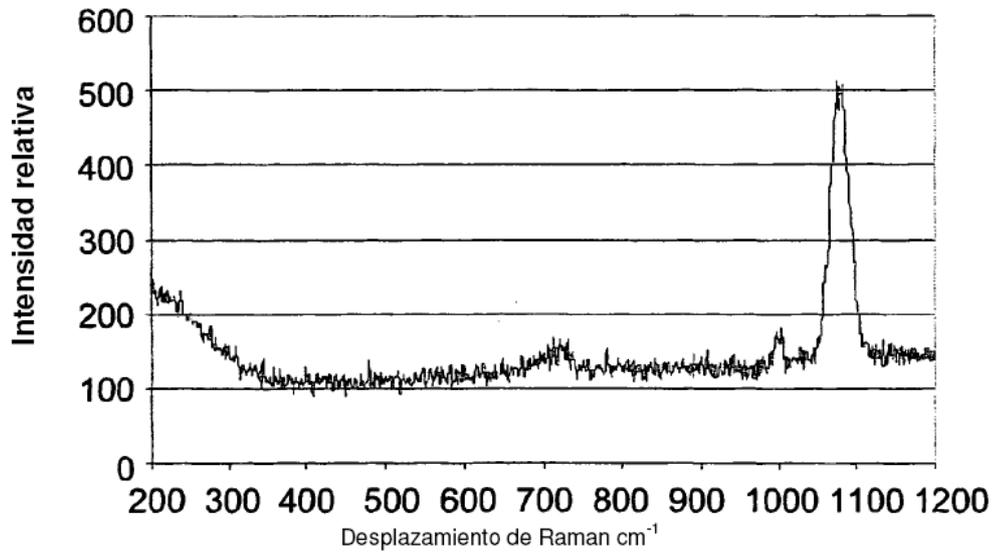


Fig. 19

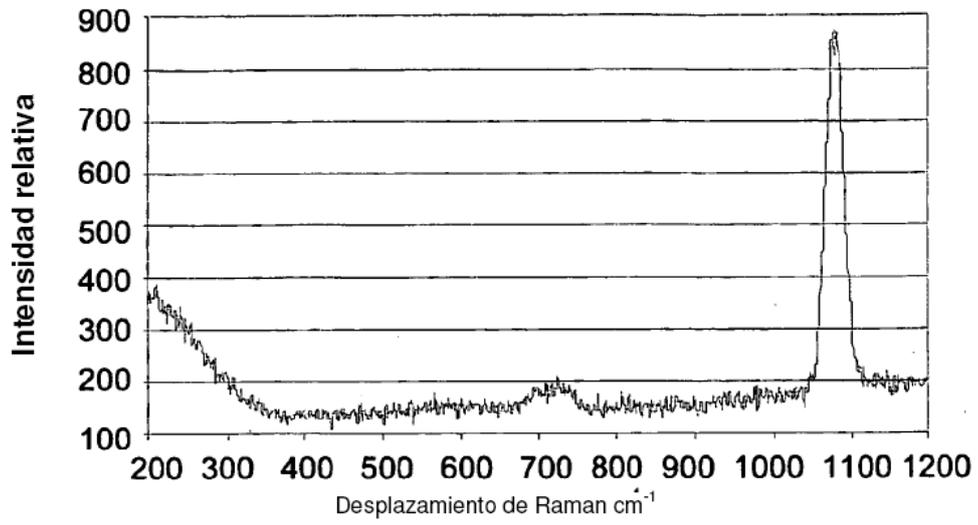


Fig. 20

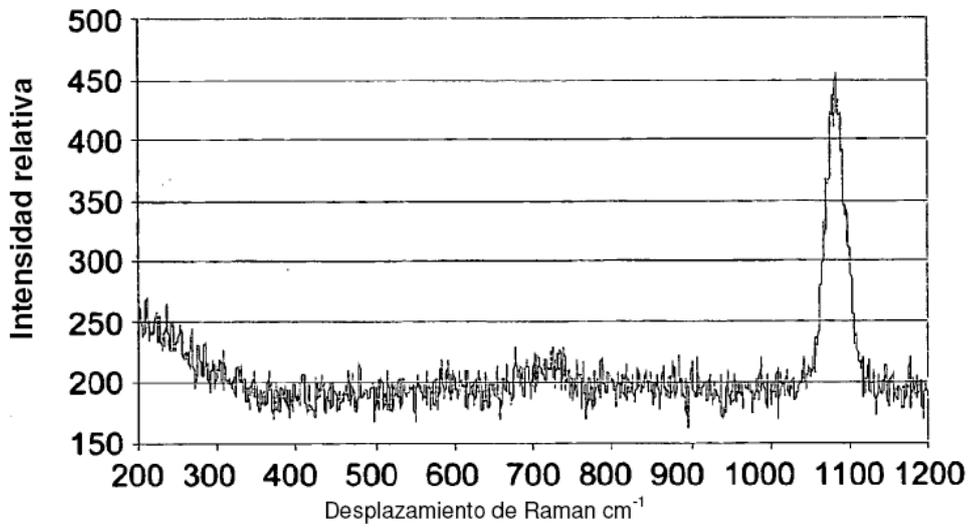


Fig. 21

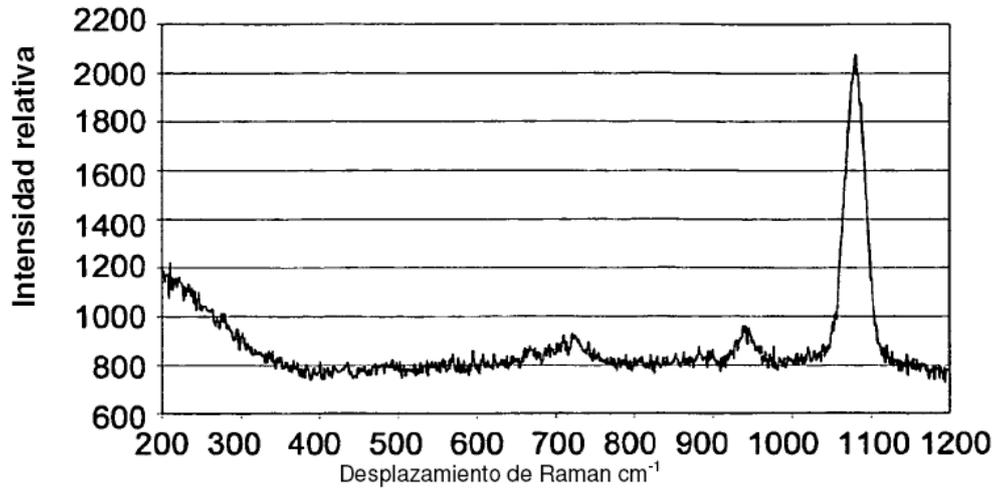


Fig. 22

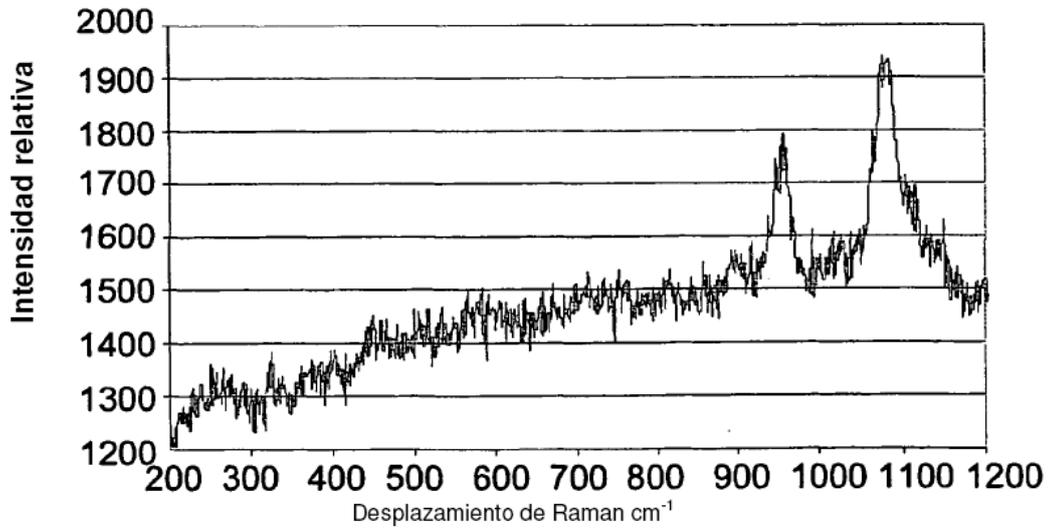


Fig. 23

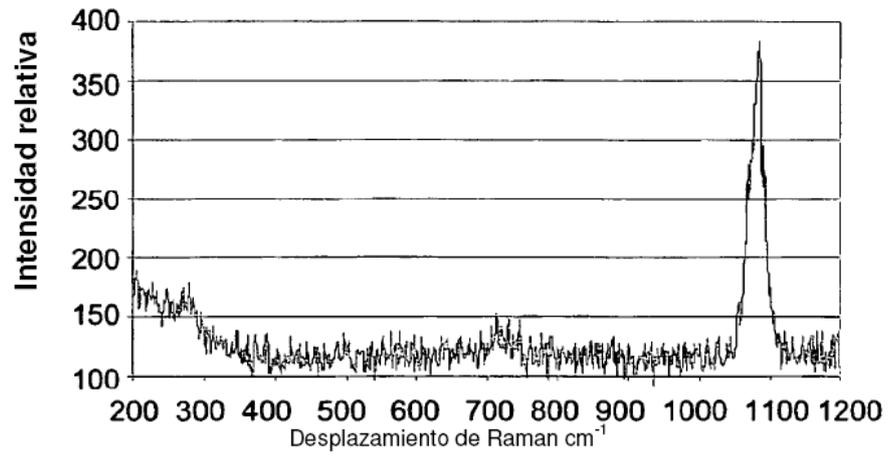


Fig. 24

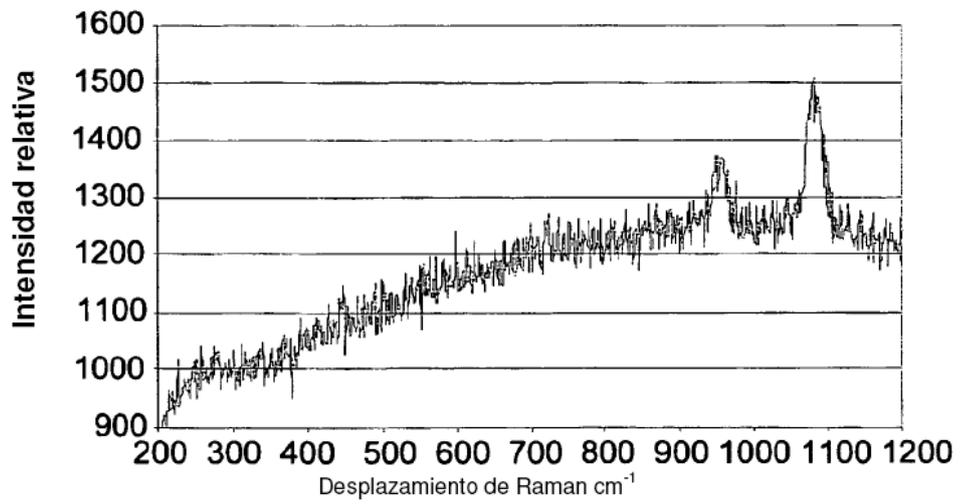


Fig. 25

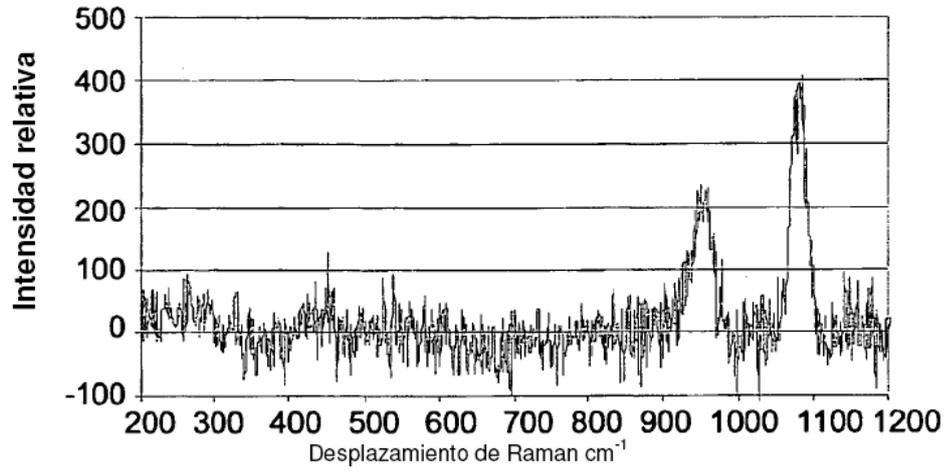


Fig. 26

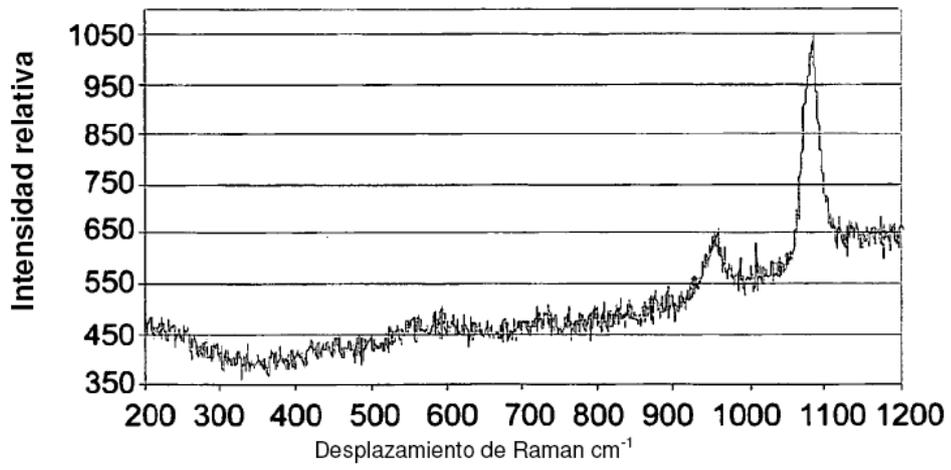


Fig. 27

ACC (P-serina) de 5 meses de edad

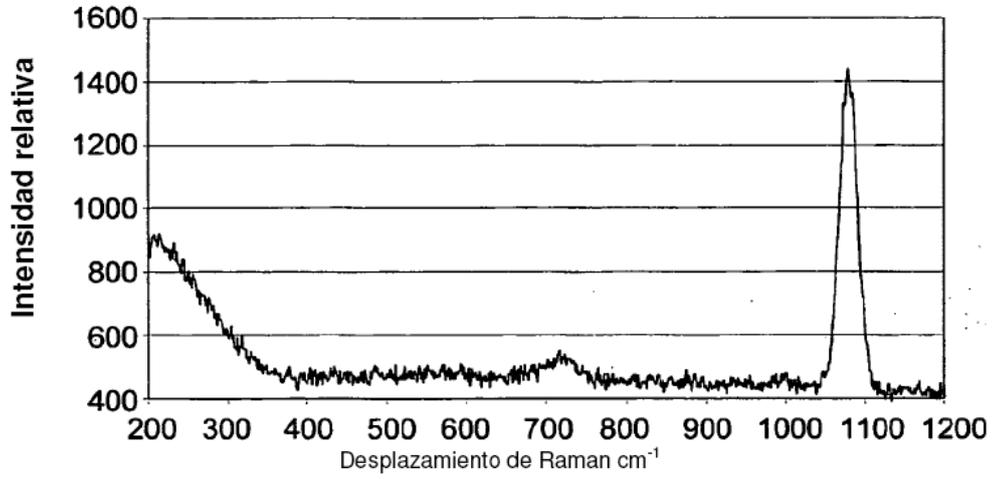


Fig. 28

ACC (P-serina) de 5 meses de edad

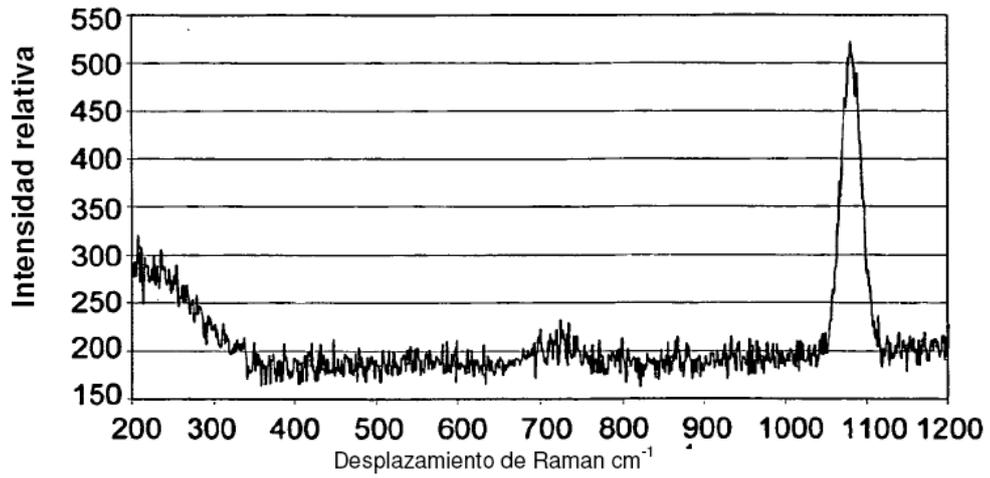


Fig. 29

ACC (ISM-proteasa) de 7 meses de edad

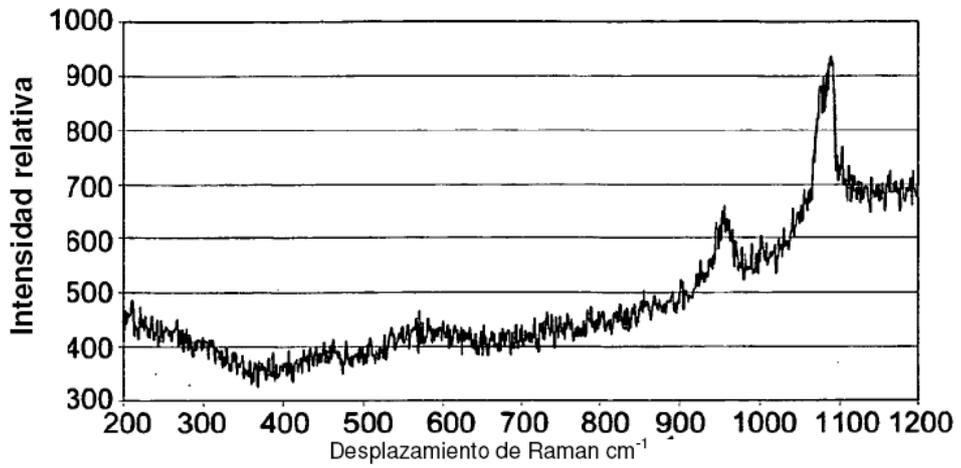


Fig. 30

ACC (ISM-proteasa) de 7 meses de edad

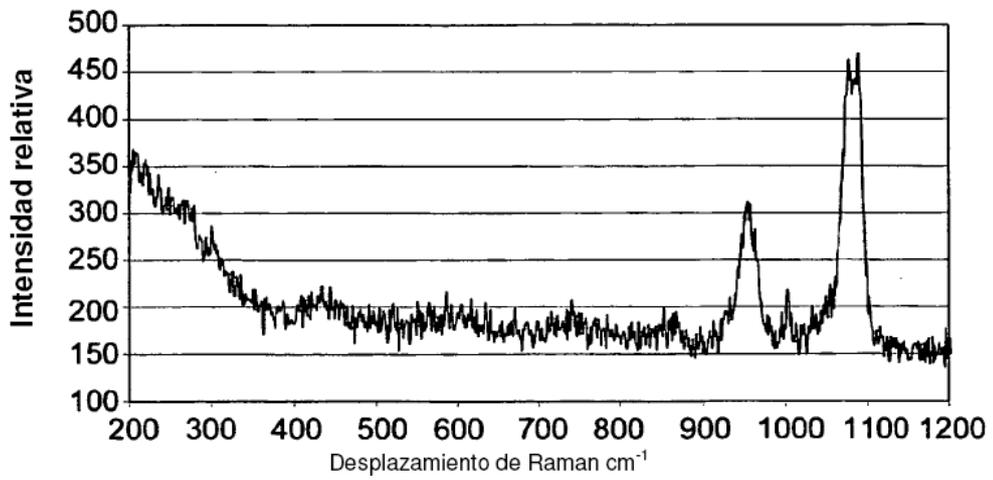


Fig. 31

ACC (ISM-papaina) de 7 meses de edad

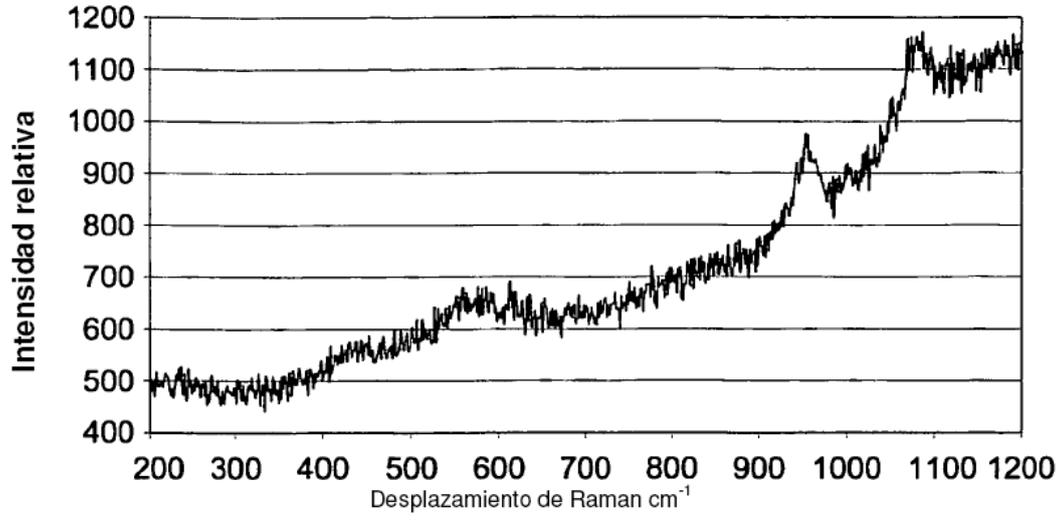


Fig. 32

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 Esta lista de referencias citadas por el solicitante solo es para la conveniencia del lector. La misma no forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha observado sumo cuidado en la recopilación de las referencias, no pueden ser excluida la existencia de errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes se exime de cualquier responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en al descripción

10 WO 2005115414 A [0002] [0032]

Literatura que no es de patentes citadas en la descripción

SUGAWARA et al. Angew. Chem., 2006, vol.45, 2876 [0002]