

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 268**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2005 E 14191558 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2952521**

54 Título: **Péptidos derivados de la proteína BPLP humana, polinucleótidos que codifican dichos péptidos y anticuerpos dirigidos contra dichos péptidos**

30 Prioridad:

19.03.2004 EP 04290754

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

08.10.2018

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)
28, Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR**

72 Inventor/es:

**ROUGEOT, CATHERINE;
HUAULME, JEAN-FRANÇOIS;
UNGEHEUER, MARIE-NOËLLE;
WISNER, ANNE y
DUFOUR, EVELYNE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 685 268 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos derivados de la proteína BPLP humana, polinucleótidos que codifican dichos péptidos y anticuerpos dirigidos contra dichos péptidos

5

[0001] La presente invención se refiere a péptidos derivados de la proteína BPLP humana como nuevos inhibidores de metalo-ectopeptidasas.

[0002] En un enfoque genómico se ha identificado un gen regulado por andrógenos, que se expresa predominantemente en la glándula submandibular (SMG) y próstata de ratas adultas (Rosinski-Chupin y col., 1988 y patente europea 0 394 424). El gen codifica una proteína precursora, la proteína submandibular de rata 1 (SMR₁) que da lugar a tres péptidos estructuralmente relacionados que maduran selectivamente a partir del precursor *in vivo* por escisión en sitios multibásicos por una enzima convertora de aminoácidos básica apareada (Rougeot y col., 1994).

15

[0003] En un enfoque de pos-genómica y fisiómica se establecieron las bases moleculares y funcionales que proporcionaron pruebas de la existencia en mamíferos de un mensajero hormonal de la comunicación intercelular, es decir, el péptido maduro final generado a partir de la pre-prohormona SMR₁: el pentapéptido de SMR₁, llamado hoy en día sialorfina (de secuencia QHNPR). Por tanto, la sialorfina es un péptido señal exocrino y endocrino cuya expresión está bajo la regulación androgénica de la activación y la secreción se provoca bajo la repuesta mediada adrenérgicamente a estrés medioambiental, en rata macho (Rougeot y col., 1997).

20

[0004] El hecho de que en rata macho sexualmente madura la sialorfina regulada por andrógenos sea agudamente secretada en respuesta a estrés agudo medioambiental condujo a postular que este mediador de señalización podría desempeñar una función en alguna integración fisiológica y de comportamiento ligada a la reproducción. Por tanto, los mismos autores investigaron los efectos inducidos por la sialorfina sobre el patrón de comportamiento sexual masculino, que incluyó frecuencia y latencia de montas, intromisiones y eyaculaciones, además de interacciones socio-sexuales. Los datos obtenidos mostraron que la sialorfina tiene capacidad para modular, a dosis relacionadas con niveles en circulación fisiológicos, el patrón de apareamiento de la rata macho, es decir, ejerciendo, de un modo dependiente de la dosis un efecto facilitativo / inhibidor dual sobre el rendimiento sexual, mientras que a todas las dosis se estimula la aparente excitación o motivación sexual. Por tanto, se propone que la sialorfina regulada por andrógenos endógena ayuda a modular el equilibrio adaptativo entre mecanismos excitadores e inhibidores que sirven para la apropiada respuesta sexual de ratas macho, dependiendo del contexto.

30

[0005] La solicitud de patente internacional WO 01/00221 describe el uso de productos de maduración de SMR₁ para el tratamiento de trastornos interpersonales y del comportamiento alterados, que incluyen defectos sexuales.

35

[0006] Además, estos autores descubrieron que los productos de maduración de SMR₁ reconocían sitios diana específicos en órganos que participaban profundamente en la concentración de iones minerales. La solicitud de patente internacional WO 98/37100 describe el uso terapéutico de productos de maduración de SMR₁ para prevenir o tratar enfermedades asociadas a un desequilibrio de iones minerales en un cuerpo humano o animal.

40

[0007] En respuesta a contextos estresantes, la sialorfina es agudamente liberada, rápidamente distribuida y es captada a largo plazo por sus dianas asociadas a membrana sistémicas (Rougeot y col., 1997). Los autores han demostrado que la principal molécula de la superficie celular con la que la sialorfina se une *in vivo* es la metaloectoendopeptidasa anclada a membrana, NEP (endopeptidasa neutra; neprilisina EC 3.4.24.11), o encefalinasa (Rougeot y col., 2003). Además, se mostró que la sialorfina era un antagonista fisiológico de la actividad de NEP *ex vivo*; y la interacción directa de NEP y sialorfina evaluada en un ensayo *in vitro* usando NEP renal purificada soluble y DGNPA fluorogénico artificial (dansil-Gly-(pNO₂)Phe-βAla) como sustrato proporcionó pruebas directas de que la sialorfina inhibió la actividad de NEP (CI₅₀ de la sialorfina: 0,6 μM). La sialorfina es el primer inhibidor fisiológico de la actividad de NEP-encefalinasa identificada hasta la fecha en roedor (Rougeot y col., 2003 y solicitud de patente europea EP 1 216 707).

45

50

[0008] La NEP se localiza en la superficie de células en tejidos nervioso y sistémico, en los que desempeña una función importante como ectoenzima que cataliza el procesamiento pos-secretor o metabolismo de varios neuropéptidos y péptidos reguladores. Los principales sustratos fisiológicamente relevantes para NEP son las encefalinas, sustancia P y péptido natriurético auricular (ANP). Estos péptidos señal de mamífero participan en el control de la percepción de dolor central y periférico, fenómenos inflamatorios, tono arterial y homeostasis mineral. Su importancia fisiológica y la función crítica de la ectoenzima NEP en modular su potencia funcional hace importante investigar y conocer su posible protección por inhibidores endógenos, desde un punto de vista fisiológico, además de fisiopatológico y terapéutico.

55

60

[0009] Usando diferentes modelos de farmacología molecular y de comportamiento los autores han mostrado que el mediador fisiológico, sialorfina, previene que la NEP espinal y renal se descomponga en sus dos sustratos fisiológicamente relevantes, la sustancia P y Met-encefalina *in vitro*. La sialorfina inhibió la descomposición de la

65

sustancia P con una CI_{50} de 0,4-1 μ M y se comportó como un inhibidor competitivo de la NEP unida a membrana que se origina a partir de tejidos nerviosos (médula espinal) o de tejidos sistémicos (riñón, hueso, diente, placenta, próstata, GSM, intestino). La sialorfina intravenosa *in vivo* provocó potentes respuestas antinociceptivas en dos modelos de rata de comportamiento de dolor agudo y tónico inducido por lesión, la prueba del dolor por alfiler (5 (algesia mecánica) y la prueba con formalina (algesia química). La analgesia inducida por sialorfina requirió la activación de receptores de μ - y δ -opioides, de acuerdo con la participación de receptores de opioides endógenos en la transmisión encefalinérgica. De hecho, estos receptores participan en la transmisión de las señales opioidérgicas endógenas tales como las encefalinas que se inactivan por NEP y la aminopeptidasa APN, y también del opiáceo exógeno, la morfina que interactúa principalmente con el receptor μ -opioides. Se concluyó que la sialorfina protege 10 encefalinas endógenas liberadas tras los estímulos nociceptivos inhibiendo ecto-encefalinasas, *in vivo*, y, por tanto, potencia su efecto analgésico. De otro modo, el sistema opioide endógeno, en particular la ruta mediada por δ -opioides, también se ha ligado a la etiología de comportamiento depresivo; por ejemplo, usando un modelo de análisis de desesperación del comportamiento (prueba de natación forzada), los autores mostraron que la sialorfina muestra una actividad antidepressora significativa en rata macho. La sialorfina es el primer regulador sistémicamente 15 activo natural de actividad de NEP identificada hasta la fecha en mamíferos. Además, la prueba fue una condición de que es un nuevo modulador fisiológico de percepción de dolor tras lesión, y puede ser el progenitor de una nueva clase de moléculas terapéuticas, como novedosos agentes antinociceptivos y antidepressores putativos (Rougeot y col., 2003; documentos EP 1.343.519 y EP 1.343.520).

20 **[0010]** El poderoso efecto analgésico de la sialorfina está asociado a su capacidad para proteger completamente las encefalinas de la inactivación por las ectoenzimas degradadoras de encefalina. *In vivo*, las encefalinas son inactivadas con una extraordinaria eficiencia (en el plazo de pocos segundos) por ambas ectopeptidasas, NEP y APN. De acuerdo, los primeros inhibidores sintéticos desarrollados, que son sólo tanto 25 específicos para NEP (tal como tiorfano) como específicos para APN (tal como bestatina), presentan un efecto antinociceptivo no significativo o débil. Por tanto, la sialorfina de rata es un inhibidor dual fisiológico de las metalo-ectopeptidasas NEP y APN; además, este mensajero señal endocrino de la respuesta adaptativa a estrés es un poderoso inhibidor de la percepción dolorosa en rata y su efecto analgésico es más potente que el de inhibidores de NEP/APN duales sintéticos tales como kelatorfano, que se han desarrollado en cualquier parte por procedimientos de modelado. Por tanto, la sialorfina se adapta sorprendentemente en términos de especificidad y biodisponibilidad a 30 las características conformacionales y distributivas de sus dianas y como consecuencia es más eficaz desde un punto de vista integrativo. Considerando estas observaciones, desde un punto de vista funcional, además de fisiopatológico y terapéutico, la importancia biológica de las funciones reguladas por la sialorfina de rata hace que sea crucial investigar e identificar el homólogo funcional endógeno de sialorfina de rata en ser humano.

35 **[0011]** La sialorfina es el único regulador sistémicamente activo fisiológico identificado de la actividad de encefalinasa unida a membrana en mamíferos. Esto plantea la cuestión de la existencia de tal inhibidor de ectopeptidasa NEP endógena en saliva y sangre humana. No se detectó el péptido QHNPR inmunorreactivo (sialorfina) en saliva humana masculina usando radioinmunoensayo altamente sensible y específico (Rougeot y col., 1994). Sin embargo, los datos bibliográficos suponen la presencia de sustancias de bajo peso molecular (≤ 3000 Da) 40 que inhiben la actividad de ectopeptidasa NEP en ser humano, notablemente en la saliva humana. Aunque este (estos) componente(s) salival(es) no se caracterizó (caracterizaron) bioquímicamente, se observó una diferencia relacionada con el sexo en la producción salival de este (estos) inhibidor(es) de ectoenzimas degradadoras de encefalina humana (Marini y Roda, 2000). Sorprendentemente, la situación es muy similar a la identificada por los inventores en rata macho, en la que la glándula submandibular y la saliva representaron los compartimentos de 45 mayor síntesis y secreción de sialorfina, respectivamente.

[0012] El gen que codifica el precursor de SMR1 de sialorfina pertenece a una familia multigénica cuyos miembros se han identificado en ser humano. Sin embargo, el gen humano homólogo en sentido estricto del gen *SMR1* de rata (*VCSA1* que codifica SMR1) no se encontró en ser humano (clonación de ADNc y análisis del genoma 50 humano). Además, existe la potencia inhibidora de sialorfina de rata contra NEP humana anclada a membrana, que se expresa por líneas celulares de próstata humana (LNCaP), pero es aproximadamente 10 veces inferior a la obtenida contra NEP de roedor (rata, conejo). Esta evidente selectividad en la interacción funcional entre sialorfina de rata y la ectoenzima NEP es al menos sorprendente considerando el hecho de que la NEP de rata y humana tienen analogía de secuencias de aminoácidos relativamente alta (aproximadamente el 85 %). De otro modo, la 55 caracterización de los genes humanos de la familia multigénica a la que pertenece el gen que codifica el precursor de la sialorfina de rata (*SMR1*) reveló que en humanos existen varios genes de esta familia, de entre los cuales se caracterizaron tres, es decir, los genes *hPB*, *hPBI* y *BPLP* que están agrupados en la misma región del cromosoma, q13-21 del cromosoma 4 (Isemura, 2000) (Isemura y Saitoh, 1997) (Dickinson y Thiesse, 1996).

60 **[0013]** Los inventores han identificado ahora un nuevo péptido que se considera el homólogo humano funcional del pentapéptido de SMR1 sialorfina.

[0014] Los numerosos datos recogidos por los inventores soportan que el nuevo péptido, de secuencia QRFSR, se deriva de la proteína BPLP ("proteína lacrimal rica en prolina básica").

65 **[0015]** El gen *BPLP* humano codifica una secuencia de polipéptidos de 201 aminoácidos (con el posible

péptido señal de secreción) predicha a partir del ADNc clonado y caracterizado por Dickinson y col. (Dickinson y Thiesse, 1996). El gen *BPLP* se expresa en glándulas lacrimales y submandibulares humanas. En la lista adjunta de secuencias, SEQ ID N° 1 muestra la secuencia de ADNc que codifica BPLP, y SEQ ID N° 2 muestra la secuencia de aminoácidos de BPLP.

5

[0016] Los inventores definieron sitios consenso en la región del extremo N mejor conservada (entre rata, ratón y ser humano) de la proteína BPLP secretada basándose en el procesamiento por maduración de sialorfina de rata del precursor de SMR1.

10 **[0017]** Por ejemplo, estos sitios consenso se definieron como sitios de escisión de péptidos señal en una región que tiene la secuencia requerida para la peptidasa señal y en residuos básicos apareados con enlaces R-R reconocidos como señal de procesamiento para la aminoácido-convertasa básica apareada.

[0018] En tales sitios consenso, los inventores encontraron entonces una secuencia QRFSR, estructuralmente
15 estrechamente relacionada con la de la sialorfina de rata QHNPR.

[0019] Este péptido se sintetizó y se analizó por su capacidad para inhibir la degradación del sustrato de NEP fisiológico, es decir, la sustancia P.

20 **[0020]** Entonces, este péptido se identificó como el homólogo funcional humano de la sialorfina.

[0021] La presente invención se refiere a péptidos derivados de la proteína BPLP humana como nuevos inhibidores de metalo-ectopeptidasa.

25 **[0022]** Más particularmente, la presente invención se refiere a miméticos de productos de maduración de la proteína BPLP, en particular el péptido QRFSR, y a miméticos de derivados peptídicos de dichos productos de maduración de la proteína BPLP, útiles para potenciar los efectos de mensajeros de péptidos neuroendocrinos que controlan la transmisión nociceptiva (por ejemplo, encefalinas), el bienestar y/o los intercambios homeostáticos de Na/Pi/Ca/H₂O principalmente (por ejemplo, péptidos natriuréticos).

30

[0023] La presente solicitud también describe polinucleótidos que codifican dichos péptidos y derivados de los péptidos, así como anticuerpos dirigidos contra dichos péptidos y derivados peptídicos de los mismos.

[0024] Además, la presente solicitud describe usos de diagnóstico y usos terapéuticos de una proteína BPLP
35 humana, péptidos derivados de la proteína BPLP humana, y derivados peptídicos y miméticos de los mismos, así como usos de diagnóstico y usos terapéuticos de polinucleótidos que codifican la proteína BPLP humana, péptidos derivados de la proteína BPLP humana y derivados peptídicos de los mismos y de anticuerpos dirigidos contra la proteína BPLP humana, péptidos derivados de la proteína BPLP humana y derivados peptídicos de los mismos

40 **[0025]** Debe entenderse que los péptidos, proteínas o ácidos nucleicos están en forma aislada o purificada.

[0026] Por «purificado» y «aislado» se indica, cuando se refiere a una proteína o péptido (incluyendo anticuerpos) o una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas. El término «purificado» como se usa en el presente documento significa
45 preferentemente que está presente al menos el 75 % en peso, más preferentemente al menos el 85 % en peso, más preferentemente aún al menos el 95 % en peso, y lo más preferentemente al menos el 98 % en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo. Una molécula de ácido nucleico «aislada» o «purificada» que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácidos nucleicos que no codifican el polipéptido objeto. Sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o
50 restos adicionales que no afectan perjudicialmente las características básicas de la composición.

Péptidos

[0027] Para los fines de la invención, un «péptido» es una molécula que comprende un grupo lineal de
55 residuos de aminoácidos conectados entre sí en el grupo lineal por enlaces peptídicos. Dicho grupo lineal puede ser opcionalmente cíclico, es decir, los extremos del péptido lineal o las cadenas laterales de aminoácidos dentro del péptido pueden estar unidos, por ejemplo, por un enlace químico. Dichos péptidos según la invención pueden incluir de aproximadamente 3 a aproximadamente 500 aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos, y lo más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 50
60 aminoácidos, y especialmente de aproximadamente 3 a 15 aminoácidos y pueden incluir adicionalmente estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias, además de asociaciones intermoleculares con otros péptidos u otras moléculas no peptídicas. Dichas asociaciones intermoleculares pueden ser, sin limitación, por enlaces covalentes (por ejemplo, mediante enlaces disulfuro), o por quelación, interacciones electrostáticas, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, interacciones ión-dipolo, interacciones dipolo-dipolo o cualquier combinación de las
65 anteriores.

[0028] En estos péptidos, por ciclación/desciclación del extremo N, Glp y Gln se interconvierten.

[0029] La solicitud describe un péptido que deriva de la proteína BPLP humana y que tiene actividad moduladora, especialmente inhibidora, sobre metalo-ectopeptidasas.

5

[0030] “Derivado de la proteína BPLP humana” significa que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un fragmento de la proteína BPLP. En una realización preferida, dicho péptido consiste en de 3 a aproximadamente 150 aminoácidos. De la manera más preferente, dicho péptido consiste en menos de 100 aminoácidos.

10

[0031] Particularmente, la solicitud describe un producto de maduración de la proteína BPLP, así como derivados peptídicos del mismo.

[0032] Más particularmente, se describe un producto de maduración de la proteína lacrimonal rica en prolina básica (BPLP) o derivado peptídico de dicho producto de maduración, en el que el péptido o derivados peptídicos presentan una propiedad inhibidora contra una metalo-ectopeptidasa, especialmente NEP y/o APN, y más particularmente NEP.

[0033] Un “producto de maduración” es un péptido que se obtiene por escisión del precursor de la proteína BPLP por enzimas conversoras de prohormona o maturasas naturales, o enzimas que escinden aminoácidos básicos solos o emparejados relacionados, tales como, por ejemplo, furina, PC convertasas o PACE 4 (Seidah, 1995).

[0034] Los “derivados peptídicos” son péptidos que tienen sustituciones de aminoácidos de un péptido parental, preferentemente de una a dos sustituciones de aminoácidos de un péptido parental, particularmente cuando dicho péptido parental comprende menos de 15 aminoácidos y preferentemente menos de 10 aminoácidos, pero que mantiene la especificidad de unión y/o actividad fisiológica del péptido parental. Como se usa en el presente documento, “retener la especificidad de unión del péptido parental” significa que puede unirse a un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une a uno de los productos de maduración de BPLP o al receptor del producto de maduración de BPLP con una afinidad que es al menos un décimo, más preferentemente al menos la mitad, y lo más preferentemente al menos tan grande como la de uno de los péptidos que son productos de maduración de BPLP. La determinación de tal afinidad se realiza preferentemente bajo condiciones de inmunoensayo de unión competitiva convencional. “Retener la actividad fisiológica del péptido parental” significa retener la capacidad de uno cualquiera de los péptidos de maduración de BPLP para unirse y para modular la actividad de una metalo-ectopeptidasa, especialmente NEP y/o APN, y más particularmente NEP, y así optimizar las respuestas nociceptivas, inflamatorias, anti-depresivas y/o homeostáticas iónicas locales y sistémicas a estrés. La determinación de si tal actividad se modula o no se describe adicionalmente más adelante en esta memoria descriptiva.

[0035] Los péptidos o derivados peptídicos comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg en la que X1 representa un átomo de H, un aminoácido Cys o un aminoácido Tyr, X2 representa Gln o Glp cuando X1 es H, o X2 representa Gln cuando X1 es Tyr o Cys. Si el péptido comprende o consiste esencialmente en la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, dicha secuencia es la parte del extremo C del péptido.

45

[0036] Los péptidos preferidos comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la secuencia QRFSR.

[0037] Más particularmente, un péptido es el péptido que consiste en la secuencia QRFSR (SEQ ID N° 3).

[0038] Otro péptido es el péptido que consiste en la secuencia YQRFSR (SEQ ID N° 4).

[0039] Otro péptido es el péptido que consiste en la secuencia CQRFSR.

[0040]

55 En todo el texto,
Glp es piroglutamato,
Tyr o Y es Tirosina,
Gln o Q es glutamina,
Arg o R es arginina,
60 Phe o F es fenilalanina,
Ser o S es serina,
Cys o C para cisteína.

[0041] Los péptidos pueden prepararse de un modo convencional por síntesis de péptidos en fase líquida o sólida por acoplamiento sucesivos de los diferentes residuos de aminoácidos que van a incorporarse (del extremo N al extremo C en fase líquida, o del extremo C al extremo N en fase sólida) en los que los extremos N y las

cadena lateral reactiva se bloquea previamente por grupos convencionales.

[0042] Para la síntesis en fase sólida, la técnica descrita por Merrifield puede usarse en particular. Alternativamente, también puede usarse la técnica descrita por Houbenweyl en 1974.

5

[0043] Para más detalles puede hacerse referencia al documento WO 98/37100.

[0044] Los péptidos también pueden obtenerse usando procedimientos de ingeniería genética.

10 **[0045]** Los miméticos, que incluyen peptidomiméticos, retienen la especificidad de unión y/o actividad fisiológica del péptido parental que incluye derivado peptídico, como se ha descrito anteriormente. Tal como se utiliza en el presente documento, un "mimético" es una molécula que mimetiza algunas propiedades de los péptidos naturales, preferentemente su especificidad de unión y actividad fisiológica. Los miméticos preferidos se obtienen por modificación estructural de péptidos según la invención, preferentemente usando aminoácidos no naturales, D-aminoácido en lugar de L-aminoácido, limitaciones conformacionales, sustitución isostérica, ciclación u otras modificaciones. Otras modificaciones preferidas incluyen, sin limitación, aquellas en las que uno o más enlaces amida son sustituidos por un enlace no amida, y/o una o más cadenas laterales de aminoácidos son sustituidas por un grupo químico diferente, o uno o más del extremo N, el extremo C o una o más cadenas laterales son protegidas por un grupo protector, y/o se introducen dobles enlaces y/o ciclación y/o estereoespecificidad en la cadena de aminoácidos para aumentar la rigidez y/o afinidad de unión.

[0046] Basándose en la estructura cristalina del dominio de unión de la metalo-ectopeptidasa elegida como diana por el péptido parental, los miméticos también pueden obtenerse por medio del desarrollo de diseños de fármacos asistidos por ordenador (Oefner y col. (2000); Gomeni y col. (2001); Jones y col. (2002); Kan (2002)).

25

[0047] Todavía otras modificaciones preferidas incluyen aquellas previstas para potenciar la resistencia a degradación enzimática, mejora en la biodisponibilidad, en particular por tejidos nerviosos y de gónadas, y más generalmente en las propiedades farmacocinéticas y especialmente comprenden:

- 30 - proteger los grupos hidrófilos NH₂ y COOH por esterificación (COOH) con alcoholes lipófilos o por amidación (COOH) y/o por acetilación (NH₂) o cadena hidrófoba de carboxialquilo o aromática añadida en el extremo NH₂;
- isómeros de retroinversión de los enlaces amida CO-NH o metilación (o cetometileno, metilenoxi, hidroxietileno) de las funciones amida;
- 35 - sustitución de L-aminoácidos por D-aminoácidos.

35

[0048] Todas estas variaciones son muy conocidas en la técnica. Por tanto, dadas las secuencias de péptidos descritas en el presente documento, a aquellos expertos en la materia se les permite diseñar y producir miméticos que tienen características de unión y/o actividades fisiológicas similares a o superiores a las de tales péptidos (véase, por ejemplo, Horwell y col., (1996); Liskamp y col., (1994); Gante y col., (1994); Seebach y col. (1996)).

40

[0049] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido de BPLP" se refiere a proteína BPLP, péptidos derivados de BPLP, péptidos de maduración de BPLP y derivados peptídicos de la invención y miméticos, que incluyen peptidomiméticos, descritos en el presente documento.

45

[0050] La solicitud también describe un complejo molecular que comprende:

- un receptor de metalo-ectopeptidasa, especialmente un receptor de NEP o un receptor de APN, especialmente un receptor de NEP, sitio de unión de la proteína BPLP o productos de maduración de la misma, por ejemplo, QRFSR;
- 50 - la proteína BPLP o productos de maduración de la misma, por ejemplo, QRFSR.

50

Ácidos nucleicos, procedimientos de expresión y procedimientos de detección

[0051] También se describen ácidos nucleicos, también llamados polinucleótidos, tales como moléculas de ADN o ARN, que codifican los péptidos, que incluyen derivados peptídicos, definidos anteriormente, aunque se tiene en cuenta la degeneración del código genético.

55

[0052] Por consiguiente, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican péptidos derivados de la proteína BPLP humana y derivados peptídicos de los mismos.

60

[0053] Particularmente, la presente solicitud describe ácidos nucleicos que codifican péptidos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg como se ha definido anteriormente. Cuando el péptido comprende o consiste esencialmente en la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, dicha secuencia es la parte del extremo C del péptido. En realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos codifican péptidos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la secuencia QRFSR. En una realización más preferida, un ácido nucleico codifica QRFSR o un ácido nucleico codifica YQRFSR.

65

[0054] Los ácidos nucleicos incluyen secuencias que son hibridables con cualquiera de las secuencias anteriores o sus secuencias complementarias bajo condiciones de hibridación convencionales, preferentemente condiciones de alta rigurosidad.

5

[0055] Una molécula de ácido nucleico es "hibridable" con otra molécula de ácido nucleico cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico pueda hibridarse con la otra molécula de ácido nucleico bajo las condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en disolución (véase Sambrook y col., 1989). Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. Para el cribado preliminar para ácidos nucleicos homólogos pueden usarse condiciones de hibridación de baja rigurosidad, correspondientes a una Tf (temperatura de fusión) de 55 °C, por ejemplo, 5x SSC, 0,1 % de SDS, 0,25 % de leche, y sin formamida; o 30 % de formamida, 5x SSC, 0,5 % de SDS). Condiciones de hibridación de rigurosidad moderada se corresponden con una mayor Tf, por ejemplo, 40 % de formamida, con 5x o 6x SCC. Condiciones de hibridación de alta rigurosidad se corresponden con una mayor Tf, por ejemplo, 50 % de formamida, 5x o 6x SCC. SCC es un NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación son posibles desapareamientos entre bases. La rigurosidad apropiada para hibridar ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y el grado de complementación, variables muy conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de Tf para híbridos de ácidos nucleicos que tienen aquellas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a mayor Tf) de hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN: ARN, ADN: ARN, ADN: ADN. Para híbridos superiores a 100 nucleótidos de longitud se han derivado ecuaciones para calcular Tf (véase Sambrook y col., arriba, 9.50-9.51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de desapareamientos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook y col., arriba, 11.7-11.8). Una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos; preferentemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos.

[0056] En una realización específica, el término "condiciones de hibridación convencionales" se refiere a una Tf de 55 °C, y utiliza condiciones como se exponen anteriormente. En una realización preferida, la Tf es 60 °C. En una realización más preferida, la Tf es 65 °C. En una realización específica, "alta rigurosidad" se refiere a hibridación y/o condiciones de lavado a 68 °C en 0,2 X SSC, a 42 °C en 50 % de formamida, 4 X SSC, o en condiciones que permiten niveles de hibridación equivalentes a aquellos observados bajo cualquiera de estas dos condiciones.

[0057] La presente solicitud describe vectores para la clonación y/o expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos y una célula huésped que comprende el ácido nucleico o dicho vector, es decir, una célula huésped en la que se transfirió al menos uno de estos vectores. El vector de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido, incluyendo un derivado peptídico, o proteína, estando dichas secuencias de ácidos nucleicos operativamente ligadas a elementos que permiten su expresión. Dicho vector contiene ventajosamente una secuencia promotora, señales para la iniciación y terminación de la traducción, además de regiones apropiadas para la regulación de la traducción. Su inserción en la célula huésped puede ser transitoria o estable. Dicho vector también puede contener señales específicas para la secreción de la proteína traducida.

[0058] Estas diversas señales de control están seleccionadas según la célula huésped y pueden insertarse en vectores que se auto-repican en la célula huésped seleccionada o en vectores que integran el genoma de dicho huésped.

[0059] Las células huésped pueden ser procariotas o eucariotas, que incluyen, pero no se limitan a, bacterias, levaduras, células vegetales, células de insecto, células de mamífero, que incluye líneas celulares que están comercialmente disponibles. Ejemplos preferidos para células huésped son COS-1, células 293 o células CHO.

50

[0060] Además, se describe un procedimiento para producir un péptido de BPLP recombinante, en el que dicha célula huésped se transfecta con dicho vector de expresión y se cultiva en condiciones que permiten la expresión de un péptido de BPLP. La transfección de la célula huésped puede realizarse usando cualquiera técnica convencional, tal como electroporación o precipitación con fosfato de calcio o Lipofectine®.

55

[0061] La proteína o péptido puede entonces recogerse y purificarse por medio de procedimientos muy conocidos para la purificación: el péptido o proteína recombinante puede purificarse de lisados o extractos de células, del sobrenadante del medio de cultivo, mediante procedimientos tales como cromatografía por HPLC, técnicas de inmunoafinidad con anticuerpos específicos, y similares.

60

[0062] La presente solicitud describe además procedimientos de pronóstico y/o diagnóstico *in vitro* en los que las secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento o sondas o cebadores derivados de las mismas se usan para detectar síntesis anómala, que incluye síntesis alta o baja anormal, o anomalías genéticas al nivel de genes *BPLP*.

65

[0063] Por tanto, la solicitud describe un procedimiento *in vitro* para pronóstico y/o diagnóstico de una afección

que implica una producción alterada de BPLP o cualquiera de sus productos de maduración, cuyo procedimiento comprende detectar en una muestra biológica de un sujeto de prueba una anomalía en términos de calidad y/o cantidad en el gen BPLP o en su transcrito.

5 **[0064]** El término “pronóstico” se refiere a la determinación o confirmación de una probabilidad de que se produzca una enfermedad o afección.

[0065] La presente solicitud describe más particularmente un procedimiento para detectar una anomalía en el gen BPLP que comprende las etapas de:

- 10 - poner en contacto una muestra biológica que contiene ADN con oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación de todo o parte del gen BPLP, habiéndose convertido el ADN contenido en la muestra en accesible, cuando corresponda, a la hibridación, y en condiciones que permiten una hibridación de los cebadores con el ADN contenido en la muestra biológica;
- amplificar dicho ADN;
- 15 - detectar los productos de amplificación;
- comparar los productos amplificados tal y como se han obtenido con los productos amplificados obtenidos con una muestra biológica de control normal, y así detectar una posible anomalía en el gen BPLP.

[0066] El procedimiento también puede aplicarse a la detección de una anomalía en el transcrito del gen BPLP, amplificando los ARNm contenidos en una muestra biológica, por ejemplo, por RT-PCR.

[0067] Por tanto, otro objeto es un procedimiento para detectar una anomalía en el transcrito de BPLP, como se ha definido previamente que comprende las etapas de:

- 25 - producir ADNc a partir del ARNm contenido en una muestra biológica;
- poner en contacto dicho ADNc con oligonucleótidos específicos que permiten la amplificación de todo o parte del transcrito del gen *BPLP*, en condiciones que permiten una hibridación de los cebadores con dicho ADNc;
- amplificar dicho ADNc;
- 30 - detectar los productos de amplificación;
- comparar los productos amplificados tal y como se han obtenido con los productos amplificados obtenidos con una muestra biológica de control normal, y así detectar una posible anomalía en el transcrito del gen BPLP.

35 **[0068]** Esta comparación de los productos amplificados obtenidos de la muestra biológica con los productos amplificados obtenidos con una muestra biológica normal es una comparación cuantitativa y/o una comparación cualitativa. En este último caso, la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por hibridación de sondas específicas, por secuenciación o por análisis de sitios de restricción.

40 **[0069]** Un experto en la materia conoce muy bien los procedimientos convencionales para analizar el ADN contenido en una muestra biológica y para diagnosticar un trastorno genético. Están disponibles muchas estrategias para análisis genotípicos.

[0070] Preferentemente puede usarse el procedimiento de DGGE (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante) o el procedimiento de SSCP (polimorfismo de conformaciones monocatenarias) para detectar una anomalía en el gen BPLP. Tales procedimientos son preferentemente seguidos por secuenciación directa. El procedimiento de RT-PCR puede usarse ventajosamente para detectar anomalías en el transcrito de BPLP, ya que permite visualizar las consecuencias de una mutación de corte y empalme tal como salto de exón o corte y empalme anómalo debido a la activación de un sitio críptico. Este procedimiento también es preferentemente seguido por secuenciación directa. La técnica más recientemente desarrollada usando chip de ADN también puede implementarse ventajosamente para detectar una anomalía en el gen BPLP.

[0071] Estos procedimientos para detectar una anomalía en el gen BPLP, o en su transcrito, son particularmente útiles para identificar mutaciones que producen proteína BPLP o productos de maduración no funcionales, y son ventajosos para el pronóstico y/o diagnóstico *in vitro* de enfermedades en las que participa el gen BPLP.

[0072] Ejemplos de tales enfermedades son las enfermedades citadas en la sección “Aplicación terapéutica”.

60 **Anticuerpos y procedimientos de detección**

[0073] La presente solicitud proporciona además anticuerpos, específicamente dirigidos contra (es decir, que reconocen específicamente) la proteína BPLP. La presente solicitud describe anticuerpos, específicamente dirigidos contra (es decir, que reconocen específicamente) los péptidos definidos anteriormente, incluyendo derivados peptídicos.

[0074] Por consiguiente, la presente solicitud describe anticuerpos dirigidos contra péptidos derivados de la proteína BPLP humana, y derivados peptídicos de la misma.

[0075] Más particularmente, la presente solicitud describe anticuerpos dirigidos contra péptidos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg como se ha definido anteriormente. Cuando el péptido comprende o consiste esencialmente en la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, dicha secuencia es la parte del extremo C del péptido. En realizaciones preferidas, los anticuerpos están dirigidos contra (es decir, que reconocen específicamente) péptidos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en la secuencia QRFSR. En una realización más preferida, los anticuerpos están dirigidos contra (es decir, que reconocen específicamente) QRFSR o anticuerpos dirigidos contra (es decir, que reconocen específicamente) YQRFSR o anticuerpos dirigidos contra (es decir, que reconocen específicamente) CQRFSR.

[0076] El término "anticuerpo" en sus diversas formas gramaticales se usa en el presente documento para referirse a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio o paratope de combinación de anticuerpo. Moléculas de anticuerpo a modo de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y porciones de una molécula de inmunoglobulina, que incluyen aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v).

[0077] Son más particularmente útiles los anticuerpos que inhiben la interacción de un producto de maduración de BPLP o un derivado peptídico del mismo con su receptor.

[0078] Aunque pueden usarse anticuerpos policlonales, se prefieren anticuerpos monoclonales, ya que son más reproducibles a la larga.

[0079] Los procedimientos para producir anticuerpos policlonales también son muy conocidos. Normalmente, tales anticuerpos pueden producirse administrando subcutáneamente la proteína o péptido, que incluye péptido conjugado, a conejos blancos de Nueva Zelanda que se han sangrado por primera vez para obtener suero pre-inmune. Los antígenos pueden inyectarse a un volumen total de 50 µl por sitio en diez sitios diferentes o al menos cinco sitios diferentes. Entonces, los conejos se sangran cinco semanas después de la primera inyección y se refuerzan periódicamente con el mismo antígeno administrado subcutáneamente a concentración cinco veces menor que la inyección primaria al máximo dependiendo de la calidad de la respuesta inmunitaria tres veces cada seis semanas. Entonces, una muestra de suero se recoge cada 10 días después de cada refuerzo. Entonces, los anticuerpos policlonales se recuperan del suero por cromatografía de afinidad usando el antígeno correspondiente para capturar el anticuerpo. Este y otros procedimientos para producir anticuerpos policlonales se describen en E. Harlow y col., editores, *Anticuerpos: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988).

[0080] Un "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que sólo contiene una especie de sitio de combinación de anticuerpo que puede inmunorreaccionar con un epítoto particular. Por tanto, un anticuerpo monoclonal normalmente muestra una única afinidad de unión por cualquier epítoto con el que inmunorreacciona. Por tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmunoespecífico para un epítoto diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico.

[0081] Los procedimientos de laboratorio para preparar anticuerpos monoclonales son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y col., arriba). Los anticuerpos monoclonales (Mab) pueden prepararse inmunizando un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cabra, humano y similares, contra la proteína BPLP purificada, productos de maduración de BPLP o derivados peptídicos de la misma, que incluyen péptidos de BPLP conjugados. Las células productoras de anticuerpo en el mamífero inmunizado se aíslan y se fusionan con mieloma o células de heteromieloma para producir células híbridas (hibridoma). Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se usan como fuente del anticuerpo monoclonal deseado.

[0082] Aunque los Mab pueden producirse por cultivo de hibridomas, los Mab no deben estar limitados. También se contempla el uso de Mab producidos por la expresión de ácido nucleico clonado a partir de un hibridoma. Es decir, el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma puede transferirse a otra línea celular para producir un transformante. El transformante se distingue genotípicamente del hibridoma original, pero también puede producir moléculas de anticuerpo, que incluyen fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de anticuerpo completo correspondientes a aquellos secretados por el hibridoma. Además, la bibliografía proporciona procedimientos para formar anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios y variaciones similares sobre un fragmento de anticuerpo inmunorreactivo básico. Todos estos se consideran en tanto que una clase y especificidad de anticuerpo se describe y reivindica, independientemente de la estructura de variante precisa que un experto en la materia pueda construir.

[0083] La presente solicitud describe un procedimiento *in vitro* para el diagnóstico, pronóstico o determinación de la evolución de una afección que implica una producción alterada (es decir, una disminución o un aumento de la producción en comparación con un sujeto de control) de BPLP o de un péptido que es un producto de maduración.

El procedimiento comprende detectar, o cuantificar en una muestra biológica de un sujeto de prueba, una proteína BPLP o un péptido que es un producto de maduración según la invención, especialmente QRFSR, en comparación con la misma en una muestra biológica de un sujeto de control.

5 **[0084]** Ejemplos de tales afecciones son enfermedades citadas en la sección “Aplicaciones terapéuticas”.

[0085] Una “muestra biológica” es un líquido de un sujeto que incluye, por ejemplo, suero, sangre, líquido espinal, líquido cefalorraquídeo, orina, leche, saliva o un extracto de tejido o una biopsia de tejido u órgano tal como cerebro, médula espinal, tejido óseo, riñón, próstata, placenta, tejido dental, mucosa glandular del estómago,
10 intestino, tejido de las glándulas salivales.

[0086] “Un sujeto” o “un paciente” es un vertebrado, por ejemplo un mamífero, preferentemente un ser humano, independientemente de su edad, sexo y condición general. También están englobados niños y lactantes. El sujeto de prueba puede ser asintomático, puede considerarse probable que desarrolle la enfermedad o afección.
15 También pueden probarse sujetos con una sospecha de un trastorno diana o sujetos que ya han mostrado síntomas de la enfermedad o afección.

[0087] El “sujeto de control” puede ser un sujeto sano o un sujeto sin ningún trastorno aparente que pueda implicar la proteína BPLP o uno de sus productos de maduración. Con el fin de determinar la evolución de una
20 afección que implica la proteína BPLP o uno de sus productos de maduración, puede ser muy útil probar un sujeto para la expresión de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, y monitorizar el efecto de un fármaco o la diseminación de la afección probándolo una segunda vez, por ejemplo, algunas semanas después. En ese caso, los resultados de la segunda prueba se comparan con los resultados de la primera prueba, y en general también con los resultados obtenidos con un sujeto “sano”. Entonces, el “sujeto de control” se refiere tanto al mismo
25 sujeto de prueba como a un “sujeto sano”.

[0088] El término “diagnóstico” se refiere a la determinación o la confirmación de una enfermedad o afección en un sujeto.

30 **[0089]** El término “pronóstico” se refiere a la determinación o confirmación de que se produce una probabilidad de una enfermedad o afección.

[0090] La “expresión o producción de una proteína BPLP o un producto de maduración de la misma” puede determinarse ensayando la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma.
35

[0091] Tales procedimientos de ensayo comprenden poner en contacto una muestra biológica con un componente de unión que puede interaccionar selectivamente con una proteína BPLP o productos de maduración de la misma, especialmente QRFSR, presente en la muestra. El componente de unión es generalmente un anticuerpo, que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal.
40

[0092] Los procedimientos para producir anticuerpos como se han descrito anteriormente según la terapia también pueden adaptarse fácilmente para producir anticuerpos útiles para los procedimientos de diagnóstico descritos en el presente documento.

45 **[0093]** Por ejemplo, la presencia o producción de proteína BPLP o de cualquiera de sus productos de maduración, o una forma mutada de la proteína o del producto de maduración, puede detectarse incubando una muestra biológica con un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína BPLP o un anticuerpo que reconoce específicamente un producto de maduración de la misma, especialmente QRFSR, por ejemplo, usando técnicas electroforéticas y de inmunodiagnóstico líquido o sólido convencionales, que incluyen inmunoensayos tales como
50 ensayos de competencia, reacción directa o de tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, transferencia Western; pruebas de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzima tales como ELISA; ensayos de tipo biotina / avidina; radioinmunoensayo tal como aquellos usando proteína BPLP radiyodada o tritiada o cualquiera de sus productos de maduración, especialmente QRFSR; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones generalmente incluyen revelar marcas tales como marcas fluorescentes,
55 quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas o moléculas de colorante, u otros procedimientos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos reaccionados con el mismo.

[0094] Los ensayos anteriormente mencionados generalmente implican la separación de proteína BPLP sin unir o productos de maduración sin unir de la misma, especialmente QRFSR sin unir, de proteína BPLP unida o
60 productos de maduración, especialmente QRFSR, al anticuerpo específico que está inmovilizado sobre una fase sólida. Los soportes sólidos que pueden usarse incluyen soportes tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillos de microtítulo); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, láminas o pocillos de microtítulo); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares.
65

[0095] Por tanto, en una realización particular, la presencia de proteína BPLP unida o productos de

maduración de la misma, especialmente QRFSR, de una muestra biológica puede detectarse fácilmente usando un aglutinante secundario que comprende otro anticuerpo, que puede conjugarse fácilmente con una marca de enzima detectable, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o ureasa, usando procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia. Entonces, un sustrato de enzima apropiado se usa para generar una señal detectable, tal como, por ejemplo, una señal cromogénica o fluorogénica. En otras realizaciones relacionadas pueden ponerse en práctica técnicas de ELISA de tipo competitivo usando procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia.

[0096] Los reactivos de ensayo anteriormente descritos, que incluyen los anticuerpos, pueden proporcionarse en kits, con instrucciones adecuadas y otros reactivos necesarios, con el fin de realizar inmunoensayos como se ha descrito anteriormente. El kit también puede contener, dependiendo del inmunoensayo particular usado, marcas adecuadas y otros reactivos y materiales envasados (es decir, tampones de lavado y similares). Pueden realizarse inmunoensayos convencionales, tales como aquellos descritos anteriormente, usando estos kits.

15 **Terapia génica**

[0097] La modulación de la actividad de metalopeptidasa de membrana puede lograrse modificando (es decir, aumentando o disminuyendo) la cantidad de proteína BPLP, los productos de maduración de la misma en las células de un paciente y liberación de la misma, o expresando y posiblemente liberando un péptido, incluyendo un derivado peptídico, tal como se define anteriormente. El aumento de la cantidad de proteína BPLP o productos de maduración de la misma en las células de un paciente y posiblemente liberación de la misma, expresando y posiblemente liberando un péptido, tal como se define anteriormente, incluyendo un derivado peptídico, puede realizarse transfectando las células con un vector que expresa BPLP o un vector que expresa una proteína BPLP, un producto de maduración de BPLP o un péptido tal como se define anteriormente, incluyendo un derivado peptídico, por ejemplo, en forma de un ADN desnudo o como un vector vírico.

[0098] Preferentemente, el ácido nucleico forma parte de un vector. Tal vector es un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante operativamente asociada a secuencias que controlan la expresión de la proteína o péptido en una célula transflectada con el vector.

[0099] El uso de un vector tal hace de hecho posible mejorar la administración del ácido nucleico a las células del sujeto y especialmente a las células que van a tratarse, y también aumentar su estabilidad en dichas células, que hace posible obtener un efecto terapéutico duradero. Además, es posible introducir varias secuencias de ácidos nucleicos en el mismo vector, que también aumenta la eficacia del tratamiento.

[00100] El vector usado puede ser de origen variado, en tanto que pueda transformar células animales, preferentemente células humanas. En una realización preferida, se usa un vector vírico que puede elegirse de adenovirus, retrovirus, virus adenoasociados (AAV), lentivirus, virus del herpes, citomegalovirus (CMV), virus de la variolovacuna y similares. En la bibliografía se han descrito vectores derivados de adenovirus, retrovirus o AAV, vectores retrovíricos derivados del VIH, que incorporan secuencias de ácidos nucleicos heterólogos.

[00101] La presente solicitud también describe cualquier virus recombinante que comprende, insertado en su genoma, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína BPLP, un producto de maduración de BPLP o un péptido como se define anteriormente, que incluye un derivado peptídico.

[00102] Ventajosamente, el virus recombinante es un virus defectuoso que carece de al menos las secuencias necesarias para la replicación de dicho virus en la célula infectada.

[00103] Es particularmente ventajoso usar las secuencias de ácidos nucleicos descritas en una forma incorporada en un adenovirus, un AAV o un retrovirus recombinante defectuoso.

[00104] La administración de genes que elige diana se describe en la publicación de patente internacional WO 95/28494, publicada en octubre de 1995.

[00105] Alternativamente, el vector puede introducirse *in vivo* por lipofección. Durante la pasada década ha habido un aumento del uso de liposomas para la encapsulación y transfección de ácidos nucleicos *in vitro*. La información referente al liposoma también se proporciona en la sección "Composición farmacéutica" de la presente solicitud.

[00106] También es posible introducir el vector *in vivo* como un plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudo para terapia génica pueden introducirse en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión de células, DEAE-dextrano, precipitación con fosfato de calcio, Lipofectamine®, uso de una pistola de genes, o uso de un transportador de vectores de ADN.

Composiciones farmacéuticas

- [00107]** Los péptidos de BPLP (es decir, la proteína BPLP, péptidos derivados de BPLP, productos de maduración, péptidos definidos anteriormente, incluyen derivados peptídicos y miméticos), o los ácidos nucleicos que codifican tales péptidos de BPLP y anticuerpos contra dichos péptidos de BPLP, pueden formularse en composiciones farmacéuticas en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo las composiciones farmacéuticas son adecuadas para una administración tópica, oral, sublingual, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.
- [00108]** Una materia objeto es también una composición farmacéutica que comprende un polímero de dicho péptido BPLP o un mimético del mismo.
- [00109]** Preferentemente, el ácido nucleico forma parte de un vector que expresa dicho ácido nucleico.
- [00110]** Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse.
- [00111]** Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden ser en particular soluciones salinas estériles isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica permiten la constitución de disoluciones inyectables.
- [00112]** Las dosis de péptido de BPLP, anticuerpos o ácido nucleico usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.
- [00113]** Para preparar composiciones farmacéuticas para la terapia de péptidos, una cantidad eficaz del péptido de BPLP puede disolverse o dispersarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso.
- [00114]** Ejemplos de formulaciones farmacéuticas se proporcionan más adelante.
- [00115]** Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz del péptido de BPLP, ácido nucleico o anticuerpos, en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso.
- [00116]** “Farmacéuticamente” o “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administran a un animal, que incluye un ser humano, según convenga.
- [00117]** Como se usa en el presente documento, un “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, su uso se contempla en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos complementarios.
- [00118]** Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser líquida hasta el punto que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- [00119]** Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.
- [00120]** El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[00121] Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con una variedad de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

[00122] Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y en cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

[00123] Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería estar adecuadamente tamponada, si fuera necesario, y el diluyente líquido convertirse primero en isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para aquellos expertos en la materia en vista de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y tanto añadirse a 1000 ml del líquido de hipodermocclisis como inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, páginas 1035 – 1038 y 1570 – 1580). Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que está tratándose. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

[00124] El péptido de BPLP de interés puede formularse dentro de una mezcla terapéutica que comprende aproximadamente 0,0001 a 100 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 1 miligramo a 10 miligramos o incluso aproximadamente 10 a 100 miligramos por dosis más o menos. También pueden administrarse múltiples dosis. Dosificaciones preferidas son de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg, y lo más preferentemente de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg.

[00125] Además de las formulaciones para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración por vía oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación controlada; y cualquier otra forma actualmente usada, que incluye cremas.

[00126] Se contemplan otras vías de administración, que incluyen disoluciones o esprays nasales, aerosoles o inhalantes, o supositorios y pesarios vaginales o rectales.

[00127] En ciertas realizaciones se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de agentes de péptidos de BPLP, además de vectores de ácido nucleico o anticuerpos en células huésped.

[00128] La solicitud también describe composiciones farmacéuticas definidas anteriormente que comprenden además un segundo agente farmacéutico que actúa de forma sinérgica con el péptido de BPLP.

Aplicaciones terapéuticas

[00129] Los péptidos de BPLP descritos anteriormente, anticuerpos contra dichos péptidos de BPLP o ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos de BPLP son útiles en la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que se busca una modulación de la actividad de una metalo-ectopeptidasa de membrana, más particularmente una metalopeptidasa de cinc de membrana, tal como NEP y APN.

[00130] Los sustratos de NEP naturales son principalmente hormonas peptídicas: encefalinas, sustancia P, bradiquina, angiotensina II y péptido natriurético auricular que desempeñan una función clave en el control de la percepción de dolor central y periférico, fenómenos inflamatorios, intercambio de minerales y/o tono arterial (Roques y col., 1993).

[00131] Más particularmente, la endopeptidasa neutra, NEP 24-11, está distribuida tanto en los tejidos nerviosos como periféricos de mamíferos, y en la periferia es particularmente abundante en el riñón y la placenta. En estos tejidos, la metalopeptidasa de la superficie celular NEP participa en el procesamiento pos-secretorio y metabolismo de neuropéptidos, péptidos inmunorreguladores sistémicos y hormonas peptídicas. Controlando los niveles activos de péptidos reguladores en circulación o secretados, la NEP modula su acción mediada por receptores fisiológicos. Por tanto, la NEP anclada a membrana participa en la regulación de la actividad de: péptidos

vasoactivos potentes tales como la sustancia P, bradiquina (BK), péptido natriurético auricular (ANP) y angiotensina II (All); péptidos inflamatorios / inmunorreguladores potentes tales como la sustancia P y BK y fMet-Leu-Phe (fMLP); neuropéptidos opioides potentes tales como Met y Leu-enkefalinas (Enk) y péptidos reguladores del intercambio de minerales y de la homeostasis de fluidos tales como ANP, péptido natriurético tipo C (CNP) y péptido natriurético tipo B (BNP). Sin embargo los niveles de estos péptidos cambian por la formación / degradación inducida por NEP sólo en regiones en las que son tónicamente liberados o en las que su liberación es desencadenada por un estímulo.

5 **[00132]** Desde un punto de vista integrativo, la actividad biológica de NEP es para controlar los niveles activos de señales peptidérgicas implicadas en la regulación de la tensión arterial, en fenómenos inflamatorios y en la homeostasis de agua-mineral, además de en el control del procesamiento de dolor. Desde un punto de vista clínico, esto confirma el hecho de que la NEP sea una diana de fármaco importante en diversos estados de enfermedad. Por ejemplo, inhibiendo la NEP, aumentando así los niveles y la duración de la acción de opioides endógenos centrales o periféricos, podría obtenerse un efecto analgésico o un efecto antidepresivo, o inhibiendo la formación de All endógena e inactivación de la sustancia P, BK y ANP podrían obtenerse agentes antihipertensores, natriuréticos y diuréticos. La ventaja principal de modificar las concentraciones de péptidos endógenos por uso de inhibidores de NEP es que los efectos farmacológicos sólo se inducen en receptor estimulado por los efectores naturales, y son críticamente dependientes de la liberación tónica o provocada por estímulos de los efectores naturales que suceden tras situaciones estresantes medioambientales, de comportamiento y fisiopatológicas (Roques y col., 1993).

10 **[00133]** Ejemplos de metalopeptidasas de membrana de mamífero, además de NEP, son ECE (enzimas convertoras de endotelina), en particular ECE1 y ECE2, el antígeno de superficie de células de eritrocito KELL y el producto del gen PEX asociados a raquitismo hipofosfatémico ligado a X, además de ACE (enzima convertora de angiotensina) y APN (aminopeptidasa N).

15 **[00134]** La inhibición de ACE y/o ECE tiene una aplicación significativa en el tratamiento de hipertensión y la prevención y tratamiento de aterosclerosis.

20 **[00135]** La inhibición de APN conjuntamente con NEP tiene aplicación significativa en el tratamiento de dolor y depresión.

25 **[00136]** La inhibición de metalopeptidasas de membrana relacionadas tiene efectos terapéuticos en el tratamiento de tumores, concretamente cánceres de ovario, colorrectal, cerebro, pulmón, páncreas, gástrico y por melanoma, y la reducción de la incidencia de metástasis, aterosclerosis y/o hipertensión. Las inhibiciones de metalopeptidasas de membrana relacionadas también tienen efectos terapéuticos en el control del dolor. Tales efectos antinociceptivos sobre el dolor agudo son efectos analgésicos, pero también efectos sobre dolor inflamatorio crónico tal como artritis o enfermedad inflamatoria del intestino.

30 **[00137]** Además, se espera que la inhibición de metalopeptidasa bacteriana o vírica tenga efectos antiinfecciosos.

35 **[00138]** Las metalopeptidasas desempeñan una función importante en la invasión de tejido huésped patógeno y procesos inmunológicos e inflamatorios, por ejemplo, aquellos de *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Legionella pneumophila*.

40 **[00139]** Además, las metalopeptidasas bacterianas, especialmente metalopeptidasas de cinc, desempeñan una función importante en las enfermedades producidas por toxinas proteolíticas tales como las toxinas de *B. anthracis* (factor letal del carbunco) y las neurotoxinas de *C. tetanum* y *botulinum*.

45 **[00140]** Otras metalopeptidasas desempeñan una función importante en diversas infecciones tales como infecciones producidas por el VIH (documento FR 2 707 169).

50 **[00141]** La importancia de inhibidores de proteinasas para el tratamiento de enfermedades bacterianas o víricas puede encontrarse en J. Potempa y J. Travis.

55 **[00142]** Las diferentes funciones de las metalopeptidasas se describen en Turner y col., 2001; Kenny y col., 1977; Kenny y col., 1987; Beaumont y col., 1996.

60 **[00143]** Se contempla la utilización de los péptidos o ácidos nucleicos terapéuticos anteriormente descritos como agentes analgésicos o agentes antidepresivos mediante la inhibición de NEP y APN a niveles periféricos, espinales y/o supraespinales y, por tanto, aumentan los niveles y la duración de la acción de opioides endógenos centrales o periféricos, que incluye enkefalinas.

65 **[00144]** Se contempla la prevención o el tratamiento de dolor, especialmente dolor agudo y crónico, dolor inflamatorio visceral y neuropático.

[00145] También se describe la prevención o el tratamiento de cualquier desequilibrio hidro-mineral. Entre los

trastornos diana pueden citarse trastornos de huesos, dientes, riñón, paratiroides, de páncreas, intestino, estómago mucosa, próstata y de las glándulas salivales que son producidos por desequilibrio hidro-mineral.

[00146] En particular, el trastorno puede seleccionarse del grupo que consiste en hiper o hipo-paratiroidismo, osteoporosis, pancreatitis, litiasis de las glándulas submandibulares, nefrolitiasis y osteodistrofia.

[00147] La prevención o el tratamiento de trastornos interpersonales y del comportamiento alterados es de interés adicional. Diversos trastornos mentales se describen en el documento WO 02/051434.

[00148] En particular, la invención se refiere a cualquier trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastorno por evitación, trastorno por disminución de la conciencia, trastorno autístico, trastorno por déficit de atención e hiperactividad, trastorno por excitación sexual, hospitalismo, funcionamiento y relación interpersonal alterada con el mundo exterior, trastorno de personalidad esquizoide, esquizofrenia, trastorno depresivo, disminución del interés en el medioambiente, actividad social alterada ligada a la sexualidad y comportamiento sexual alterado, que incluye eyaculación inoportuna y sexual hiperactivo.

[00149] Las enfermedades en las que se busca una modulación de una metalopeptidasa de membrana incluyen hipertensión, aterosclerosis, tumor, artritis inflamatoria y enfermedad del intestino.

[00150] También se describe el tratamiento de infecciones. Especialmente, la importancia de inhibidores de proteinasa para el tratamiento de enfermedades bacterianas o víricas puede encontrarse en J. Potempa y Travis.

[00151] Los péptidos de BPLP, anticuerpos o ácidos nucleicos descritos anteriormente también son útiles para controlar respuestas inmuno-inflamatorias.

[00152] Los péptidos de BPLP, anticuerpos o ácidos nucleicos como se definen anteriormente también son útiles como agente natriurético o agente diurético.

[00153] Otro objeto es el uso de los péptidos anteriormente descritos como un sustituto en el tratamiento de toxicomanía, notablemente toxicomanía por morfina.

[00154] De hecho, estudios han sugerido que la vulnerabilidad a la toxicomanía y el desarrollo de dependencia adictiva y a fármacos es al menos en parte un resultado de modificaciones pre-existentes o inducidas y/o defecto del sistema opioide endógeno. A este respecto, el uso de péptido de BPLP o ácido nucleico para potenciar los efectos de encefalinas endógenas reducirá los diversos efectos secundarios (signos somáticos de abstinencia) producidos por la interrupción de la administración crónica de morfina o heroína.

[00155] Puede desearse reducir el efecto inhibitorio de los péptidos de BPLP sobre NEP, por ejemplo, usando un anticuerpo contra la proteína BPLP o péptidos. Este potenciamiento de la actividad de NEP es particularmente ventajoso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como una enfermedad o trastorno asociado a amiloidosis. De hecho, se ha mostrado que los inhibidores de neprilisina (un endopeptidasa neutra, NEP o encefalinasa) por inhibidor sintético eleva los niveles de amiloide β (Newell y col., 2003). Leissring y col., 2003, informaron adicionalmente de que la expresión en exceso transgénica de neprilisina en neuronas reduce significativamente los niveles de A β del cerebro, retarda o previene completamente la formación de placas amiloides y su citopatología asociada, y rescata la letalidad prematura presente en ratones transgénicos con proteína precursora amiloide.

[00156] Una enfermedad o trastorno está asociado a amiloidosis cuando los depósitos amiloides o placas amiloides se encuentran en o en la proximidad de tejidos afectados por la enfermedad, o cuando la enfermedad se caracteriza por la producción de exceso de una proteína que es o puede volverse insoluble. Las placas amiloides pueden provocar efectos patológicos directamente o indirectamente por mecanismos conocidos o desconocidos. Ejemplos de enfermedades amiloides incluyen, pero no se limitan a, enfermedades sistémicas tales como enfermedades inflamatorias crónicas, mieloma múltiple, macroglobulinemia, polineuropatía amiloide familiar (portuguesa) y cardiomiopatía (danesa), amiloidosis senil sistémica, polineuropatía amiloide familiar (Iowa), amiloidosis familiar (finlandesa), síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker, nefropatía amiloide familiar con urticaria y sordera (síndrome de Muckle-Wells), carcinoma medular de tiroides, amiloide auricular aislado y amiloidosis asociada a hemodiálisis (HAA); y enfermedades neurodegenerativas.

[00157] El término "enfermedad neurodegenerativa" se refiere a una enfermedad o trastorno del sistema nervioso, particularmente que implica el cerebro, que se manifiesta con síntomas característicos de disfunción cerebral o nerviosa, por ejemplo, lapso de memoria o defectos a corto plazo o a largo plazo, demencia, defectos de la cognición, problemas del equilibrio y la coordinación y deficiencias emocionales y del comportamiento. La presente solicitud se refiere más particularmente a enfermedades neurodegenerativas que están asociadas a amiloidosis. Tales enfermedades están "asociadas a amiloidosis" cuando muestras histopatológicas (biopsia) de tejido cerebral de sujetos que demuestran tales síntomas revelarían formación de placas amiloides. Como las muestras de biopsia de cerebro, especialmente cerebro humano, se obtienen con gran dificultad de sujetos vivos o

en absoluto podrían estar disponibles, frecuentemente la asociación de un síntoma o síntomas de enfermedad neurodegenerativa con amiloidosis se basa en criterios distintos de la presencia de depósitos amiloides, tales como placas o fibrillas, en una muestra de biopsia.

5 **[00158]** En una realización específica, la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Alzheimer (EA). En otras realizaciones, la enfermedad puede ser la rara enfermedad sueca caracterizada por una mutación KM a NL doble en la proteína precursora amiloide (APP) próxima al extremo amino de la porción AP de APP. Otra enfermedad tal es hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo Dutch (HCHA o HCHWA). Otras de tales enfermedades conocidas en la técnica incluyen, pero sin limitación, angiopatía amiloide cerebral esporádica,
10 angiopatía amiloide cerebral hereditaria, síndrome de Down, Parkinson-demencia de Guam y angiopatía amiloide asintomática relacionada con la edad.

[00159] En otro aspecto, la enfermedad neurodegenerativa es una encefalopatía espongiiforme subaguda tal como, pero no se limita a, encefalopatía espongiiforme ovina, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de
15 Gerstmann-Straussler, kuru, enfermedad consuntiva crónica de mula-ciervo y alce, encefalopatía espongiiforme bovina de ganado vacuno y encefalopatía transmisible del visón.

[00160] La solicitud describe adicionalmente el uso de un agente que modula la interacción entre proteína BPLP endógena o producto de maduración, por ejemplo, QRFSR, y una metalopeptidasa de membrana para la
20 preparación de una composición terapéutica para prevenir o tratar enfermedades en la que se busca una modulación de la actividad de dicha metalopeptidasa de membrana.

Procedimientos de cribado

25 **[00161]** Los procedimientos que permiten que un experto en la materia seleccione y purifique compuestos candidatos que se unen a las mismas dianas y tienen una actividad biológica agonista o antagonista de la proteína BPLP o productos de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR, se describen aquí más adelante.

[00162] El compuesto candidato puede ser una proteína, un péptido, una hormona, un anticuerpo o un
30 compuesto sintético que es tanto un péptido como una molécula no peptídica, tal como cualquier compuesto que puede sintetizarse mediante los procedimientos convencionales de química orgánica.

[00163] La solicitud proporciona un procedimiento *in vitro* para cribar compuestos por su capacidad para unirse al sitio de unión a NEP para la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido
35 QRFSR, que comprende las etapas de:

- a) incubar un compuesto candidato con una célula que expresa NEP en presencia de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR, o cualquier péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos de maduración, por ejemplo, el péptido YQRFSR;
- 40 b) determinar la capacidad del compuesto candidato para competir con la proteína BPLP o el producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR, o con el péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos de maduración, por ejemplo, el péptido YQRFSR, para unirse a NEP.

45 **[00164]** Los ensayos de unión del compuesto candidato se realizan generalmente a 4 °C a 25 °C o 37 °C.

[00165] La célula que expresa NEP puede estar en un cultivo celular, tal como una capa de cultivo celular diana confluyente, o una muestra de órgano diana o una muestra de tejido (por ejemplo, criosecciones, tiras, preparaciones de membrana u homogeneizados brutos) que contienen sitios de unión a NEP para la proteína BPLP
50 o un producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR.

[00166] Una muestra de tejido preferida que se usa en los procedimientos de cribado es una preparación de membrana o tiras de médula espinal de un mamífero, un tejido que se sabe que es apropiado para la medición de la actividad de NEP.
55

[00167] Otras muestras de tejido preferidas que pueden usarse en los procedimientos de cribado son todas las preparaciones de tejido periféricas que se sabe que están enriquecidas en la peptidasa NEP y/o que son dianas para la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR. Por ejemplo, puede usarse médula externa renal, placenta, testículos, próstata y hueso de mamífero. Por ejemplo, un
60 procedimiento tal puede aplicarse a tejidos y/o células de origen de ratón, rata o humano o líneas celulares transfectadas con ADNc de metalo-ectopeptidasa, en particular ADNc de NEP, especialmente ADNc de NEP humano.

[00168] La proteína BPLP o producto de maduración de la misma (o el péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados) está preferentemente
65 marcada, por ejemplo, por un marca radiactiva (³²P, ³⁵S, ³H, ¹²⁵I, etc.) o no radiactiva (digoxigenina, colorante Cy-

europio, fluoresceína etc.). Luego se incubaba con la célula que expresa NEP durante un tiempo suficiente y en condiciones para que tenga lugar la unión específica.

[00169] La marca específicamente unida a la célula puede luego cuantificarse en presencia de diversas concentraciones de dicho compuesto candidato, por ejemplo, de 10^{-10} a 10^{-5} M.

[00170] Por consiguiente, se proporciona además un procedimiento para cribar un compuesto que se une específicamente a sitios de unión a NEP para la proteína BPLP o un producto de maduración de los mismos, que comprende las etapas de:

- 10 a) preparar un cultivo celular o preparar una muestra de órgano o una muestra de tejido (tal como criosecciones o tiras o preparaciones de membrana u homogeneizados brutos) que contiene sitios de unión a NEP para la proteína BPLP o un producto de maduración de los mismos;
- 15 b) añadir el compuesto candidato que va a probarse en competencia con concentración de semi-saturación de proteína o producto de maduración de la misma marcados (o un péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados);
- c) incubar el cultivo celular, muestra de órgano o muestra de tejido de la etapa a) en presencia del compuesto candidato durante un tiempo suficiente y en condiciones para que tenga lugar la unión específica;
- 20 d) cuantificar la marca específicamente unida al cultivo celular, muestra de órgano o muestra de tejido en presencia de diversas concentraciones de compuesto candidato (preferentemente 10^{-10} a 10^{-5} M).

[00171] En dicho procedimiento anterior, una concentración de semi-saturación es la concentración de la proteína BPLP marcada o producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR (o el péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados) que se une al 50 % de los sitios de unión a NEP.

[00172] Este procedimiento también permite definir la afinidad relativa del compuesto candidato en comparación con la proteína BPLP, o productos de maduración, por ejemplo, afinidad por QRFSR (o el péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados).

[00173] Otro objeto es un procedimiento para determinar la afinidad relativa de compuestos de ligando que se unen específicamente a sitios de unión a NEP para la proteína BPLP, o productos de maduración (o el péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados), comprendiendo dicho procedimiento las etapas a), b), c) y d) del procedimiento anterior para cada compuesto candidato y que comprende además la etapa e) de comparar la afinidad de cada compuesto candidato cuantificado en la etapa d) con uno de los otros compuestos candidatos.

[00174] Otro objeto es un procedimiento para determinar la afinidad de un compuesto que se une específicamente al sitio de unión a NEP para la proteína BPLP o productos de maduración de la misma, que comprende las etapas de:

- 40 a) preparar un cultivo celular o preparar una muestra de órgano o una muestra de tejido (tal como criosecciones o tiras o preparaciones de membrana u homogeneizados brutos) que contiene sitios de unión a NEP para la proteína BPLP o productos de maduración de la misma;
- 45 b) añadir el compuesto candidato que ha sido previamente marcado con una marca radiactiva o no radiactiva;
- c) incubar el cultivo celular, muestra de órgano o muestra de tejido de la etapa a) en presencia del compuesto candidato marcado durante un tiempo suficiente y en condiciones para que tenga lugar la unión específica; y
- 50 d) cuantificar la marca específicamente unida al cultivo celular, muestra de órgano o muestra de tejido en presencia de diversas concentraciones del compuesto candidato marcado (preferentemente 10^{-10} a 10^{-5} M).

[00175] El compuesto candidato está marcado, por ejemplo, por una marca radiactiva (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I , etc.) o no radiactiva (digoxigenina, colorante Cy-europio, fluoresceína etc.). Entonces se incubaba con la célula que expresa NEP durante un tiempo suficiente y en condiciones para que tenga lugar la unión específica.

[00176] Pueden compararse adicionalmente la afinidad de cada compuesto candidato cuantificado con uno de los otros compuestos candidatos, de manera que se determine la afinidad relativa del compuesto candidato que se une específicamente al sitio de unión a NEP para la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR.

[00177] La solicitud proporciona además un procedimiento *in vitro* para cribar compuestos por su capacidad para actuar de agonistas o antagonistas de la proteína BPLP o productos de maduración de la misma sobre la actividad de NEP, procedimiento que comprende las etapas de:

- 65 a) incubar un compuesto candidato con una célula que expresa NEP en presencia de (i) la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, por ejemplo, el péptido QRFSR, o cualquier péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados, y (ii) un

sustrato de NEP;

b) determinar la endoproteólisis del sustrato de NEP por la NEP, en la que un aumento de la endoproteólisis en presencia del compuesto candidato, en comparación con la endoproteólisis en ausencia del compuesto candidato, es indicativo de una actividad de antagonista; mientras que una disminución de la endoproteólisis en presencia del compuesto candidato, en comparación con la endoproteólisis en ausencia del compuesto candidato, es indicativa de una actividad agonista.

[00178] Como se usa en el presente documento, un agonista de una proteína BPLP o un producto de maduración de la misma es una molécula que tiene la capacidad para inhibir una actividad de metalo-ectopeptidasa, especialmente actividad de NEP o APN.

[00179] Como se usa en el presente documento, un antagonista de una proteína BPLP o un producto de maduración de la misma es una molécula que tiene la capacidad para aumentar una actividad de metalo-peptidasa, especialmente actividad de NEP o APN.

[00180] Además, la actividad agonista o antagonista del compuesto candidato puede evaluarse en la determinación de cambios metabólicos inducidos por este compuesto candidato sobre su diana, tal como la síntesis y/o liberación de los metabolitos del mensajero primario o secundario como resultado de una señal de transducción por las proteínas cinasas o adenilato ciclasa y la activación de una proteína de la familia G.

[00181] En realizaciones particulares, la solicitud describe un procedimiento para cribar un compuesto que es un agonista de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, que comprende las etapas de:

a) preparar un cultivo celular o preparar una muestra de órgano o una muestra de tejido (tal como criosecciones o tiras o preparaciones de membrana u homogeneizados brutos) que contiene sitios de unión a NEP para la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma;

b) incubar el cultivo celular, muestra de órgano o muestra de tejido de la etapa a) a concentraciones que permiten la medición de la actividad enzimática de NEP en presencia del compuesto candidato (preferentemente 10^{-10} a 10^{-5} M), una concentración semi-saturante de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma (o cualquier péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados) y un sustrato de NEP durante un tiempo suficiente para que tenga lugar la endoproteólisis del sustrato de NEP bajo condiciones de velocidad iniciales;

c) cuantificar la actividad de la NEP presente en el material biológico de la etapa a) midiendo los niveles de endoproteólisis del sustrato de NEP, respectivamente, en presencia o en ausencia del compuesto candidato y en presencia o en ausencia de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, o el péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados.

[00182] En dicho procedimiento anterior, una concentración semi-saturante es la concentración de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma según la invención que produce una reducción a la mitad de la degradación del sustrato de NEP.

[00183] Otro objeto comprende un procedimiento para cribar un compuesto que es un antagonista de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma, que comprende las etapas de:

a) preparar un cultivo celular o preparar una muestra de órgano o una muestra de tejido (criosecciones o tiras o preparaciones de membrana u homogeneizados brutos) que contiene sitios de unión a NEP para la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma;

b) incubar el cultivo celular, muestra de órgano o muestra de tejido de la etapa a) a concentraciones que permiten la medición de la actividad enzimática de NEP bajo condiciones de velocidad iniciales en presencia de una concentración inferior a la máxima de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma (o cualquier péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados) y un sustrato de NEP, en presencia del compuesto candidato durante un tiempo suficiente para que tenga lugar la endoproteólisis del sustrato de NEP bajo condiciones de velocidad iniciales;

c) cuantificar la actividad de la NEP presente en el material biológico de la etapa a) midiendo los niveles de endoproteólisis del sustrato de NEP, respectivamente, en presencia o en ausencia del compuesto candidato y en presencia o en ausencia de la proteína BPLP o un producto de maduración de la misma o el péptido que mantiene la especificidad de unión o la actividad fisiológica de la proteína BPLP o de sus productos madurados.

[00184] En una realización preferida de dicho procedimiento anterior, una concentración inferior a la máxima es una concentración de péptido que produce una reducción de al menos el 50 % y preferentemente de al menos el 75 % de la degradación del sustrato.

[00185] Los siguientes ejemplos y figuras ilustran la invención sin limitar su alcance.

LEYENDAS RELATIVAS A LAS FIGURAS:

[00186]

- La Figura 1 muestra el perfil de HPLC de intercambio catiónico representativo del marcador ^3H -YQRFSSR añadido a 2,5 ml de extracto de metanol-ácido salival correspondiente a 2,5 ml de saliva humana. La recuperación del principal pico radiactivo se evaluó al 75 – 84 % (barras punteadas).
- La Figura 2 muestra el perfil de HPLC de intercambio catiónico representativo de un extracto de metanol-ácido salival obtenido a partir de 7 ml de saliva humana. Las fracciones se analizaron para su potencia inhibitoria de la endoproteólisis de la sustancia P para la actividad de ecto-endopeptidasa humana (línea celular LNCaP).
- 10 La Figura 3 es un perfil de HPLC de fase inversa representativo de las principales fracciones 13 – 14 activas de HPLC-EC (barras punteadas). Las fracciones se analizaron para su potencia inhibitoria de la endoproteólisis de la sustancia P por actividad de ecto-endopeptidasa humana (línea celular LNCaP).
- La Figura 4 es un perfil de HPLC de fase inversa representativo de las principales fracciones activas de HPLC-RP. Las fracciones se analizaron para su potencia inhibitoria de la endoproteólisis de la sustancia P por actividad de ecto-endopeptidasa humana (barras negras) y su absorbancia a 274 nm (línea negra).
- 15 La Figura 5 muestra el efecto del péptido de BPLP QRFSSR sobre la degradación de la sustancia P por actividad de ecto-endopeptidasa humana (línea celular LNCaP), la concentración eficaz del péptido QRFSSR osciló de 1 a 25 μM y siendo la media máxima 11 μM .
- La Figura 6 muestra el efecto del derivado de YQRFSSR del péptido hBPLP QRFSSR sobre la degradación de la sustancia P por actividad de ecto-endopeptidasa humana (línea celular LNCaP), la concentración eficaz del péptido YQRFSSR osciló de 5 a 50 μM y siendo la media máxima 30 μM .
- La Figura 7 muestra el efecto del derivado de YQRFSSR del péptido hBPLP QRFSSR sobre la degradación de la sustancia P por actividad de ecto-endopeptidasa de rata (tejido renal), la concentración eficaz del péptido YQRFSSR osciló de 5 a 75 μM y siendo la media máxima 38 μM .
- 25 La Figura 8 es un análisis cromatográfico de RP-HPLC del péptido YQRFSSR. El péptido YQRFSSR (175 μM) no se metabolizó por las endopeptidasas de la superficie celular humana, *in vitro*, mientras que se inhibió en un 70% la endoproteólisis de la sustancia P mediada por la endopeptidasa NEP humana. Las características cromatográficas RP-HPLC revelaron que:
- 1) el péptido YQRFSSR no se metabolizó por las membranas celulares humanas que contenían NEP; el 93% se recuperó como péptido intacto frente al 94% en ausencia de membranas metabolizantes;
 - 2) en las mismas condiciones experimentales, el péptido YQRFSSR inhibe en un 70% la endoproteólisis de la sustancia P por estas membranas celulares humanas.
- La figura 9 muestra el efecto inhibitorio del péptido QRFSSR en la degradación de la sustancia P por NEP humana recombinante. Efecto inhibitorio dependiente de la concentración del péptido QRFSSR en la actividad de NEP humana recombinante soluble y la ausencia de efecto del péptido QRFSSR en la endoproteólisis de sustancia P por la actividad de hDPPIV recombinante soluble.
- La figura 10 muestra el efecto inhibitorio del péptido QRFSSR en la degradación del sustrato sintético APN por APN humana de la superficie celular. Inhibición dependiente de la concentración por el péptido QRFSSR de la escisión del sustrato cromogénico Ala-pNA por HEK-hAPN de la superficie celular.
- 40 La figura 11 muestra el efecto inhibitorio del péptido QRFSSR en la degradación del sustrato sintético NEP por NEP humana de la superficie celular. Inhibición dependiente de la concentración por el péptido QRFSSR de la escisión del sustrato fluorogénico Mca-BK2 por HEK-hNEP de la superficie celular.
- La figura 12 muestra el efecto *in vivo* del péptido YQRFSSR en el tiempo empleado por la rata en lamerse las patas de las patas traseras inyectadas con formalina; Media \pm SEM.
- 45 La figura 13 muestra el efecto *in vivo* del péptido YQRFSSR en el número de espasmos de dolor después de la inyección con formalina de patas traseras; Media \pm SEM.
- La figura 14 muestra el efecto *in vivo* del péptido YQRFSSR en el índice de espasmos de dolor durante los 60 minutos después de la inyección con formalina. La analgesia inducida por el péptido derivado de QRFSSR requiere la activación de receptores opioides endógenos.

EJEMPLOS:

- [00187]** El estudio se diseñó para buscar metalo-ectopeptidasas naturales, especialmente inhibidor de NEP y/o APN, particularmente en las secreciones salivales humanas. La estrategia para la detección y el aislamiento de este producto se basó en el aislamiento de componentes de baja masa molecular salivales que inhiben la endoproteólisis del sustrato sensible a NEP por células humanas que expresan la NEP humana anclada a membrana. Los inventores han desarrollado los modelos de detección funcional (preparaciones de membranas de células humanas LNCaP y HEK que expresan NEP) y de aislamiento molecular (sistemas de cromatografía HPLC) para la identificación por análisis de secuencias del (de los) inhibidor(es) de la ectopeptidasa NEP endógena natural en ser humano, es decir, el (los) homólogo(s) funcional(es) salival(es) endógeno(s) de la sialorfina de rata.

EJEMPLO 1: Preparación de saliva humana

- [00188]** El protocolo de investigación clínica establecido con el “centre de recherche Vaccinale et Biomedicale” del Instituto Pasteur, número de acceso: 2045, recibió el consentimiento del comité CCPPRB (PARIS-COCHIN) y los muestreos de la saliva humana de 10 voluntarios masculinos sanos empezaron el mayo de 2003 y continuaron en

octubre de 2003. La saliva se recogió en tubos "Microsorp" previamente enfriados que contenían la concentración final de aprotinina (1000 kUI/ml), Pefabloc (0,4 mM) y HCl (0,1 N); suponiendo que este medio inhibía las actividades de proteólisis. Por tanto, las muestras de saliva se almacenaron a -80 °C hasta que se realizó el procedimiento de extracción con metanol.

5

EJEMPLO 2: Materiales y modelos experimentales para la inhibición de NEP

1- Fuentes de las ectopeptidasas humanas NEP y APN:

- 10 **[00189]** Se ha descrito que varias líneas celulares humanas expresan NEP, además de otros miembros de la familia de las metaloecto-peptidasas; entre ellas hay una línea celular de osteoblastos, MG-63 (osteosarcoma), una línea celular de trofoblastos, BeWo (coriocarcinoma placentario), una línea de células epiteliales de próstata, LNCaP (adenocarcinoma) y una línea celular de enterocitos, Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal). Primero se desarrollaron las condiciones de cultivo en medio definido útil para los análisis de farmacología celular. En segundo lugar, los inventores confirmaron usando transferencia Northern y análisis inmunocitoquímicos que LNCaP y BeWo fueron las únicas líneas celulares que podían expresar NEP (ARNm y proteína de la superficie celular) en condiciones de cultivo de medio definidas (es decir, RPMI que contiene insulina, transferina y selenio, GIBCO) y después de la inducción por DHT (dihidrotestosterona) y forskolina, respectivamente. Y finalmente, en el modelo experimental de incubaciones estáticas de preparaciones de membrana que se originan a partir de estas células, los inventores han definido los parámetros que permiten analizar la endoproteólisis mediada por NEP humana de la sustancia P en las condiciones de medición de velocidad iniciales, es decir, 100 pM / min / µg de proteínas de la membrana de células LNCaP (actividad específica 10 veces inferior para BeWo). La actividad de membranas de LNCaP se inhibió en presencia de inhibidor de NEP sintético específico, tal como tiorfano (62 % para la potencia inhibidora máxima a 500 nM). A diferencia, la bestatina (25 µM) y el captoprilo (10 µM) que bloquean las actividades de aminopeptidasa (APN, APB) y de enzima convertidora de angiotensina (ACE), respectivamente, no inhibieron la hidrólisis de la sustancia P por ectopeptidasas de la superficie celular; indicando así que en las condiciones experimentales la descomposición celular adicional de la sustancia P se produjo principalmente por la actividad de la endopeptidasa NEP localizada en la superficie de estas células.
- 30 **[00190]** Además, también se ha desarrollado el modelo *in vitro* usando las preparaciones de membrana de células HEK transfectadas con ADNc de NEP humano o APN humano (las células HEK no expresan metaloecto-peptidasa) y la NEP humana recombinante soluble o DPP IV (dipeptidilaminopeptidasa IV) humana recombinante soluble (sin el citosol del extremo N y el segmento transmembrana).

35 **2- Sustratos e inhibidores:**

[00191] *In vitro*, las actividades de amino- y endo-ectopeptidasa de membrana de membranas de células humanas se ensayan *in vitro* midiendo la descomposición de los siguientes sustratos sintéticos y naturales:

40 *a/ Sustratos fluorogénicos específicos sintéticos:*

[00192]

- Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K (Dnp)-OH y/o Suc-A-A-F-Amc (NEP) (R&D Systems y Bachem)
- Ac-A-Amc o Ala-pNA (APN) (Bachem)

45

b/ Sustratos fisiológicos:

[00193]

- 50 - Sustancia P tritiada modificada [(3,4³H)Pro²-Sar⁹-Met(O₂)¹¹]-sustancia P (DuPont-NEN) y sustancia P nativa: R-P-K-P-Q-Q-F-F-G-L-M (NEP-DPPIV-ACE) (Peninsula-Biovalley)
- Met-enkefalina nativa: Y-G-G-F-M (NEP-APN) (Peninsula-Biovalley) Midiendo la hidrólisis de estos sustratos por peptidasas de la membrana celular en presencia y ausencia de diferentes inhibidores de peptidasa sintéticos selectivos disponibles se evaluó la especificidad del ensayo de peptidasa:
- 55 - Tiorfano, fosforamidón (NEP) (Sigma y Roche)
- Bestatina, amastatina (APN) (Calbiochem)
- Inhibidor II de DPPIV (DPPIV) (Calbiochem)
- Captoprilo (ACE) (Sigma)

60 **3- Medición de actividades de peptidasas**

- [00194]** Las actividades de ectopeptidasa se midieron según el protocolo desarrollado y establecido para la caracterización funcional de la sialorfina de rata (Rougeot y col., 2003). Brevemente, para preparaciones de membrana, las células se homogeneizaron a 4 °C en 10 volúmenes (vol./peso) de Tris/HCl 50 mM tamponado a pH 7,1. Una primera centrifugación a 1000 x g y 5 °C durante 5 min permite eliminar los residuos celulares y los núcleos en el sedimento. Una segunda centrifugación a 100.000 x g y 5 °C durante 30 min concentra la fracción de

membrana en el sedimento, que se lavará superficialmente tres veces en tampón Tris/HCl frío, se resuspenderá en tampón fresco, se separará en alícuotas y se guardará a -80 °C mientras que se espera que se use como fuente de enzima. La determinación de proteínas se llevó a cabo usando el ensayo de proteínas Bio-Rad DC con albúmina de suero bovino (BSA) como patrón.

5

[00195] La hidrólisis de sustratos se midió monitorizando la tasa de metabolismo en condiciones de medición de velocidad inicial en presencia y ausencia de inhibidores específicos. Éstos se añadieron al medio de preincubación. La mezcla de reacción patrón consistió en membranas celulares en un volumen final de 200 µl de Tris-HCl 50 mM a pH 6,5 – 7,2. El sustrato se añadió después de la preincubación durante 10 min y la digestión se llevó a cabo durante 20 min a 25 °C en un baño de agua constantemente agitado. La reacción se terminó enfriando a 4 °C y añadiendo HCl (concentración final 0,3 N). Los tubos de reacción se centrifugaron luego (4700 x g durante 15 min a 4 °C) y se midieron el sustrato intacto restante y sus metabolitos.

[00196] En el caso de uso de sustratos naturales, sustancia P o Met-enkefalina, los productos de la reacción se aíslan y se cuantifican según sus características hidrófobas diferenciales:

- Se usaron cartuchos C-18 Sep-Pak (Waters) para analizar la hidrólisis de sustancia P radiomarcada. Los metabolitos de ³H se aislaron por elución con H₂O-0,1 % de TFA y luego con 25 % de metanol-0,1 % de TFA (4 ml cada uno). El sustrato tritiado intacto se eluyó con 75-100 % de metanol-0,1 % de TFA (4 ml).
- Se usó RP-HPLC acoplada a un espectrofotómetro para analizar la hidrólisis de Met-enkefalina (columna C-18 LUNA, AIT). La elución con un gradiente lineal de 30 min de 0,1 % de TFA en agua a 0,1 % de TFA en 100 % de acetonitrilo a 1 ml/min separó los dos metabolitos de Met-enkefalina (YGG: 5,8 ± 0,2; FM: 12,8 ± 0,1 min de tiempo de retención) y el sustrato intacto (YGGFM: 18,8 ± 0,2 min). Sus identidades y cantidades relativas (altura del pico) se comprobaron monitorizando el flujo de salida de la columna a 264 nm (L3000, Merck).
- La desaparición del sustrato de Met-enkefalina inicial también se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA). El ensayo usó antisuero anti-Met-enkefalina (Gros y col., 1978) y ¹²⁵I-Met-enkefalina (80 TBq/mmol, NEN); detectó concentraciones nanomolares de Met-enkefalina en presencia de concentraciones micromolares de los metabolitos Tyr-Gly-Gly y Phe-Met. La radiactividad de cada fracción se determinó por espectrometría de centelleo líquido.

30

[00197] En el caso del uso de sustratos sintéticos, la cinética de aparición de la señal fluorescente (intensidad y polarización) se analizó directamente usando un espectrofluorímetro de múltiples pocillos; la intensidad de la señal es directamente proporcional a la cantidad de metabolitos formados durante la reacción.

35 **EJEMPLO 3: Purificación de saliva humana y cromatógrafo**

[00198] El protocolo de extracción y purificación de los componentes de la saliva humana imitó al que se desarrolló y estableció para la caracterización molecular de la sialorfina de saliva de rata (Rougeot y col., 1994), y los extractos y fracciones cromatográficas se analizaron por su capacidad para inhibir la hidrólisis del sustrato fisiológico, sustancia P, por las membranas de células humanas que contienen NEP.

[00199] Extracción y la purificación de los compuestos salivales humanos posiblemente reguladores de la actividad de encefalinasa. Brevemente, siguiendo la descongelación a + 4 °C, las muestras de saliva se trataron según el siguiente procedimiento:

- **Procedimiento de extracción con metanol-ácido:** Extracción de los componentes de baja masa molecular en metanol-ácido a 4 °C; a 1 volumen de saliva se añadieron 4 volúmenes de metanol que contenía 0,1 % de disolución de ácido trifluoroacético (TFA). La primera etapa realiza la eliminación de proteínas de alto peso molecular (incluyendo las enzimas de degradación), que se inactivan y precipitan en medio de ácido y metanol, respectivamente, y permite la solubilización de los constituyentes salivales de pequeño peso molecular (≤ 10 kDa). La mezcla de metanol se agitó rápidamente con vórtex y se centrifugó durante 15 min a + 4 °C y 12000 g; el metanol se eliminó del sobrenadante después de la liofilización a -110 °C.
- **Cromatografía de intercambio catiónica HPLC (HPLC-EC):** La saliva extraída con metanol se solubilizó en el disolvente A, es decir, acetato de amonio 10 mM a pH 4,3, y se inyectó en una columna de carboximetilo HEMA-IEC BIO-1000 (Alltech). Los componentes se eluyeron y se aislaron según su característica catiónica en un gradiente lineal de dos etapas de acetato de amonio 10 – 500 mM y 500 – 900 mM a pH 4,7, respectivamente, y a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las fracciones de 2 ml se recogieron y se probaron después de la liofilización para su potencia inhibidora de la actividad de ectopeptidasa humana (LNCaP).

[0200] La calidad y recuperación de la extracción y sucesivas cromatografías se estimaron usando un patrón interno (el péptido tritiado: ³H-YQRFSSR) añadido a una muestra salival representativa, como se ilustra en la Figura 1; la recuperación del marcador añadido a la muestra extraída correspondiente a 2,5 ml de saliva humana se evaluó al 75 – 84 %. La cromatografía de intercambio catiónico HPLC de saliva extraída con metanol (Figura 2; perfil representativo de un extracto salival correspondiente a 7 ml de saliva humana) reveló claramente la presencia de dos componentes salivales moleculares principales, que se eluyeron dentro del perfil de gradiente de acetato de amonio de la primera etapa (10 – 500 mM) a tiempos de retención de 26 – 28 y 36 – 38 min, respectivamente, y que inhibió ≥ 90 % de la endoproteólisis de la sustancia P por peptidasas unidas a la membrana humana (los 2 picos

65

activos visualizados en la Figura 2 con los tiempos de retención de 6 y 48 min se corresponden con la exclusión y el volumen total de la columna, respectivamente).

5 - Cromatografías en fase inversa HPLC (RP-HPLC). Las fracciones activas de la HPLC-EC previa se solubilizaron en el disolvente A [0,1 % de TFA en H₂O] y se inyectaron en una columna Synergi Max-RP (Phenomenex). Los componentes de muestra se eluyeron (1 ml/min) con un gradiente lineal de 1 – 99 % de disolvente B [acetoneitrilo-TFA, 100 – 0,1, por vol.]. Las fracciones de 1 ml se recogieron y se analizaron después de la liofilización para su potencia inhibidora hacia la actividad de ectopeptidasa humana de la superficie celular (LNCaP). La recuperación del marcador interno se evaluó al 61 %. El fraccionamiento por RP-HPLC (Figura 3) de las formas moleculares activas aisladas de las fracciones 13 – 14 (26 – 28 min de tiempo de retención) de la HPLC-EC previa mostró la presencia de dos poblaciones moleculares principales que inhibían la actividad de endopeptidasa humana, y que se eluyeron dentro del perfil de gradiente de acetoneitrilo a tiempos de retención de 23 – 25 y 28 – 30 min, respectivamente.

15 **[0201]** Estas fracciones se sometieron a otro procedimiento de purificación en una nueva columna Synergi Max-RP-HPLC mediante elución con un gradiente lineal de 1 – 99 % de disolvente B [100 % de metanol-0,1 % de TFA]. Los eluatos de la columna se recogieron en tubos Microsorb a intervalos de 1 min y las fracciones se probaron después de la liofilización para su actividad inhibidora de NEP. Como se muestra en la Figura 4, así se aislaron dos formas moleculares principales, que inhibieron la endoproteólisis de sustancia P por ectopeptidasas humanas, con tiempos de retención de 20 – 21 y 29 – 30 min, respectivamente, y se determinaron sus secuencias de aminoácidos.

25 - Chip de proteínas CIPHERGEN y análisis de secuencias de aminoácidos. El análisis de secuencias del extremo N se realizó por degradación de Edman automatizada usando secuenciadores de péptidos de Applied Biosystems (plate-forme d'Analyse et de Microséquençage des Protéines, Institut Pasteur). La forma molecular que eluyó de la última RP-HPLC a 18 min de tiempo de retención (fracción 20) se correspondió con 690 y 769,5 Da de masa molecular y con la siguiente secuencia de cinco residuos de aminoácidos: QRFSR. La que eluyó a 26 min de tiempo de retención (fracción 28) se correspondió con dos componentes moleculares de 622-666 Da y 6495 Da, respectivamente; la determinación de aminoácidos de la mayor masa molecular indicó que se corresponde con una secuencia de polipéptidos rica en prolina básica salival, la PRP-E humana de la secuencia de 61 aminoácidos (Isemura y col., 1982).

35 **[0202]** Por analogía con la sialorfina salival de rata, estos datos proporcionan pruebas directas de la existencia de pentapéptido QRFSR similar a la sialorfina salival humana un de estructura y función estrechamente relacionada con aquellas del pentapéptido QHNPR de rata y que es secretada en las secreciones salivales humanas; soportan que QRFSR es el producto maduro proteolíticamente procesado de una proteína precursora de un modo similar a la ruta de maduración de SMR1 y precursores de hormonas peptídicas. Además, como para el péptido QHNPR de rata, el péptido QRFSR secretado parece acumularse en las secreciones salivales humanas bajo diferentes formas, entre las cuales las formas libres que incluyen probablemente una forma de sal de acetato y las formas complejas que implican altas interacciones hidrófobas con PRP-E salival.

40 **EJEMPLO 4: Síntesis y prueba del péptido QRFSR**

45 **[0203]** El péptido QRFSR se sintetizó y se analizó por su capacidad para inhibir la degradación del sustrato de NEP fisiológico, la sustancia P, *in vitro*, en el modelo experimental de incubación estática de membranas de células LNCaP humanas. El péptido QRFSR inhibió la endoproteólisis extracelular de la sustancia P mediada por NEP humana expresada en la superficie de células epiteliales de próstata humana. La concentración eficaz para QRFSR osciló de 1 a 25 µM, y siendo la media máxima (Cl₅₀) 11 µM (Figura 5). Sorprendentemente, pero de forma redundante con respecto a lo que se observó con sialorfina de rata hacia la NEP humana, la eficiencia inhibidora del péptido humano QRFSR hacia la actividad de NEP renal de rata es al menos 10 veces inferior a la obtenida hacia la NEP de la superficie celular humana (LNCaP). Sorprendentemente, el péptido derivado YQRFSR, que ha sido sintetizado por marcado con tritio y conjugación inmunogénica para el desarrollo de anticuerpo y sistema de detección de inmunoensayo, pareció que presentaba una eficacia inhibidora relativamente similar hacia actividades de ecto-endopeptidasa tanto humana como de rata (Figuras 6 y 7).

55 Tabla: Potencia inhibidora de péptidos humanos y de rata naturales y derivados hacia actividades de ecto-endopeptidasa tanto humana como de rata:

Ectoendopeptidasa de	Células humanas	Tejidos de rata
QHNPR	4 a 40 µM	0,4 a 4 µM
QHNP	indeterminado	≥ 50 µM
QRFSR	2,5 a 25 µM	≥ 100 µM
YQRFSR	5 a 50 µM	5-75 µM
QRGPR	≥ 90 µM	indeterminado
QRGPRGP	≥ 90 µM	indeterminado

[00204] Además, el péptido QRGPR (20 - 90 μM) que posiblemente podría madurarse a partir de productos génicos de *hPB* no tuvo efecto sobre la endoproteólisis de la sustancia P inducida por membranas de células humanas LNCaP; este resultado permite que los inventores propongan que la naturaleza de los tres aminoácidos centrales del pentapéptido inhibidor de NEP natural (extremo N de Q y extremo C de R común) está determinando la firma para la afinidad y/o especificidad de su interacción funcional con la ectoendopeptidasa NEP. Además, a pesar de la fuerte analogía de secuencias de aminoácidos primarias entre la NEP de rata y humana (aproximadamente 85 %), los inventores observaron una especificidad relativa en la interacción funcional de ambos pentapéptidos de inhibidor natural, respectivamente, QHNPR de rata y QRFSR humano. Todos estos resultados proporcionan pruebas de la existencia de una especificidad conformacional en la secundaria y terciaria de ambas ectoenzimas; la determinación de la estructura cristalina del complejo binario formado con la sialorfina o sus derivados y la NEP humana debe permitir llegar a comprender bien el modo de unión de estos inhibidores competitivos naturales.

[00205] Los inventores usaron el péptido tritiado ^3H -YQRFSR para establecer los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de este peptidomimético funcional humano de sialorfina de rata *in vivo* en rata macho adulta (biodistribución-biodisponibilidad-eliminación), además de para definir su mecanismo de metabolismo y reposición *in vivo* e *in vitro* (Figura 8). Las características cromatográficas de RP-HPLC revelaron que:

- el péptido YQRFSR no es metabolizado por membranas de células humanas que contienen NEP, de hecho el 93 % se recuperó como péptido intacto contra el 94 % en ausencia de membranas metabolizantes,
- en las mismas condiciones experimentales, el péptido YQRFSR inhibe el 70 % de la endoproteólisis de la sustancia P por estas membranas de células humanas.

[00206] Por tanto, YQRFSR es útil para investigar la actividad analgésica de los productos de maduración de BPLP en los dos modelos de rata de comportamiento de dolor agudo, es decir, la prueba de dolor por alfiler y la prueba con formalina, que se han estudiado para la caracterización funcional de la sialorfina *in vivo* (Rougeot y col., 2003).

EJEMPLO 5: Caracterización adicional de los péptidos QRFSR *in vitro*

[00207] La especificidad inhibidora del péptido QRFSR se evaluó midiendo la endoproteólisis de la sustancia P (SP) en un ensayo de enzimas *in vitro* usando NEP humana y DPPIV humana soluble purificada (sin el segmento del citosol transmembrana N-terminal). Usando el ensayo de hNEP recombinante selectiva, se estableció la interacción molecular del péptido QRFSR humano con hNEP, proporcionando una evidencia directa de que el péptido inhibía la actividad de hNEP: tal como se muestra en la figura 9, el péptido QRFSR evitó la endoproteólisis mediada por NEP de SP en un 90%; su potencia inhibidora era estrictamente dependiente de la concentración ($r^2 = 0,99$, $n = 18$), variaba de 5 a 50 μM y era la mitad del máximo a $29 \pm 1 \mu\text{M}$. En cambio, la descomposición de SP por hDPPIV recombinante no se evitó mediante el péptido QRFSR 25 ó 50 μM , lo que indica que la potencia inhibidora del péptido QRFSR en las ectoenzimas de la superficie celular que catabolizan SP *in vitro* es simplemente debida a su interacción específica con ectopeptidasa NEP. Además, a partir de los estudios de seguimiento del metabolismo *in vivo* de SP, parece probable que el péptido QRFSR, como la sialorfina QHNPR de rata, no protege totalmente la SP endógena de la escisión por las ectopeptidasas espinales que inactivan la SP, y por lo tanto no potenciaría la nocicepción mediante por SP *in vivo*.

[00208] Las encefalinas son inactivadas *in vivo* con notable eficacia (en pocos segundos) por ambas ectopeptidasas, NEP y APN. Debido a la función complementaria de NEP y APN en la inactivación de encefalinas, sólo los inhibidores sintéticos mixtos NEP-APN inducen respuestas antinociceptivas en varios modelos de dolor.

[00209] Por lo tanto, la especificidad inhibidora del péptido QRFSR se evaluó en una ensayo de enzimas usando preparaciones de membrana de células humanas HEK recombinantes que expresan selectivamente NEP o APN ancladas a la membrana humana. Estos modelos de células transfectadas se desarrollaron en el laboratorio. Las actividades de aminoctopeptidasa y endoectopeptidasa de membrana de las membranas celulares humanas se ensayaron *in vitro* mediante la medición de la ruptura de sustratos fluorogénicos específicos artificiales, el sustrato de NEP usado fue: Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K-(Dnp)-OH (Mca-BK2) y el sustrato de APN fue: Ala-pNA. Usando el ensayo selectivo de hNEP anclada a la membrana, los inventores encontraron que la inhibición por el péptido QRFSR de la endoproteólisis de Mca-BK2 por NEP es dependiente de la concentración ($r^2 = 0,88$, $n = 29$ puntos de determinación) y las dosis eficaces oscilaban de 5 a 50 μM . Usando el ensayo selectivo de hAPN anclada a la membrana, los inventores han demostrado que el péptido QRFSR inhibe la escisión de Ala-pNA por hAPN a dosis eficaces de 10 a 90 μM ($r^2 = 0,93$, $n = 22$ puntos de determinación) (véanse las figuras 10 y 11).

Tabla 1: Resumen de los efectos inhibidores (IC_{50}) en las actividades de las ectoenzimas NEP y APN, *in vitro* y *ex vivo*:

Fuentes de enzimas	Sustrato	Valores de IC_{50} de péptido QRFSR
HEK-hNEP	Sustancia P (60 nM)	14 μM
	McaBK2 (5 μM)	$33 \pm 6 \mu\text{M}$
LNCaP	Sustancia P	$11 \pm 3 \mu\text{M}$

	McaBK2	25 ± 1 µM
hNEP soluble	Sustancia P	29 ± 1 µM
HEK-hAPN	Ala-pNA (100 µM)	65 ± 9 µM

[00210] Estos resultados indican que el pentapéptido QRFSR humano es un inhibidor dual eficaz de las actividades de las ectopeptidasas NEP y APN, *in vitro*. Además, debido a la función complementaria de la NEP y APN en la inactivación de encefalinas y por analogía con la sialorfina de rata que ejerce una potente actividad analgésica, la información biológica y genómica combinada acumulada llevó a los inventores a proponer que el péptido QRFSR, mediante la inhibición de las ectopeptidasas NEP-APN que inactivan las encefalinas, potencia mecanismos antinociceptivos dependientes de encefalinas, *in vivo*.

EJEMPLO 6: Caracterización funcional del péptido QRFSR *in vivo*

10

[00211] A pesar de la fuerte analogía de la secuencia de aminoácidos primaria entre la NEP de rata y humana (≠ 85%), los inventores observaron una selectividad relativa a la especie en la potencia inhibidora de ambos pentapéptidos inhibidores, respectivamente el QHNPR de rata y el QRFSR humano. Sorprendentemente, el péptido derivado YQRFSR, que se sintetizó para el marcaje con tritio, parecía mostrar una eficacia inhibidora relativamente similar para ambas ectoendopeptidasas humana y de rata (intervalo de concentraciones eficaces entre 5 y 50 µM). Por lo tanto, se investigó la potencia antinociceptiva del péptido derivado de QRFSR en el modelo de comportamiento de rata del dolor agudo, es decir, la prueba de la formalina, que se utilizó para la caracterización *in vivo* de la acción de la sialorfina de rata (Rougeot et al., 2003). La administración sistémica de 0,5 y 1 mg/kg de péptido YQRFSR inhibía la fase temprana (primeros 20 min después de la inyección de formalina) del lamido de pata de las patas traseras inyectadas con formalina. Por ejemplo, se redujo significativamente el tiempo empleado por las ratas tratadas en el lamido de la pata de 144 ± 17 s, n = 8 (vehículo) a 97 ± 14 s, n = 8 (0,5 mg/kg) (p = 0,05) y a 84 ± 13 s, n = 8 (1 mg/kg) (p = 0,02 mediante el test t de Dunnett). Sorprendentemente, a diferencia de ratas tratadas con sialorfina de rata, las ratas tratadas con péptido YQRFSR emplearon significativamente menos tiempo en el lamido de la pata durante la fase tardía (40 a 60 min después de la inyección de formalina) de la prueba de la formalina (ratas tratadas con vehículo: 63 ± 13 s vs. ratas tratadas con 1 mg/kg: 9 ± 3 s, p = 0,001). Aunque es menos potente que la sialorfina de rata, en términos de dosis efectivas (100-200 µg/kg, *iv*), el péptido derivado de QRFSR parece ser tan eficiente en su potencia supresora del dolor (1 mg/kg, *iv*), como el inhibidor RB101 de NEP-APN mixto sintético (2,5-5 mg/kg, *iv*) en el modelo de dolor inducido por formalina.

[00212] Estos datos (tal como se presentan en las Figuras 12, 13 y 14) indican claramente que el péptido YQRFSR inhibe la nocicepción inducida por estímulos químicos agudos y de acción prolongada.

[00213] Su potencia analgésica es casi tan eficiente como 3 mg/kg dosis de morfina.

[00214] Además, la analgesia inducida por el péptido derivado de QRFSR en el comportamiento de dolor provocado químicamente es totalmente invertida en presencia de un antagonista de receptores opioides, la naloxona, que es consistente con una implicación de los mecanismos opioidérgicos endógenos en su efecto analgésico.

REFERENCIAS

40

[00215]

Beaumont y col., (1996) zinc metallopeptidasas in health and disease, 105 – 129).

Dickinson, D. P., Thiesse, M., 1996. cDNA cloning of an abundant human lacrimal gland mRNA encoding a novel tear protein. *Curr Eye Res.* 15(4), 377 – 386.

45 Gante y col., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 1699 (1994)

Gomeni R. y col., Computer-assisted drug development; an emerging technology for designing first-time-in-man and proof-of-concept studies from preclinical experiments. *Eur. J. of Pharmaceutical Sciences* (2001) 261 – 270

Horwell y col., *Bioorg. Med. Chem.* 4: 1573 (1996)

50 Isemura, S., Saitoh, E., 1997. Nucleotide sequence of gene PBI encoding a protein homologous to salivary proline-rich protein P-B. *J Biochem (Tokyo)*. 121(6), 1025 – 1030.

Isemura, S., 2000. Nucleotide sequence of gene PBII encoding salivary proline-rich protein P-B. *J Biochem (Tokyo)*. 127(3), 393 – 398.

55 Isemura, S., Saitoh, E., Sanada, K., 1982. Fractionation and characterization of basic proline-rich peptides of human parotid saliva and the amino acid sequence of proline-rich peptide P-E. *J Biochem (Tokyo)*. 91(6), 2067 – 2075.

Jones E. y col., Drug discovery technology. Start-up shourcase and structure-based drug design. *Drugs*, Sept. 2002 ; 5(9): 894 – 895

60 Kan, impact of recombinant DNA technology and protein engineering on structure-based drug design: case studies of HIV-1 and HCMY proteases (2002).

Kenny y col., (1977) Proteinases in mammalian cells and tissues

Kenny y col., (1987) Mammalian ectoenzymes

- Leissring y col., (2003) Enhanced Proteolysis of β -amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death, *Neuron.*, 40, 1087 – 1093
- Liskamp y col., *Recl. Trav. Chim. Pays- Bas* 1: 113 (1994)
- 5 Marini, M., Roda, L. G., 2000. Enkephalin-degrading enzymes and their inhibitors in human saliva. *Peptides*. 21(1), 125 – 135.
- Newell y col., (2003) Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid β levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid, *Neuroscience letters* 350, 178 – 180
- Oefner C. y col. Structure of human Neutral Endopeptidase (Neprilysin) complexed with Phosphonomidon, *J. Mol. Biol.* (2000), 296, 341 – 349
- 10 Potempa J. and Travis. J., Proteinases as virulence factors in bacterial diseases and as potential targets for therapeutic interaction with proteinase inhibitors. In *proteases as targets for therapy*. 99, 159 – 188, Eds K. Helm, B.D. Korant and J.C. Cheronis - Springer Handbook Exp. Pharm. 140.
- Roques y col. (1993) *Pharmacological Reviews* 45, 87 – 146
- 15 Rosinski-Chupin, I., Tronik, D., Rougeon, F., 1988. High level of accumulation of a mRNA coding for a precursor-like protein in the submaxillary gland of male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(22), 8553 – 8557.
- Rougeot, C., Messaoudi, M., Hermitte, V., Rigault, A. G., Blisnick, T., Dugave, C., Desor, D., Rougeon, F., 2003. Sialorphan, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(14), 8549 – 8554.
- 20 Rougeot, C., Rosinski-Chupin, I., Njamkepo, E., Rougeon, F., 1994. Selective processing of submandibular rat 1 protein at dibasic cleavage sites. Salivary and bloodstream secretion products. *Eur J Biochem*. 219(3), 765 – 773.
- Rougeot, C., Vienet, R., Cardona, A., Le Doledec, L., Grognet, J. M., Rougeon, F., 1997. Targets for SMR1-pentapeptide suggest a link between the circulating peptide and mineral transport. *Am J Physiol*. 273(4 Pt 2), R1309 – 1320.
- 25 Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Seebach y col., *Helv. Chim. Acta* 79: 913 (1996)
- Seidah y col., (1995) the mammalian family of subtilisin / Kexin-like, Pro-protein Convertases. *Intramolecular chaperones and Protein folding*; 9, 181 – 203
- 30 Turner y col. (2001) *Bioessays*, 23, 261 – 9

LISTA DE SECUENCIAS

[00216]

- 35 < 110 > Instituto Pasteur
- < 120 > Péptidos derivados de la proteína BPLP humana
- 40 < 130 > BET04P1189
- < 140 >
- < 141 >
- < 160 > 4
- 45 < 170 > PatentIn Ver. 2.1
- < 210 > 1
- < 211 > 947
- 50 < 212 > ADN
- < 213 > Homo sapiens
- < 220 >
- < 221 > CDS
- 55 < 222 > (81) .. (686)
- < 400 > 1

ES 2 685 268 T3

aattgagtat ctggcaagag taagattaag cagtaatttg ttccaaagaa gaatcttcta 60
ccaaggagca actttaaga atg aaa tta act ttc ttc ttg ggc ctg ttg gct 113
Met Lys Leu Thr Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ala
1 5 10
ctt att tca tgt ttc aca ccc agt gag agt caa aga ttc tcc aga aga 161
Leu Ile Ser Cys Phe Thr Pro Ser Glu Ser Gln Arg Phe Ser Arg Arg
15 20 25
cca tat cta cct ggc cag ctg cca cca cct cca ctc tac agg cca aga 209
Pro Tyr Leu Pro Gly Gln Leu Pro Pro Pro Pro Leu Tyr Arg Pro Arg
30 35 40
tgg gtt cca cca agt ccc cca cct ccc tat gac tca aga ctt aat tca 257
Trp Val Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Tyr Asp Ser Arg Leu Asn Ser
45 50 55
cca ctt tct ctt ccc ttt gtc cca ggg cga gtt cca cca tct tct ttc 305
Pro Leu Ser Leu Pro Phe Val Pro Gly Arg Val Pro Pro Ser Ser Phe
60 65 70 75
tct cga ttt agc caa gca gtc att cta tct caa ctc ttt cca ttg gaa 353
Ser Arg Phe Ser Gln Ala Val Ile Leu Ser Gln Leu Phe Pro Leu Glu
80 85 90
tct att aga caa cct cga ctc ttt ccg ggt tat cca aac cta cat ttc 401
Ser Ile Arg Gln Pro Arg Leu Phe Pro Gly Tyr Pro Asn Leu His Phe
95 100 105
cca cta aga cct tac tat gta gga cct att agg ata tta aaa ccc cca 449
Pro Leu Arg Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Ile Arg Ile Leu Lys Pro Pro
110 115 120
ttt cct cct att cct ttt ttt ctt gct att tac ctt cct atc tct aac 497
Phe Pro Pro Ile Pro Phe Phe Leu Ala Ile Tyr Leu Pro Ile Ser Asn
125 130 135
cct gag ccc caa ata aac atc acc acc gca gat aca aca atc acc aca 545
Pro Glu Pro Gln Ile Asn Ile Thr Thr Ala Asp Thr Thr Ile Thr Thr
140 145 150 155
aat ccc ccc acc act gca aca gca acc acc agg cac ttc cac aaa acc 593
Asn Pro Pro Thr Thr Ala Thr Ala Thr Thr Arg His Phe His Lys Thr
160 165 170
cac aat gac gat cag ctc ctc aac agt acc tat ctc ttc aac acc aga 641
His Asn Asp Asp Gln Leu Leu Asn Ser Thr Tyr Leu Phe Asn Thr Arg
175 180 185
gcc tgc cac ctc cat atc agc agc aac ccc cgc agc atc tac tga 686
Ala Cys His Leu His Ile Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ile Tyr
190 195 200
aaatactact caaattctcg ccaaccgtcc tcacacagta ttgctcaatg ccactgtcca 746
agttacgact tccaacaaaa ctatattaag cagcccagcc tttaaaagtt tttggcaaaa 806
actctttgcc atttttggtt gaacatgcaa taaatgatat tttccaaact gctctgatat 866
cttagaagaa ataaactgca atgattttga tggaaaccaac cctgatctaa ccagcacact 926
aaataaagta tttgagcaat a 947

- 5
< 210 > 2
< 211 > 201
< 212 > PRT
< 213 > Homo sapiens

ES 2 685 268 T3

< 400 > 2

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

Asn Ile Thr Thr Ala Asp Thr Thr Ile Thr Thr Asn Pro Pro Thr Thr
 145 150 155 160
 Ala Thr Ala Thr Thr Arg His Phe His Lys Thr His Asn Asp Asp Gln
 165 170 175
 Leu Leu Asn Ser Thr Tyr Leu Phe Asn Thr Arg Ala Cys His Leu His
 180 185 190
 Ile Ser Ser Asn Pro Arg Ser Ile Tyr
 195 200

5

< 210 > 3
 < 211 > 5
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens

10

< 400 > 3

Gln Arg Phe Ser Arg
 1 5

15

< 210 > 4
 < 211 > 6
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens

20

< 400 > 4

Tyr Gln Arg Phe Ser Arg
 1 5

25

< 210 > 5
 < 211 > 6
 < 212 > PRT
 < 213 > Homo sapiens

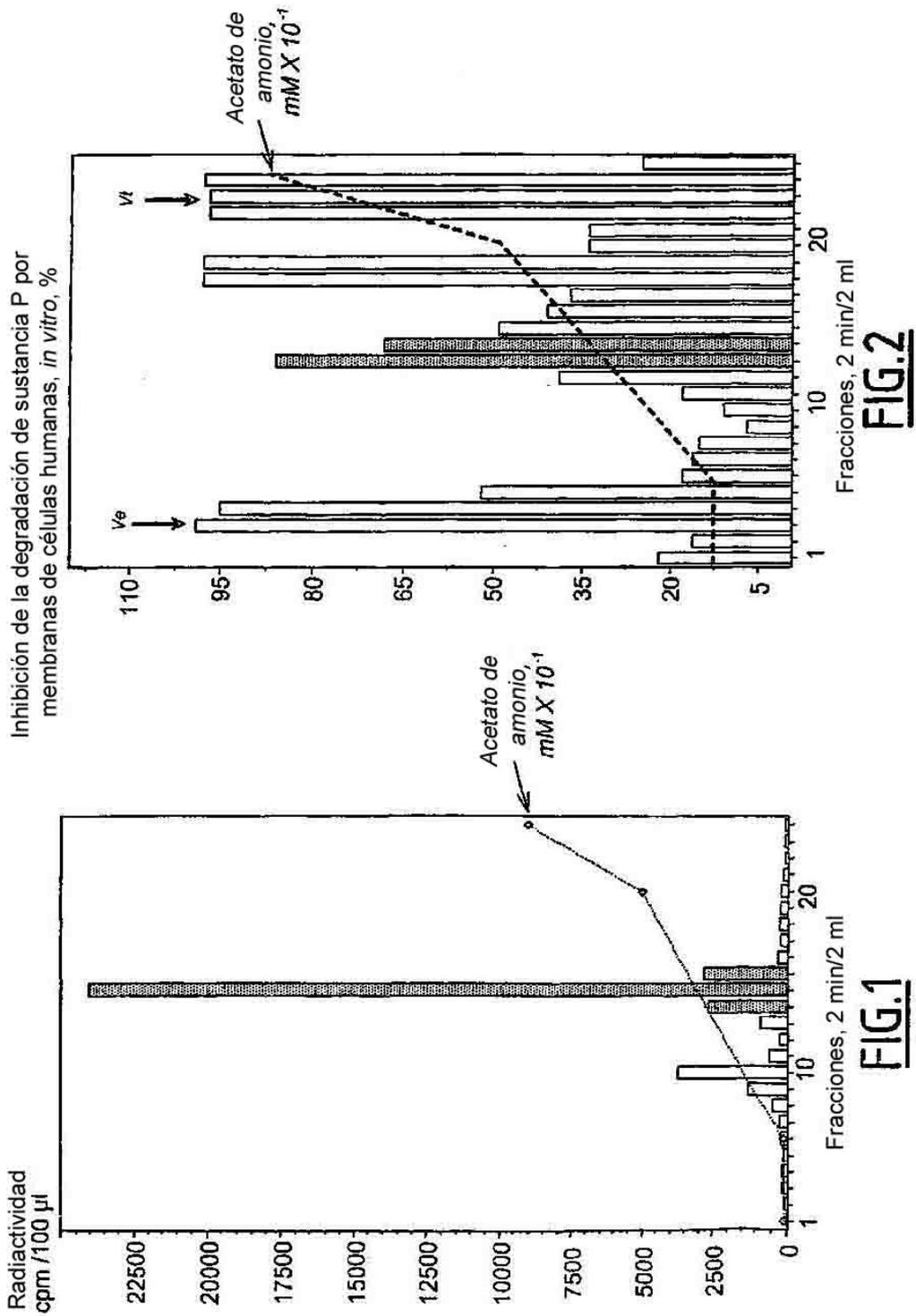
< 400 > 5

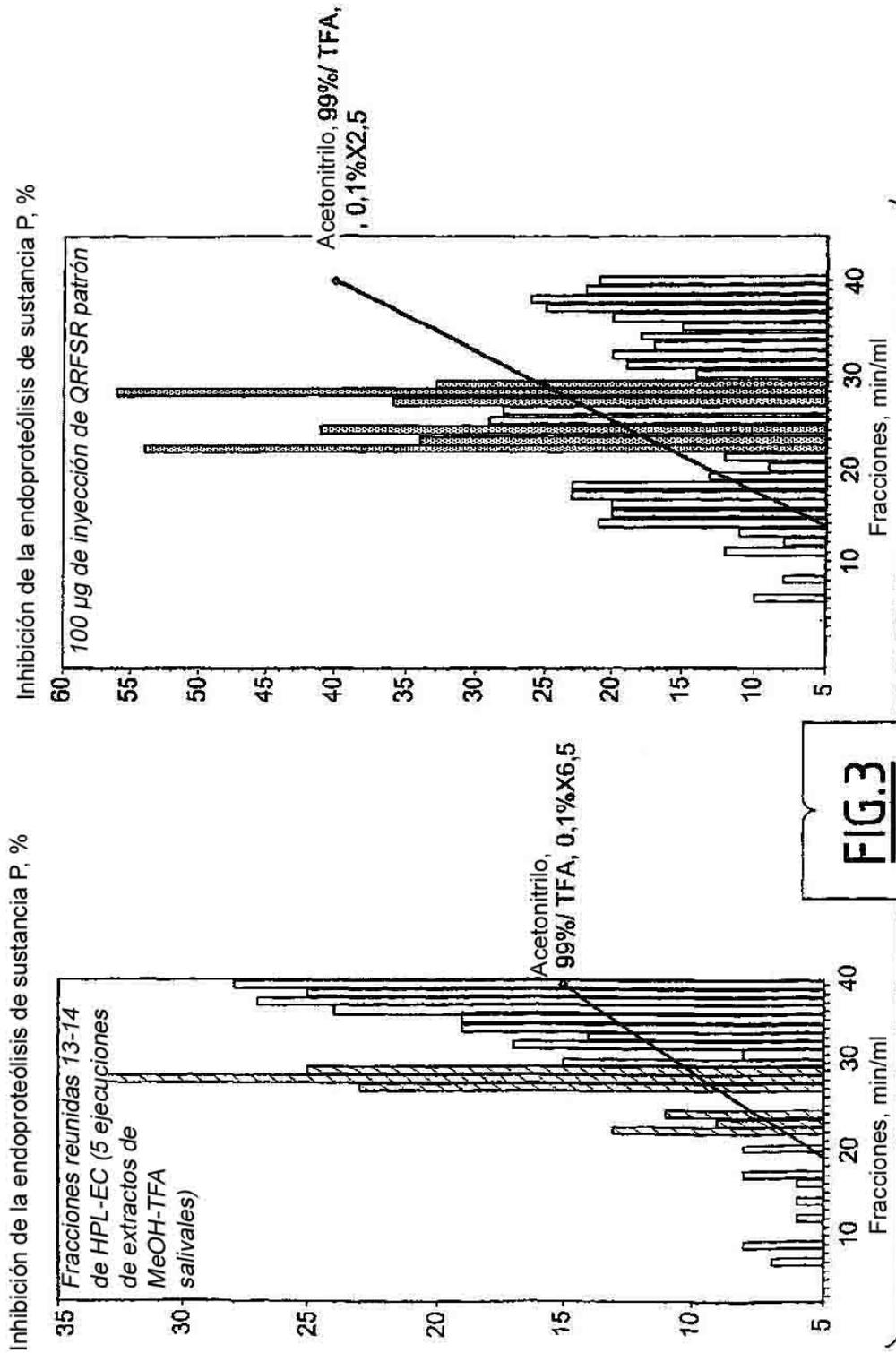
ES 2 685 268 T3

Cys Gln Arg Phe Ser Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Mimético de un péptido que es un producto de maduración de la proteína lacrimonal rica en prolina básica (BPLP) o de un derivado peptídico de dicho producto de maduración, en el que:
- 5 (i) el péptido o derivado peptídico presenta una propiedad inhibidora contra una metaloectopeptidasa;
- (ii) el péptido o derivado peptídico tiene, como máximo, 15 aminoácidos de longitud;
- (iii) el péptido comprende la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, en la que:
- X1 representa un átomo de H,
- X2 representa Gln o Glp,
- 10 en el que dicha secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg es la parte del extremo C de dicho péptido; y
- (iv) el derivado peptídico deriva de dicho péptido mediante una a dos sustituciones de aminoácidos;
- y en el que el mimético retiene la especificidad de unión y/o la actividad fisiológica de dicho péptido o derivado peptídico;
- en el que la proteína BPLP consiste en la SEQ ID NO: 2;
- 15 en el que un producto de maduración de BPLP es un péptido obtenido a través de la escisión de la proteína BPLP por maturasas naturales o enzimas conversoras de prohormona, o enzimas que escinden aminoácidos básicos solos o emparejados relacionados, y en el que dicho mimético se obtiene (i) por sustitución de uno o más enlaces amida por un enlace no amida, (ii) por sustitución de una o más cadenas laterales de aminoácidos por un grupo químico diferente, (iii) protegiendo uno o más del extremo N, el extremo C o una o más cadenas laterales con un grupo
- 20 protector, (iv) introduciendo dobles enlaces y/o ciclación y/o estereoespecificidad en la cadena de aminoácidos para aumentar la rigidez y/o afinidad de unión, (v) por medio del desarrollo de diseños de fármacos asistidos por ordenador, (vi) protegiendo los grupos hidrófilos NH₂ y COOH por esterificación (COOH) con alcoholes lipófilos o por amidación (COOH) y/o por acetilación o adición de cadena hidrófoba de carboxilalquilo o aromática en el extremo NH₂, (vii) por retroinversión isomérica de los enlaces amida CO-NH o metilación de las funciones amida, o (viii) por
- 25 sustitución de L-aminoácidos por D-aminoácidos, o (ix) por sustitución isostérica.
2. Mimético, según la reivindicación 1, en el que dicha metaloectopeptidasa es NEP y/o APN.
3. Mimético, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho péptido o derivado peptídico comprende la secuencia X1-
- 30 X2-Arg-Phe-Ser-Arg, en la que
- X1 representa un átomo de H o un aminoácido Tyr o un aminoácido Cys,
- X2 representa Gln o Glp cuando X1 es H, o X2 representa Gln cuando X1 es Tyr o Cys,
- en el que dicha secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg es la parte del extremo C de dicho péptido.
- 35 4. Mimético, según la reivindicación 3, en el que dicho péptido o derivado peptídico consiste en la secuencia X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg.
5. Mimético, según la reivindicación 1, en el que dicho péptido o derivado peptídico comprende la secuencia QRFSR, YQRFSR, CQRFSR o Glp-RFSR.
- 40 6. Mimético, según la reivindicación 5, en el que dicho péptido consiste en la secuencia QRFSR.
7. Mimético, según la reivindicación 5, en el que dicho péptido consiste en la secuencia YQRFSR.
- 45 8. Mimético, según la reivindicación 5, en el que dicho péptido consiste en la secuencia CQRFSR.
9. Mimético, según la reivindicación 5, en el que dicho péptido consiste en la secuencia Glp-RFSR.





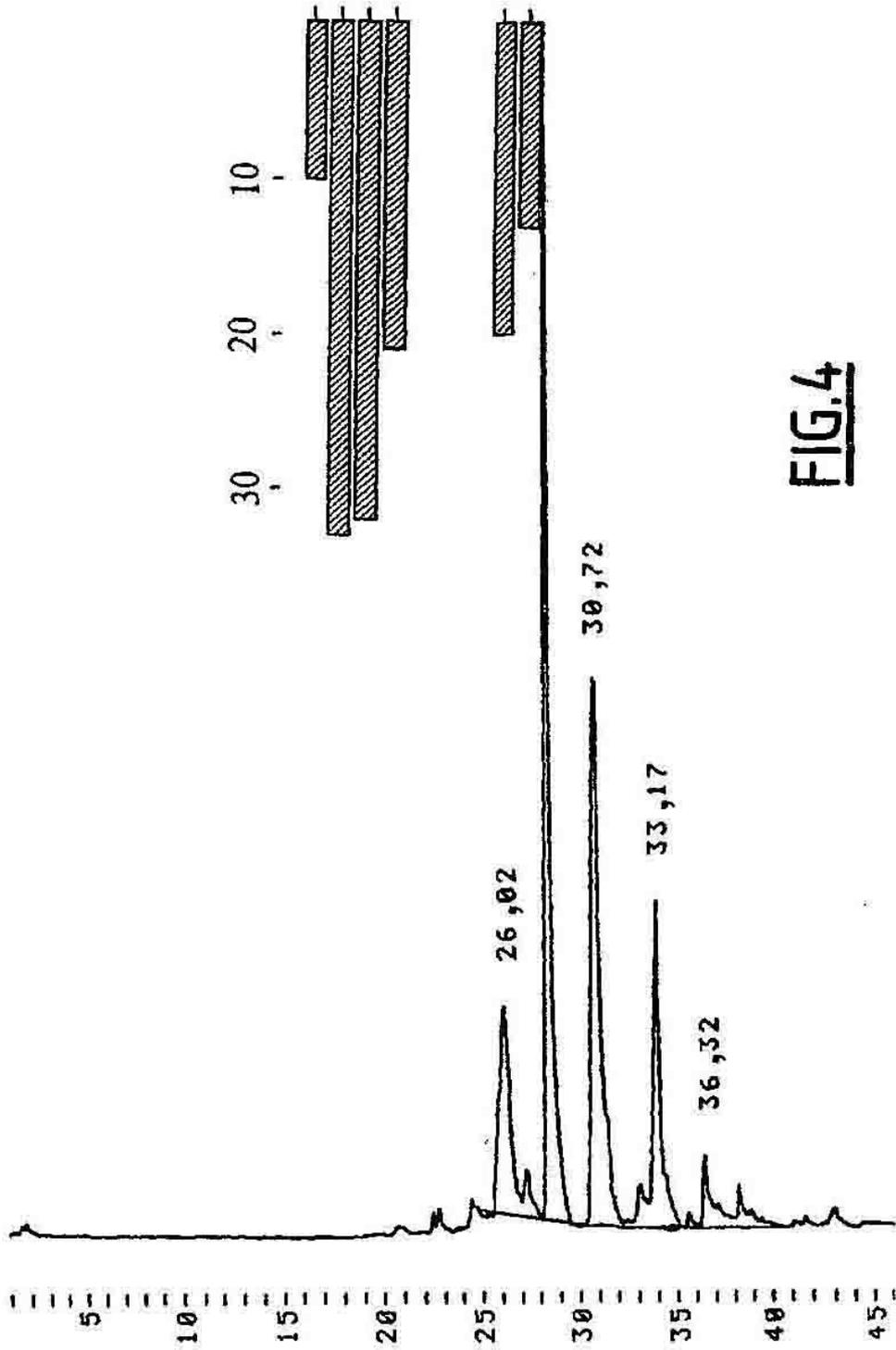


FIG.4

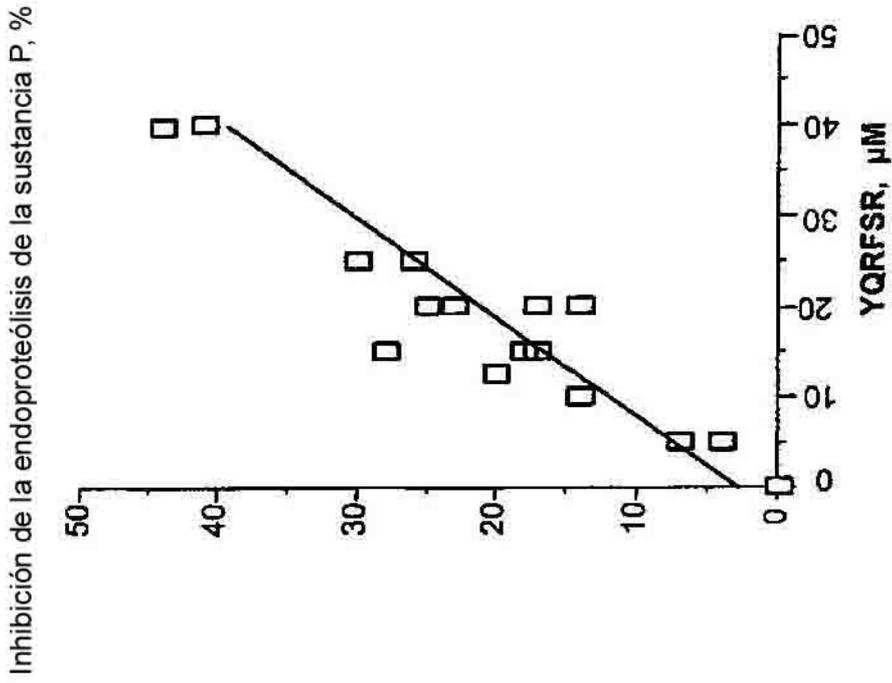


FIG.6

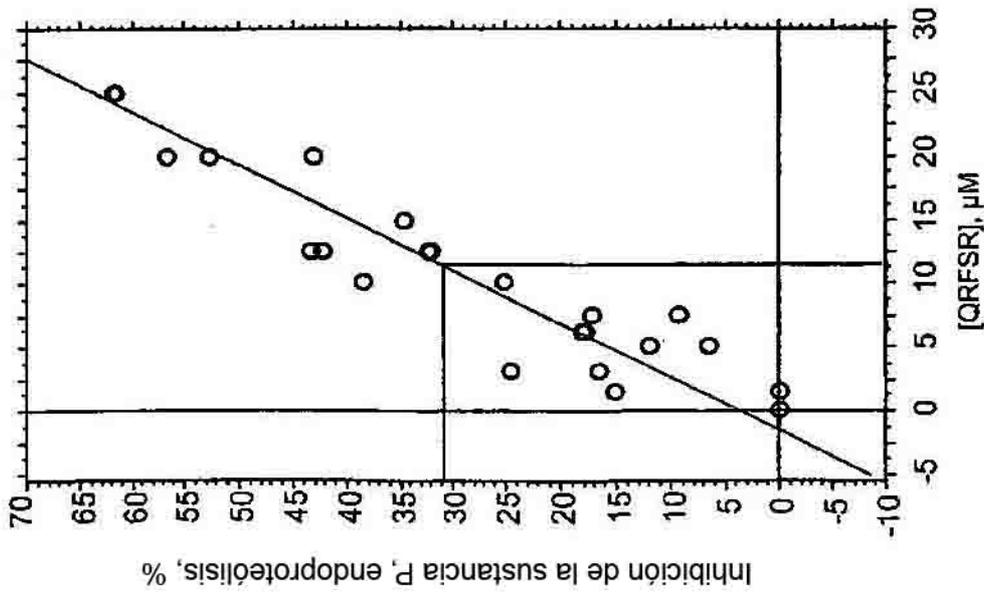
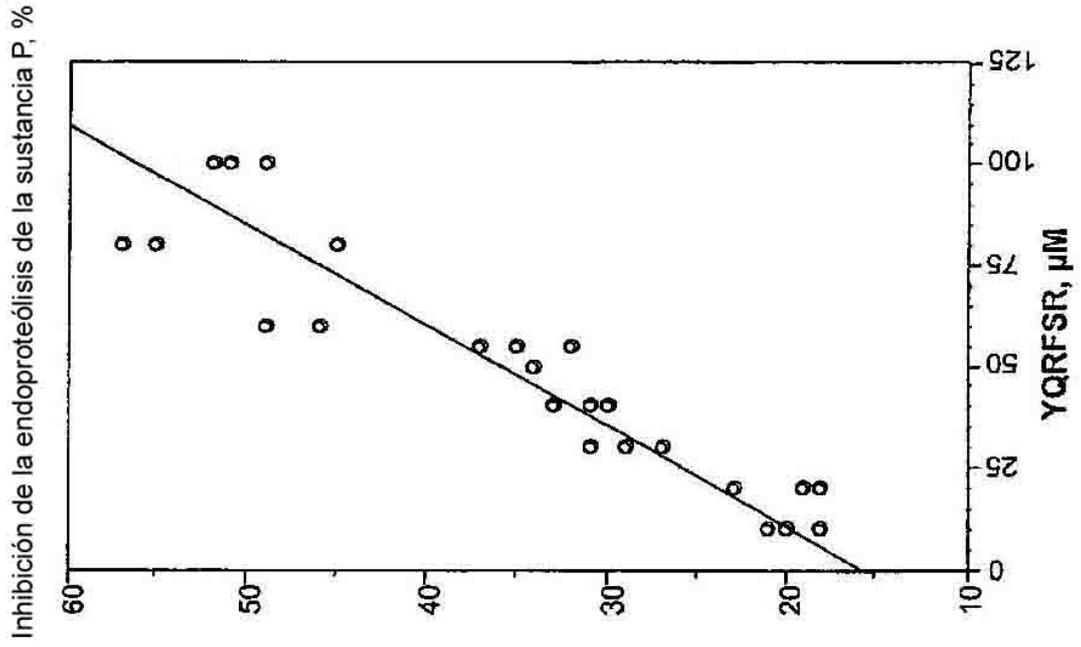
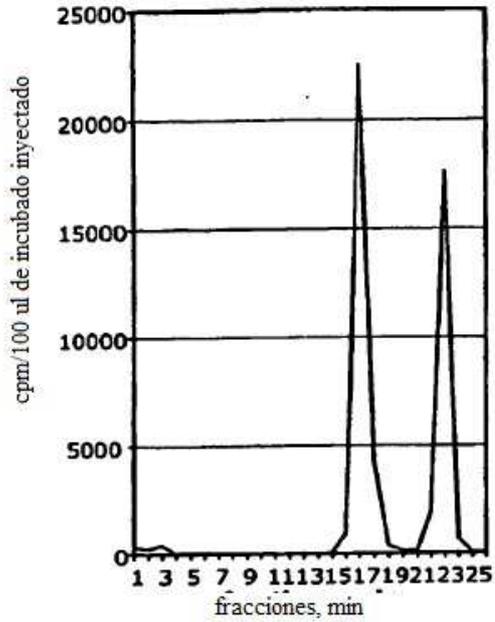


FIG.5

FIG.7



Endoproteólisis de la sustancia P (100 nM)
por membranas de células humanas LNCaP
(17 ug de proteína)



Endoproteólisis de la sustancia P (100 nM) por
membranas de células humanas (17 ug de
proteína) en presencia de YQRFSR (175 uM)

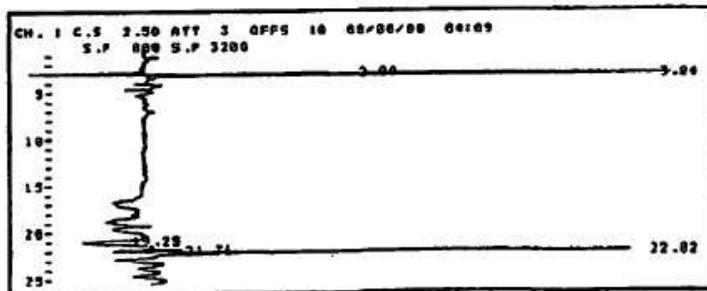
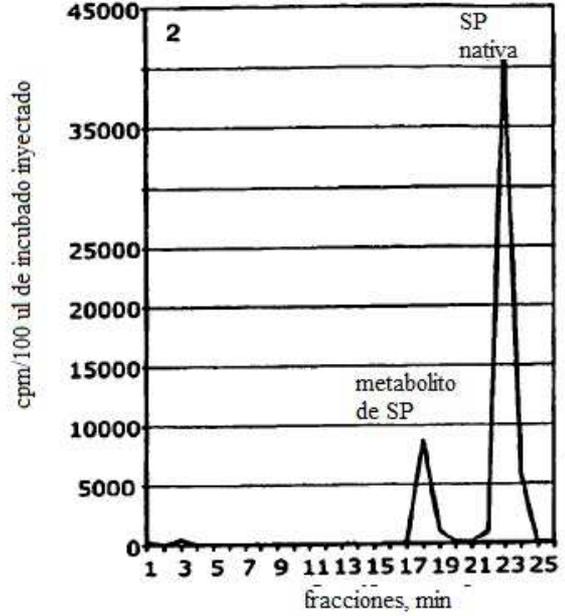


FIG.8

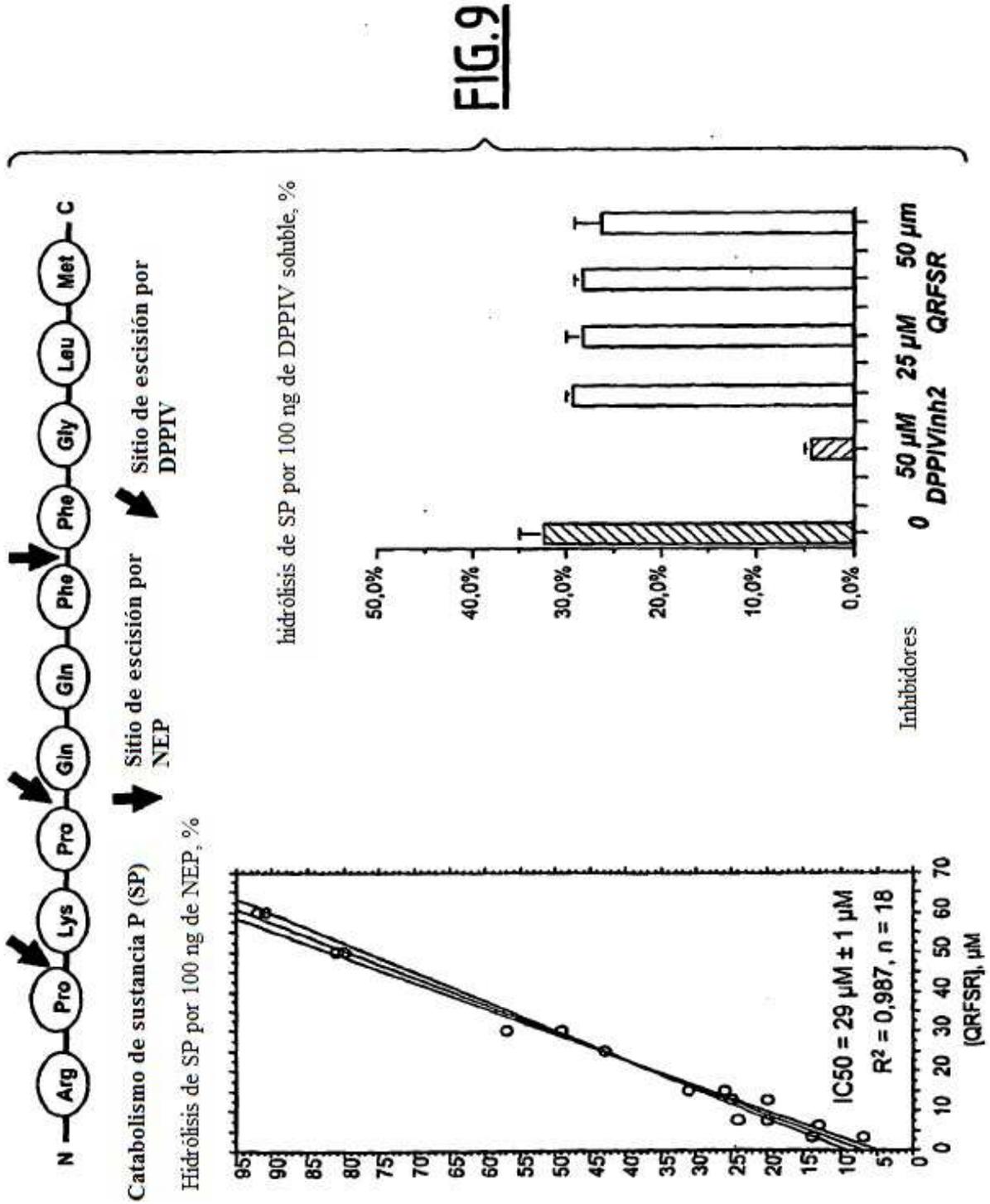
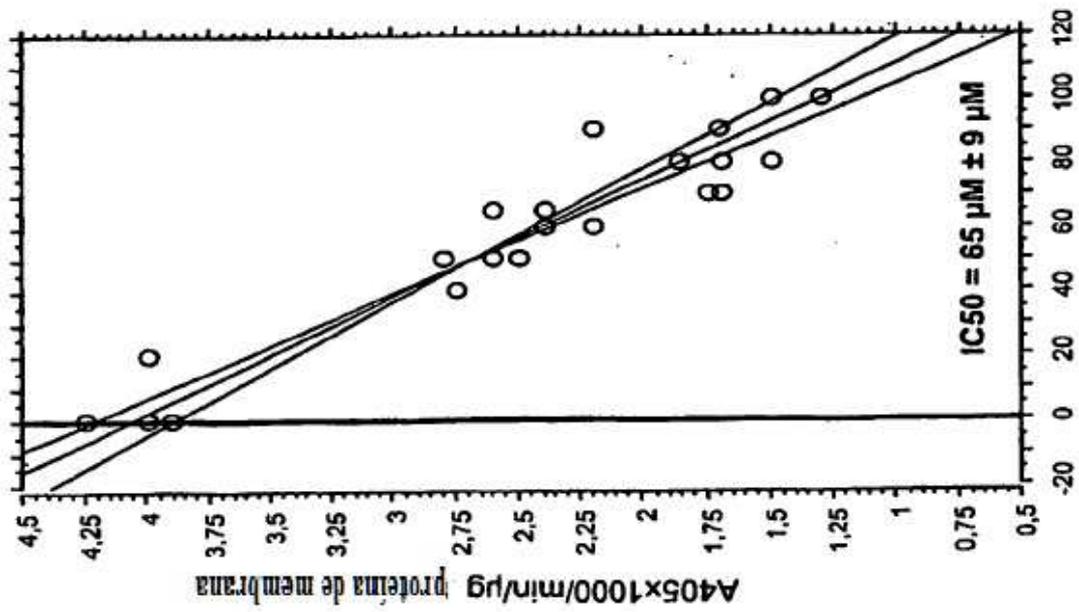
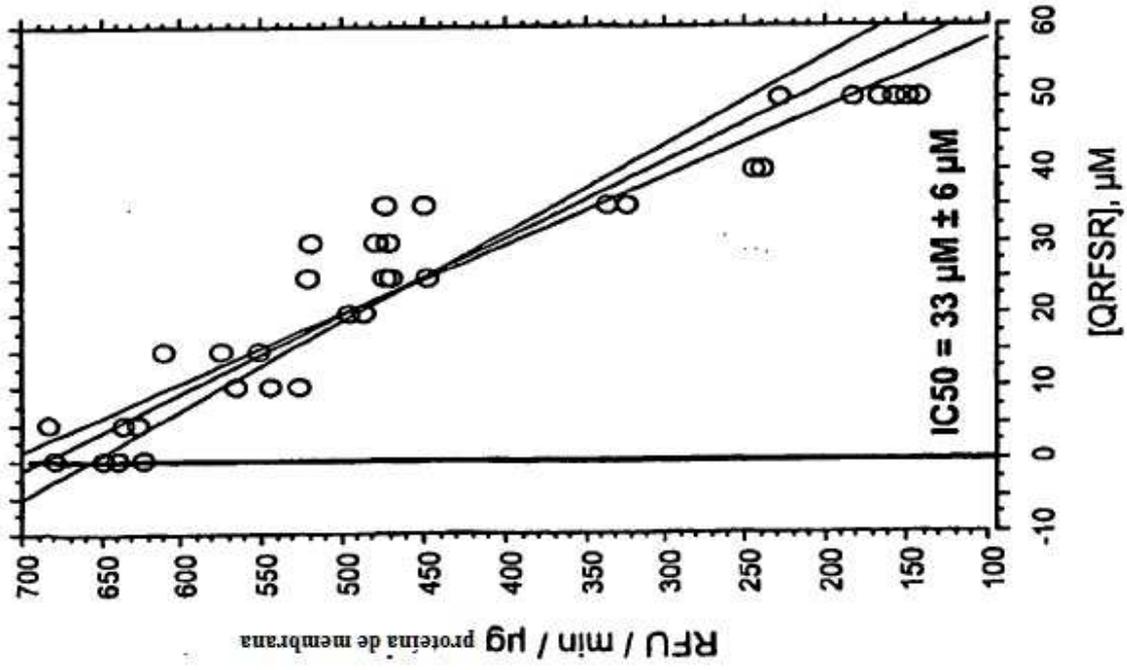


FIG.10



$A405x1000/min/\mu g \text{ proteína de membrana} = 4,066 - ,028 * [QRFSR], \mu M; R^2 = 0,926, n = 22$

FIG.11



$RFU / min / \mu g \text{ proteína de membrana} = 686,972 - 9,404 * [QRFSR], \mu M; R^2 = 0,884, n = 29$

Comportamiento del dolor: Duración del lamido de patas	Vehículo (n = 8)	0.5 mg/kg I.V. (n = 8)	1 mg/kg I.V. (n = 8)
durante la fase 0-20 min de prueba con formalina F(2,21) = 4.42 ; p = 0.025	144.13 ± 17.42	97.13 ± 13.70* t = 2.12 ; p = 0.052	84.25 ± 13.53* t = 2.71 ; p = 0.017
fase de 20-40 min F(2,21) = 3.36 ; p = 0.054	175.13 ± 10.45	123.50 ± 15.04* t = 2.82 ; p = 0.014	121.13 ± 22.26* t = 2.20 ; p = 0.045
fase de 40-60 min F(2,21) = 15.37 ; p = 0.0001	63.00 ± 12.65	12.13 ± 3.44* t = 3.88 ; p = 0.002	8.75 ± 2.90* t = 4.18 ; p = 0.001

(*) test de Dunnett vs. vehículo

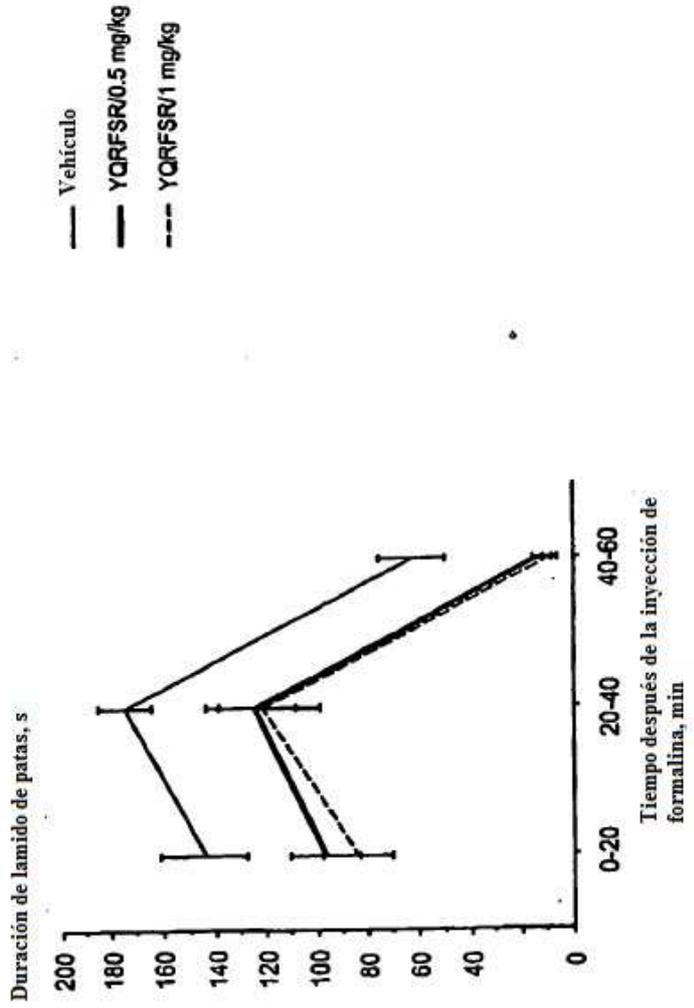
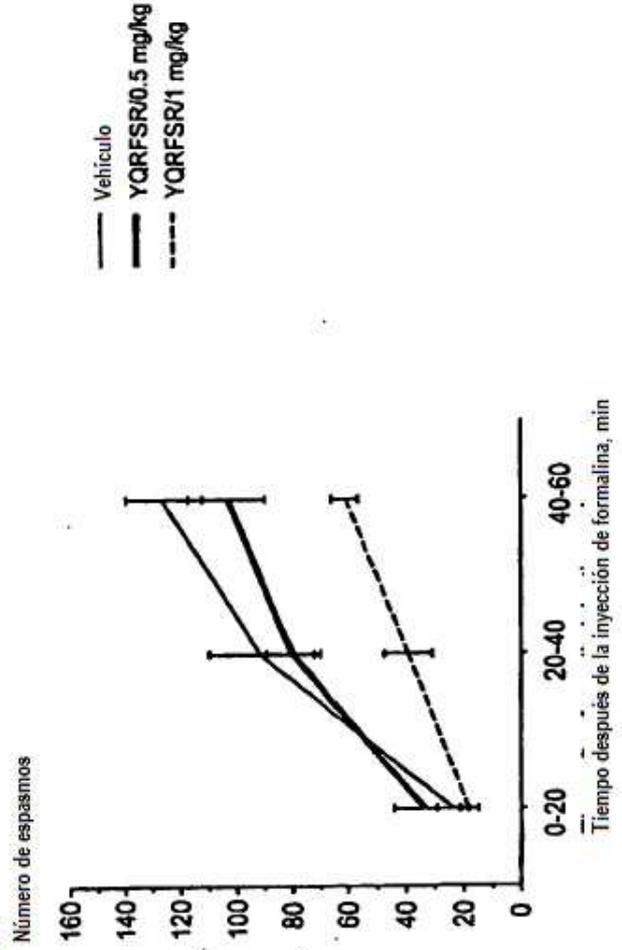


FIG.12

Comportamiento del dolor: Duración del lamido de patas	Vehículo (n = 8)	0.5 mg/kg (n = 8)	1 mg/kg (n = 8)
durante la fase 0-20 min de prueba con formalina F(2,21) = 1.07 ; p = 0.361	23.75 ± 5.15	33.13 ± 11.25	18.13 ± 2.77
fase de 20-40 min F(2,21) = 4.39 ; p = 0.026	91.50 ± 18.67	79.75 ± 9.59	39.13 ± 8.67* t = 2.54 ; p = 0.023
fase de 40-60 min F(2,21) = 8.29 ; p = 0.002	126.38 ± 13.69	103.75 ± 13.86	60.88 ± 4.60* t = 4.54 ; p = 0.005

(*) test de Dunnett vs. vehículo

FIG.13



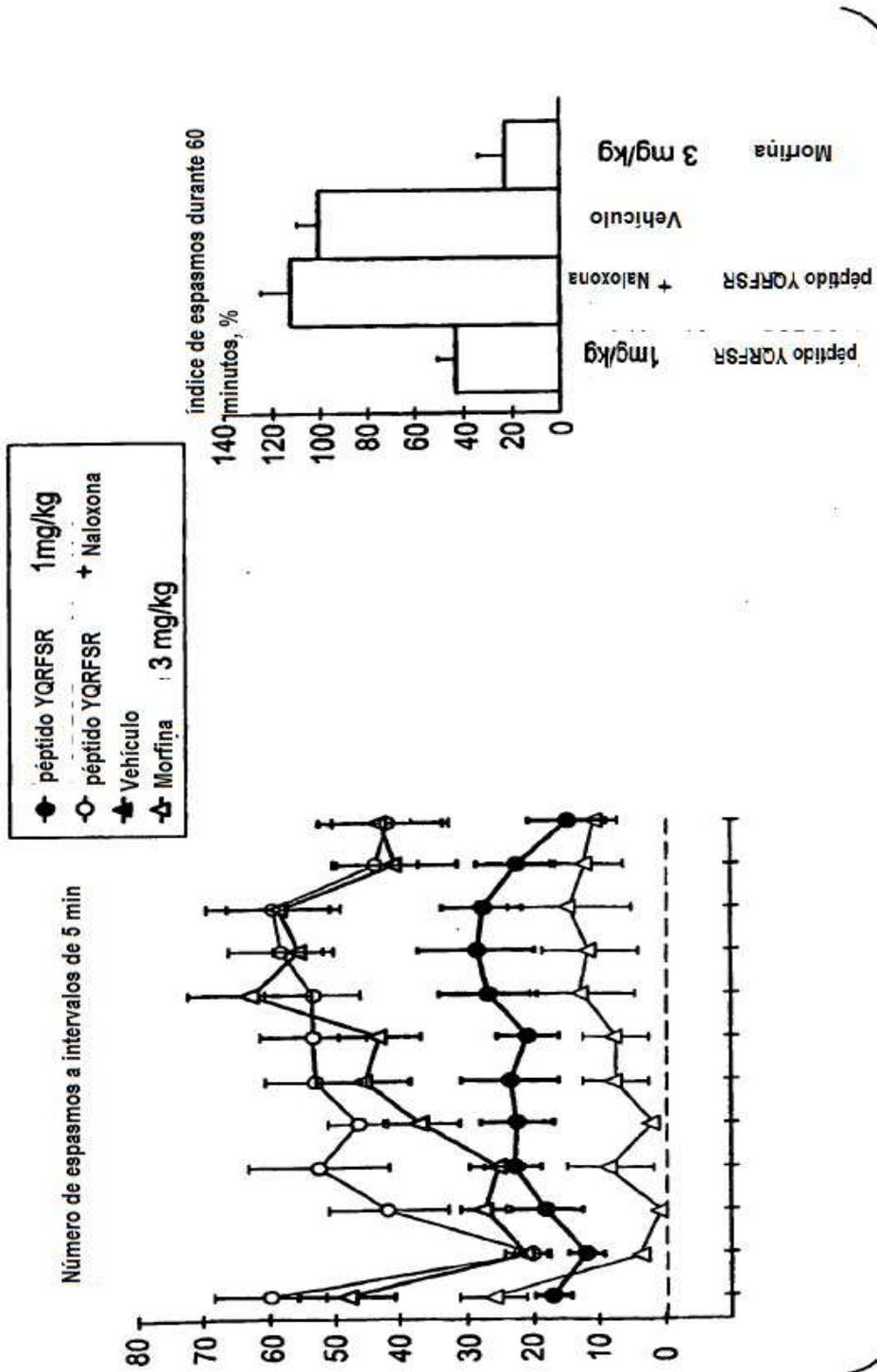


FIG.14

08/04/2005