



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 328**

51 Int. Cl.:
A61K 51/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **04742597 .0**
86 Fecha de presentación : **28.04.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1631320**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **Utilización de un análogo del tetrapéptido AcSDKP resistente a la enzima de conversión de la Angiotensina I, para la medición del índice de filtración glomerular en seres humanos y animales y kit que lo contiene.**

30 Prioridad: **29.04.2003 FR 03 05228**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

73 Titular/es:
ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS
3, avenue Victoria
75004 Paris, FR
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

72 Inventor/es: **Azizi, Michel y**
Ezan, Eric

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

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

Utilización de un análogo del tetrapéptido AcSDKP resistente a la enzima de conversión de la Angiotensina I, para la medición del índice de filtración glomerular en seres humanos y animales y kit que lo contiene.

La presente invención se refiere a la medición del índice de filtración glomerular (DFG) en un hombre sano o enfermo, así como en animales, por un nuevo procedimiento que pone en práctica un análogo de tetrapéptido N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), resistente a la enzima de conversión de la angiotensina I. La medida del DFG permite evaluar con precisión la función renal; constituye un resultado intermedio en la práctica clínica, para identificar así, una insuficiencia renal inicial y asegurar el seguimiento de una insuficiencia renal crónica, o después de un trasplante renal en la práctica clínica. Esta evaluación final de la función renal, es también indispensable para la realización de protocolos de investigación clínica y de experimentos en animales.

El recurso a procedimientos de medida precisos del DDFG, índice global de la función renal, es indispensable debido a las numerosas limitaciones ligadas a la sola estimación de este parámetro fisiológico, por la aparición de la creatinina o por el valor de la creatininemia (marcador endógeno) (Froissart M. *et al.*, Medecine Nucleaire, 1995, 19, 263-276; Medecine Nucleaire, 1995, 19, 251-262). Estas medidas recurren a marcadores de filtración glomerular. La inulina sigue siendo el marcador de referencia, pero las dificultades metodológicas vinculadas a su utilización listan su empleo a un pequeño número de equipos experimentados (Froissart M. *et al.*, ya citados). Así, el procedimiento del aclaramiento renal en el equilibrio de la inulina con recogida urinaria, necesita un personal cualificado y disponible, la puesta en marcha de una perfusión continua y una evacuación vesicular completa iterativa para cada período, particularmente difícil de poner en práctica, en los sujetos ancianos y en niños. El cálculo del aclaramiento a partir del caudal de perfusión del marcador o trazador, realizado en estado de equilibrio, tiene tendencia a sobreestimar de manera sistemática la medida del aclaramiento urinario, debido al hecho de una salida lenta de la inulina hacia el sector extracelular intersticial, unido a una débil difusibilidad (Froissart *et al.*, ya citados). Además, la inulina se presta mal a los procedimientos del aclaramiento después de inyección única, ya que el alcance del estado de equilibrio entre los sectores plasmáticos e intersticiales es tardío. Finalmente, la utilización de la inulina se ve limitada por las presiones metodológicas. Así, la disolución por calor en un volumen importante, es necesaria antes de la administración de la inulina, y la dosificación de la inulina se apoya en un procedimiento colorimétrico, pudiendo plantear problemas en presencia de cromógenos.

Se pueden también utilizar elementos marcados (radiofarmacéuticos), eliminados por filtración glomerular tal como ^{51}Cr -EDTA, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ _DPTA o ^{125}I -iotalamato. La principal ventaja de los radiofarmacéuticos radica en la precisión de su medida por conteo, tanto para las extracciones sanguíneas como urinarias. Sus inconvenientes múltiples residen en su coste, la necesidad de un laboratorio de radio-isótopos, y la irradiación arrastrada por su inyección (Froissart *et al.*, ya citados).

Habida cuenta de la importancia de la medida del DFG en fisiología, en patología, en farmacología y en la investigación clínica y experimental, y de las limitaciones de todas las técnicas a disposición de los cuerpos médicos, el desarrollo de un nuevo marcador de filtración glomerular, de utilización simple en el lecho del enfermo que permita en todo una medida fiable del DFG, está justificada.

Una sustancia puede ser utilizada como marcador o indicador para la medida del DFG, cuando responde esencialmente a los criterios siguientes:

- ser totalmente filtrable por el glomérulo
- no ser secretada, ni reabsorbida posteriormente en el tubulado
- no ser metabolizada a su paso en el riñón
- no tener efecto psicológico en la función renal
- no estar ligada a proteínas plasmáticas
- carecer de toxicidad, y
- disponer un aclaramiento constante para una amplia zona de concentraciones plasmáticas (Smith H.W. *et al.*, Smith HW., ed. Principles of renal physiology. New York; Oxford University Press, 1957, 25-35).

En consecuencia, el Solicitante se ha fijado como meta, proporcionar un indicador (marcador o trazador) de la filtración glomerular que responda mejor y más fácilmente a las necesidades de la práctica, que los indicadores del estado de la técnica (inulina, creatinina o radiofarmacéuticos).

El tetrapéptido hemorregulador N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (acetil-SKP o AcSDKP) es un inhibidor natural de la entrada en fase S de la célula cepa hematopoyética murina (Lenfant M *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 1989, 86 779-782). En ratones, la administración exógena del péptido protege a las células medulares contra los efectos citotóxicos de medicamentos anticancerosos y de la radiación, y aumenta significativamente la supervivencia de los animales

tratados (Masse A. *et al.*, Blood, 1998 91 441-9). Las propiedades biológicas del AcSDKP permiten especialmente su utilización como nuevo agente hematoprotector susceptible de ser utilizado *in vivo* en el curso de quimioterapia y radioterapia antitumoral, así como *in vitro*, como un adyuvante de los procedimientos de purga de médula ósea en caso de autoinjertos en humanos (véase para revisión, Azizi M. *et al.*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 28, 1066-1069). La utilización del AcSDKP en humanos necesita el estudio de su estabilidad en los fluidos biológicos. *In vitro*, la enzima de conversión de la angiotensina I (ECA), que posee 2 puntos activos N- y C- terminales homólogos y participa en la regulación de la homeostasia cardiovascular, es la principal enzima implicada en el catabolismo del AcSDKP (Rieger K.J. *et al.*, Biochem. J. 1993 296 1-6). El lugar N-Terminal de la ECA está implicado de forma preferencial en la hidrólisis del péptido *in vitro* ya que su eficacia catalítica frente a frente de este sustrato es 50 veces superior a la del lugar C-terminal (Rousseau A *et al.*, J.Biol Chem., 1995, 270, 3656-3661). En el hombre, las concentraciones plasmáticas y urinarias del AcSKDP aumentan significativamente, en el curso de la inhibición aguda o crónica de la ECA (Azizi M. *et al.*, J. Clin. Invest. 1996, 97 839-844) el AcSKDP es separada del organismo por dos mecanismos: la hidrólisis por la ECA, de una parte, y la filtración glomerular, por otra (Azizi M. *et al.*, Hipertensión, 1999, 33, 879-886). Cuando la ECA está activa, la cantidad de AcSDKP medida en la orina es débil. Representa la cantidad residual de AcSKDP intacta, no degradada por la ECA plasmática y endotelial, que se filtra al nivel de los glomérulos, después degradada por la ECA presente en la superficie en las células tubulares proximales. Cuando la hidrólisis del péptido es inhibida después de administración de un inhibidor de la ECA, se observa un aumento masivo de la excreción urinaria de la AcSKDP que está unida a dos mecanismos:

- a la filtración glomerular de la fracción libre de AcSKDP intacto en el plasma
- y sobre todo, a la inhibición de la ECA tubular por inhibidor filtrado a nivel del glomérulo.

Bajo el inhibidor de la ECA, del aclaramiento urinario del AcSKDP se ve aumentada pero sigue siendo inferior al aclaramiento de la creatinina endógena (69 +/- 27%) (Azizi M. *et al.*, 1999, ya citado). Esta diferencia es probablemente debida a la intermitencia de la degradación del péptido por la ECA entre las tomas del inhibidor y no a una reabsorción tubular del péptido, ya que el AcSKDP es ionizado al pH urinario y débilmente vinculado a las proteínas plasmáticas (< 1%, Azizi M. *et al.*, 1999, ya citado). En efecto, la concentración del AcSDKP plasmático varía entre un valor mínimo de 2 pmol/ml, y máximo de 4 a 6 pmol/ml entre dos tomas de captopril 50 mg, y que, de forma muy paralela a la inhibición de la ECA que oscila entre el 60 y el 99% entre 2 tomas (Azizi M. *et al.*, 1999, ya citado). El paralelismo estricto entre la evolución de las concentraciones plasmáticas del AcSDKP y la actividad de la ECA, demuestra claramente una reactivación intermitente de la ECA entre dos tomas de captopril. La contribución exacta de dos mecanismos (aclaramiento renal y reactivación intermitente de la ECA), aparece claramente en los pacientes que presentan una insuficiencia renal crónica. En efecto, se observa una acumulación mayor de AcSDKP en el plasma en los pacientes con insuficiencia renal, tratados por inhibidor de la ECA (Azizi M. *et al.*, 1999, ya citado). Los pacientes con insuficiencia renal, no tratados por inhibidor de la ECA presentan una discreta acumulación del péptido en el plasma. En el curso de la insuficiencia renal terminal, dos fenómenos concurren al aumento masivo de concentraciones plasmáticas de AcSKDP en los pacientes tratados por un inhibidor de la ECA.:

- el péptido no puede ser eliminado por filtración glomerular,
- ninguna reactivación intermitente de la ECA puede tener lugar, debido a la acumulación del inhibidor de la ECA en el plasma y los tejidos, en particular en los pacientes hemodializados.

En el marco de sus trabajos precedentes, los inventores han observado en particular que el AcSDKP prefundido, en asociación con un inhibidor de la ECA, podría servir de marcador de la filtración glomerular (Azizi M. *et al.*, J. Mol.Med., 2002, 80, 492-8). En el curso de un estudio que tenía como objetivo evaluar los efectos del polimorfismo inserción/supresión del gen de la ECA en el metabolismo del AcSDKP, los inventores han prefundido el AcSKDP a 1,12 µg/kg/min durante 15 minutos a dos voluntarios sanos que recibían la mitad de ellos, un inhibidor de la ECA, el captopril a la dosis de 50 mg 3 veces al día durante 3 días, y para la otra mitad un placebo (Azizi M. *et al.*, 2002, ya citado). Entre los resultados obtenidos, los inventores muestran que bajo el inhibidor de la ECA, del aclaramiento urinario del péptido exógeno está muy próxima al índice de filtración glomerular, estimada por el aclaramiento de la creatinina endógena. No obstante, este procedimiento presenta el inconveniente de ser complejo, ya que la perfusión del péptido debe realizarse en el pico de la inhibición de la ECA.

Además, existe también una fuerte variabilidad interindividual de la inhibición de la ECA ligada a una biodisponibilidad variable del inhibidor.

El solicitante ha seleccionado también los marcadores o indicadores que responden a las condiciones anunciadas anteriormente no presentando los inconvenientes de los procedimientos anteriores descritos. Ha descubierto que, de manera inesperada, los análogos del tetrapéptido hemorregulador N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) resistentes a la ECA se adaptan a una utilización como marcadores, trazadores o indicadores específicos de filtración glomerular y responden así mejor a las necesidades de la práctica que los procedimientos anteriormente utilizados para medir el índice de filtración glomerular.

En consecuencia, la presente invención tiene por objeto la utilización de análogos del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro, resistentes a la ECA, para la preparación de un reactivo o trazador adaptado a la medida de la DFG.

Los análogos del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro, resistentes a la ECA y sus procedimientos de preparación se describen especialmente en los artículos a nombre de Gaudron S. *et al.* (Stem.Cells, 1999, 17, 2,100-106; J.Med.Chem., 1997, 40, 24, 3963-3968), estos análogos son los siguientes:

- tres pseudopéptidos, en los que uno de los enlaces peptídicos ha sido reemplazado por un grupo aminometileno $\Psi(\text{CH}_2\text{-NH})$:

N-acetil-Ser- CH_2NH Asp-Lys-Pro: S Ψ

N-acetil-Ser-Asp-(CH_2NH)-Lys-Pro:D Ψ

N-acetil-Ser-Asp-Lys(CH_2NH)-Pro:K Ψ ,y

- un péptido modificado en su extremidad C-terminal por amidación: N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro-NH₂. Este producto no difiere de la molécula inicial por acidificación de la función carboxilo del residuo de prolina situado en posición C-terminal del péptido.

Estas diferentes modificaciones confieren a los dichos análogos del AcSDKP una gran estabilidad frente a frente de la hidrólisis inducida por la ECA.

Conforme a dicha utilización, los citados análogos del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro, resistentes a la ECA, son ventajosamente radiomarcados.

La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de medida del DFG, caracterizado porque comprende la determinación del aclaramiento plasmático y/o la medida del aclaramiento renal en el estado de equilibrio de uno de los citados análogos del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro después de inyección intravascular, de preferencia única, del citado análogo.

De manera sorprendente, la puesta en práctica de estos análogos del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro, podría permitir, determinando el aclaramiento plasmático total (Ct) o, preferentemente, calculando por un procedimiento simplificado, el valor del aclaramiento plasmático (C) según procedimientos conocidos *per se*, y especialmente descritos en los artículos a nombre de Froissart *et al.* (ya citados), de evitar las medidas del aclaramiento unitario fraccionadas, más difíciles de poner en práctica en humanos [pero que pueden no obstante ser útiles, en animales, y en el marco de estudios clínicos] y de reducir el número de extracciones a cualesquiera puntos e incluso a un solo punto, no presentando en absoluto los inconvenientes de los radiofarmacéuticos.

Según un modo ventajoso de puesta en práctica de dicho procedimiento, el análogo del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro es seleccionado de un grupo formado por el N-acetil-Ser- CH_2NH Asp-Lys-Pro:(S Ψ), el N-acetil-Ser-Asp-(CH_2NH)-Lys-Pro (:D Ψ), el N-acetil-Ser-Asp-Lys(CH_2NH)-Pro:(K Ψ), y el N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro -NH₂.

Según la invención, la medida de dicho análogo del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro se efectúa por cualquier medio de detección sensible y específico en al menos una muestra biológica, y especialmente por inmunodifusión o por las técnicas de cromatografía y/o espectrometría de masas.

De manera ventajosa, dicha inmunodifusión es una inmunodifusión muy específica, no presentando reacción cruzada ni con la molécula natural (AcSDKP) ni con otros péptidos amidados ni con inhibidores de la enzima de conversión (Junot C. *et al.*, J. Immunoassay Immunochem., 2001, 22, 15-31). Esta técnica de dosificación por EIA (inmunoensayo enzimático), presenta una buena precisión y una buena reproducibilidad. Su límite de cuantificación es de 1 nM en el plasma. Por otra parte, AcSDKP-NH₂ no se ha degradado por la ECA presente en el plasma de ratón (Junot C. *et al.*, 2001, ya citado). Su estabilidad evaluada en las condiciones experimentales y de realización de las dosificaciones es satisfactoria. Además, ninguna alteración ha sido constatada después de 3 ciclos de congelación-descongelación. Los coeficientes de variación (CV) de repetibilidad, de reproducibilidad están comprendidos entre el 1,4 y el 18% y los valores de exactitud están comprendidos entre el 85 y el 115% de los valores teóricos (Junot C. *et al.*, 2001, ya citado).

Igualmente conforme a la presente invención, dicho análogo del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro puede ser radiomarcado. En este caso, la medida de la concentración en péptido es realizada por una técnica de creación de imágenes o por conteo radioactivo de las muestras.

La presente invención tiene igualmente por objeto un kit o un paquete de medición del índice de filtración glomerular, caracterizado porque comprende un análogo de N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro seleccionado en el grupo constituido por el N-acetil-Ser-($\text{CH}_2\text{-NH}$)- Asp-Lys-Pro (S Ψ), el N-acetil-Ser-Asp ($\text{CH}_2\text{-NH}$)-Lys-Pro (D Ψ), el N-acetil-Ser-Asp-Lys ($\text{CH}_2\text{-NH}$)-Pro (K Ψ) y el N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro -NH₂ y un medio de detección de dicho análogo en al menos una muestra biológica.

Según un modo de realización ventajosa de dicho kit o cofre, dicho medio de detección de dicho análogo es seleccionado en el grupo constituido por las inmunodifusiones, las técnicas de cromatografía de espectrometría de masas.

Según otro modo de realización ventajosa, de dicho kit o cofre, el citado análogo es radiomarcado, y el citado medio de detección es seleccionado en el grupo constituido por las técnicas de creación de imágenes y las técnicas de conteo radioactivo.

- 5 Los análogos de N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro responden a los criterios de elección de un marcador o indicador ideal de la filtración glomerular:
- son libremente filtrados,
 - 10 - no se vinculan a las proteínas plasmáticas
 - no son ni secretadas, ni reabsorbidas, ni metabolizados por la tobera,
 - no tienen efecto psicológico al producirse una administración única
 - 15 - están desprovistos de toxicidad y sin eliminación por vía extra renal
 - resisten a la hidrólisis por la ECA de ratas y humanos, *in vitro*, contrariamente al péptido natural.

20 Además de las disposiciones que preceden, la invención comprende también otras disposiciones que aparecerán de la descripción que sigue, que se refiere a ejemplos de puesta en práctica del procedimiento objeto de la presente invención, así como de los dibujos adjuntos, en los que:

- la Figura 1 representa las fórmulas de los análogos del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro;
- 25 - las Figuras 2A y 2B representan la cinética plasmática de la inulina con y sin captopril
- las Figuras 3A y 3B representan la cinética plasmática del análogo N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro-NH₂, con y sin captopril.
- 30 - las Figuras 4A y 4B representan la cinética plasmática del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro, con y sin captopril.

Debe quedar bien entendido que estos ejemplos se facilitan únicamente a título de ilustración del objeto de la invención, por lo que no constituyen de manera alguna una limitación.

35 Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

I.1 Productos

40 Los dos péptidos (AcSDKP y AcSDKP-NH₂ - 97% de pureza) proceden de la Sociedad NEOSYSTEME. El captopril y la inulina-³H (95% de pureza-Actividad específica: 200 mCi/g) proceden de la sociedad SIGMA. Cada solución de inyección ha sido preparada separadamente en agua fisiológica un día antes de los experimentos en animales.

45 El control de la concentración de las soluciones administradas, así como la dosificación de las muestras se han realizado por dosificación inmunológica, conforme el procedimiento expuesto en Junot C. *et al*, ya citado para los grupos tratados con el AcSDKP y con el AcSDKP-NH₂ y por centelleo líquido para los grupos testigos tratados con la inulina-³H (G).

50 El límite de detección elegido para el grupo AcSDKP es de 0,2 nM para las muestras plasmáticas, y de 0,5 nM para las muestras urinarias. Para el grupo AcSDKP-NH₂, el límite de detección es de 0,15 ng/ml para las muestras plasmáticas y urinarias.

I.2 Animales

55 El estudio ha sido realizado con ratas macho Wistar (peso medio alrededor de 320 g) previamente cateterizadas al nivel de la arteria femoral. El número de ratas era de cinco por grupo (6 grupos).

- Grupo 1: 1 mg/kg de AcSDKP en I.V. (bolus)
- 60 - Grupo 2: captopril (10 mg/kg/día) durante 7 días por cebado después de 1 mg/kg de AcSDKP + 1 mg/kg de captopril en I.V. (bolus) el día de la cinética,
- Grupo 3: 1 mg/kg de AcSDKP- NH₂ en I.V. (bolus)
- 65 - Grupo 4: captopril (10 mg/kg/d) durante 7 días por cebado después 1 mg/kg de AcSDKP -NH₂ + 1 mg/kg de captopril en I.V. (bolus) el día de la cinética.
- Grupo 5: 1 mg/kg de inulina-³H(G) /aproximadamente μ ci/rata) en I.V. (bolus),

ES 2 278 328 T3

- Grupo 6: captopril (10 mg/kg/d) durante 7 días por cebado después 1 mg/kg de inulina-³H (aproximadamente 60 μ ci/rata) en I.V. (bolus).

Desviaciones al protocolo:

- Una rata suplementaria fue tomada en cuenta para el grupo n° 3 (AcSDKP-NH₂ solo
- Dosis administradas: 1,20 mg/kg para el AcSDKP - 0,82 mg/kg para el AcSDKP -NH₂ - 1,05 mg/kg para la inulina -³H.
- Extracciones urinarias: se realizaron extracciones suplementarias para los grupos (1-2-3-4-5) con el fin de contar con un conjunto de informaciones, lo más importantes posible:

Grupo N° 1: T_{0-2h} - T_{2-4h} - T_{4-5h} - T_{5-24h} - T_{24-36h} - T_{36-48h}

Grupo N° 2: T_{24-30h} - T_{30-48h}

Grupo N° 3: T_{4-7h} - T_{7-24h} - T_{24-48h}

Grupo N° 4: T_{0-4h} - T_{4-24h} - T_{24-48h} - T_{48-72h}

Grupo N° 5: T_{2-5h} - T_{5-7h} - T_{7-24h} - T_{24-30h} - T_{30-48h} - T_{48-72h}

I.3 Medidas

La concentración plasmática de los compuestos se midió en los tiempos siguientes: T₀ - T₅ - T₁₀ - T₃₀ - T₆₀ - T₁₂₀ - T₂₄₀ - T₃₀₀ minutos.

La concentración urinaria de los compuestos se midió en los tiempos siguientes: T_{-24-0h} (antes del comienzo de los experimentos), T_{0-2h}, T_{2-4h}, T_{4-24h} y en los tiempos descritos en la parte “desviaciones al protocolo” para las extracciones urinarias suplementarias.

II Análisis farmacocinético

Los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos por modelación sobre el logicial Siphar V04 (Simed, Créteil) fueron:

- AUC_{0-Tlast}: área bajo la curva hasta el último punto medible
- AUC_{0-inf}: área bajo la curva hasta el infinito
- T_{1/2}: media vida de eliminación
- aclaramiento plasmático
- aclaramiento urinario: (cantidad urinaria excretada total/AUC plástica)/peso de la rata

La modelación farmacocinética se realizó de la manera siguiente:

- Análisis biocompartimental para los grupos tratados con inulina-³H
- Análisis monocompartimental para los grupos tratados con el AcSDKP y el AcSDKP -NH₂

III Resultados

Las concentraciones plasmáticas y urinarias medidas así como los parámetros farmacocinéticos modelados por cada rata se presentan:

Tabla I	AcSDKP	Grupo n° 1
Tabla II	AcSDKP en presencia de captopril	Grupo n° 2
Tabla III	AcSDKP-NH ₂	Grupo n° 3
Tabla IV	AcSDKP- NH ₂ en presencia de captopril	Grupo n° 4
Tabla V	Inulina- ³ H	Grupo N° 5
Tabla VI	Inulina- ³ H en presencia de captopril	Grupo n° 6
Tabla VII	Tabla recapitulativa	

ES 2 278 328 T3

El AcSDKP es un péptido endógeno en la rata. Por este motivo, para los grupos nº 1 y nº 2, el AcSDKP endógeno ha debido ser suprimido de los resultados. La tasa del AcSDKP endógeno se determinó haciendo la suma de la cantidad de AcSDKP (nmol) del período T_{24-48h} (se estima que 24 horas después de la administración del péptido en I.V., sólo está presente el AcSDKP endógeno). Este resultado se ha multiplicado por 2 (para el período T_{0-24h} y T_{24-48h}) y suprimido del total de la cantidad urinaria para cada rata.

Las representaciones gráficas de las concentraciones plasmáticas medias de cada grupo se representan:

Figuras 2A y 2B	inulina- ^3H	Grupos nº 5 y nº 6
Figuras 3A y 3B	AcSDKP -NH $_2$	Grupos nº 3 y nº 4
Figuras 4A y 4B	AcSDKP	Grupos Nº 1 y nº 2

TABLA I

Grupo nº 1 - AcSDKP sin captopril - Concentración plasmática, urinaria y parámetros farmacocinéticos para el AcSDKP

Concentración plasmática (nM)

Ratas Tiempo (min)	1	3	4	5	8	media	SD
5	2188	1759	1239	2100	1802	1818	373
10	729	400	265	671	508	514	191
15	268	96	135	328	143	194	99
30	34	14	10	121	10	38	47,6
60	5	0,36	0,15	33	2	8,2	14,2
120	ILQ	ILQ	ILQ	2	ILQ	2,2	-
180	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	-	-
240	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	-	-
300	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	-	-
AUC _{0-inf} nM	230401	16319	13026	18178	16223	17393	3625
t _{1/2} (min)	6,4	4,7	4,4	12,8	5,9	6,8	3,4
VD (ml/kg)	894	1070	1034	2600	1346	1389	697
Conc. Ur. (nM)							
0-2h	22830	NS	27250	135	NS		
2-4h	11810	NS	16220	14270	NS		
4-5h	12050	14060	NS	7806	NS		
5-24h	299	2494	NS	965	1334		
21-36h	244	333	2697	93	NS		
36-48h	77	61	214	55	141		
Vol. Urin. (ml)							
0-2h	1,1	NS	1,7	0,7	NS		
2-4h	0,6	NS	1,0	2,5	NS		
4-5h	2,8	3,7	NS	1,9	NS		
5-24h	33,2	4,1	NS	21,3	58,9		
21-36h	16,9	10,1	5,2	9,1	NS		
36-48h	51,6	27,1	16,1	36,7	56,1		
C. Urin. (nmol)							
0-2h	25,1	0,0	46,7	0,1	NS		
2-4h	7,1	0,0	15,7	36,4	NS		
4-5h	33,5	51,3	0,0	14,6	NS		
5-24h	9,9	10,2	0,0	20,6	78,5		
21-36h	4,1	3,4	15,5	0,9	NS		
36-48h	4,0	1,7	3,4	2,0	7,9		
total (nmol)	83,7	66,6	81,3	74,5	86,5		
Cant. admin... (nmol)	757,7	706,5	771,9	833	832,0		
Peso (kg)	0,3392	0,3265	0,3035	0,3210	0,3258	0,32	0,01
dosis (mg/kg)	1,09	1,05	1,24	1,27	1,24	1,18	0,1
% excretado	11	9,4	10,5	8,9	10,4	10,07	0,86

ES 2 278 328 T3

% exc. endo.	8,9	8,0	5,6	8,3	8,5	7,86	1,29
CL _R (ml/min/kg)	10,7	12,5	20,3	12,8	16,4	14,52	3,82
C.Urin.(nmol)							
CL _R	8,6	11,1	11,5	11,8	13,0	11,21	1,61
(ml/min/kg)- endog							
C.total							
(ml/min/kg)	97	132,6	192,6	142,8	157,4	144,46	34,95
dosis/AUC							
NS: Sin muestras							

TABLA II

Grupo n° 2 - AcSDKP con captopril - Concentración plasmática, urinaria y parámetros farmacocinéticos para el AcSDKP en presencia de captopril

Concentración plasmática (nM)

Ratas							
Tiempo (min)	1	2	6	7	8	media	SD
5	6707	5413	5511	5293	5393	5663	588
10	5920	4813	4288	5439	4445	4981	687
15	5571	4016	3399	3876	3343	4041	904
30	3645	2176	2485	2173	1804	2457	707
60	1759	735	848	1069	590	1000	459
120	501	151	145	197	97	218	162
180	159	32	39	48	21	60	56
240	52	10	18	23	7	22	18
300	26	9	6	11	4	11	9
AUC _{0-inf} nM	341133	196456	200683	217932	167504	224742	67543
t1/2 (min)	35,5	29,2	29,5	31,4	28,1	30,7	2,9
VD (ml/kg)	353	653	499	505	567	515	110
Conc.Ur.(nM)							
0-2h	NS	NS	NS	NS	NS		
2-4h	253	821500	126214	NS	126118		
5-24h	25502	2119	7607	58597	5746		
21-36h	202	1081	NS	NS	NS		
36-48h	248	55	197	69	165		
Vol.Urin.(ml)							
0-2h	NS	NS	NS	NS	NS		
2-4h	0,8	0,9	6,5	NS	4,2		
4-5h	19,8	23,1	28,9	11,1	35,2		
5-24h	8,2	8,9	NS	NS	NS		
21-36h	32,4	44,3	53,9	6,5	64,4		

ES 2 278 328 T3

	36-48h	61,1	77,2	89,2	17,6	103,9		
	C.Urin.							
5	(nmol)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
	0-2h	0,2	744,4	820,9	0,0	535,3		
	2-4h	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
	4-6h	504,6	49,0	219,7	649,1	202,3		
10	6-24h	1,6	9,6	0,0	0,0	0,0		
	24-30h	8,0	2,5	10,6	0,4	10,6		
	36-48h	514,5	805,5	1051,2	649,5	764,7		
	total (nmol)							
15	Cant.	657,7	918,1	739,4	718,9	764,7		
	admin...	0,2796	0,3017	0,3135	0,2955	0,3211	0,30	0,02
	(nmol)	1,15	1,48	1,15	1,19	1,16	1,23	0,15
20	Peso (kg)							
	dosis (mg/kg)							
	% excretado	78,2	87,7	142,2	90,4	97,9	99,27	25,00
25	% exc.	75,3	85,1	139,3	90,2	95,1	97,00	24,77
	endog.							
	CL _R	5,39	13,59	16,71	10,09	13,91	11,94	4,35
30	(ml/min/kg)	5,2	13,2	16,4	10,1	13,5	11,67	4,25
	CL _R							
	(ml/min/kg)-							
	endog							
35	C.total	6,9	15,5	11,8	11,2	14,2	11,9	3,31
	(ml/min/kg)							
	dosis/AUC							

NS: Sin muestras

Tabla III – Grupo nº 3 – AcSDKP- NH₂ con captopril - Concentración plasmática, urinaria y parámetros farmacocinéticos para el AcSDKP – NH₂ en presencia de captopril

Ratas

	1	2	1bis	4	5	6	media	SD
Tiempo (min)								
5	2581	3139	2865	2491	3250	2663	2831	309
10	1611	2288	2425	2152	2918	2595	2331	442
15	1655	985	22,04	1796	1930	1750	1720	407
30	748	880	1317	1329	930	867	1012	248
60	233	443	598	545	416	463	450	126
120	47	45	163	118	48	69	82	48
180	6	8	25	32	9	19	16	11
240	ILQ	ILQ	3	5	2	4	3	1
300	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	ILQ		
AUC _{0-inf} mM	73978	87407	125025	11894	101003	96190	99249	17976
t _{1/2} (min)	20,7	20,7	24,5	26,8	21,8	25,1	23,3	2,5
VD (ml/kg)	338	27,0	220	253	256	261	266	39
Conc.Ur. (ng/ml)								
0-2h	41655	NS	NS	NS	NS	NS		
2-4h	NS	67056	NS	22941	148362	NS		
4-7h	19076	9228	NS	NS	NS	NS		
7-24	462	192	8467	965	815	6202		
246-48h	10	42	986	16	ILQ	59		
Vol.Urin.(ml)								
0-2h	4,22	NS	NS	NS	NS	NS		
2-4h	NS	2,69	NS	6,16	1,96	NS		
4-7h	441	2,55	NS	NS	NS	NS		
7-24h	34,69	44,55	24,98	43,42	35,87	25,7		
24-48h	53,33	31,19	47,91	37,26	64,86	53,41		

11

Tabla IV – Grupo nº 4 – AcSDKP-NH₂ con captopril - Concentración plasmática, urinaria y parámetros farmacocinéticos para el AcSDKP-NH₂ en presencia de captopril
Concentración plasmática (ng/ml)

Ratas		1	2	3	4	6 bis	media	SD
Tiempo (min)								
5		3623	3115	4099	2863	3280		
10		1750	3571	3075	2682	2346		
15		1432	1978	2363	1635	1960		
30		1128	891	1173	889	1986		
60		312	338	346	357	910		
120		31	63	64	73	140		
180		7	11	18	16	23		
240		2	3	3	3	2		
300		ILQ	ILQ	ILQ	ILQ	0		
AUC _{0-inf} mM		89343	100543	114983	92278	153339		
t1/2 (min)		21,9	23,0	23,1	24,1	23,3		
VD (ml/kg)		284	230	260	327	242		
Conc. Ur. (ng/ml)								
0-4h		NS	NS	NS	NS	NS		
4-24h		10906	3107	11032	22749	10380		
24-48h		239	35	337	171	178		
48-72h		11	ILQ	11	70	NS		
Vol. Urin. (ml)								
0-4h		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
4-24h		19,12	46,46	25,93	12,05	34,09		
24-48		44,93	62,22	48,50	58,89	37,78		
48,72		70,88	57,86	58,98	57,25	0,00		
C. Urin. (ng)								

13

Tabla V – Grupo nº 5 –Inulina –3NH sin captopril - Concentración plasmática, urinaria y parámetros farmacocinéticos para la inulina –3H Concentración plasmática (DMM/ml)

Ratas	6	7	8	9	10	media	SD
Tiempo (min)							
5	1,44E+06	2,10E+08	1,93E+06	1,67E+06	1,21E+06	1,67E+06	3,60E+05
10	1,31E+06	1,62E+06	1,38E+06	1,01E+06	7,86E+05	1,22E+06	3,25E+08
15	1,15E+06	1,14E+06	1,07E+06	7,84E+05	5,65E+05	9,41E+05	2,57E+05
30	9,88E+05	7,67E+05	6,05E+05	3,95E+05	3,38E+05	618,E+05	2,67E+05
60	5,00E+05	4,03E+05	2,97E+05	1,58E+05	1,64E+05	3,04E+05	1,49E+05
120	2,52E+05	2,19E+05	1,98E+05	5,80E+04	4,33E+04	1,54E+05	9,65E+04
180	1,94E+05	1,77E+05	1,71E+05	4,17E+04	2,45E+04	1,21E+05	8,13E+04
240	1,72E+05	1,59E+05	1,74E+05	2,76E+04	1,56E+04	1,09E+05	8,06E+04
300	1,55E+05	1,78E+05	1,57E+05	2,25E+04	1,38E+04	1,05E+05	8,01E+04
AUC _{0-∞}	1,75E+08	1,47E+08	1,64E+08	5,40E+07	4,22E+07	1,16E+08	6,34E+07
infDPM/ml*min	264,4	136,8	295,6	69,7	52,5	163,8	111,2
t1/2 B (min)	23,9	7,4	11,0	7	5,2	10,9	7,5
t1/2 A (min)	1221	796	1450	824	707	1,00E+03	3,20E+02
VD (ml/kg)	1,16E+08	1,12E+08	9,75E+07	5,17E+07	4,11E+07	8,36E+07	3,48E+07
AUC ₀₋₃₀₀ min-DPM*min							
Conc.Ur.(DPM/ml)							
0 -2h	1,63E+07	4,44E+07	NS	NS	1,55E+07		
2-5h	1,51E+07	1,38E+07	3,26E+07	NS	9,66E+06		
5-7h	1,22E+07	8,00E+05	1,05E+07	NS	NS		
7-24h	1,44E+05	2,24E+05	5,00E+05	6,78E+06	4,12E+05		
24-30h	3,54E+05	1,56E+05	1,92E+05	9,42E+05	5,08E+04		
30-48h	1,13E+05	1,02E+05	1,12E+05	1,80E+04	2,25E+04		

48-72h	6,94E+04	7,03E+04	8,60E+04	NS	NS
Vol.Urin.(ml)					
0 -2h	0,96	2,61	NS	NS	3,24
2-5h	7,54	1,58	4,59	NS	4,49
5-7h	2,84	2,27	1,23	NS	NS
7-24h	40,08	44,14	30,53	16,3	24,3
24-30h	5,27	8,61	5,32	5,99	14,76
30-48h	41,58	41,16	31,8	19,06	48,87
48-72h	61,48	58,63	46,55	NS	NS
C.Urin. (DPM)					
0 -2h	1,44E+06	1,16E+08	0,00E+00	0,00E+00	5,03E+07
2-5h	1,44E+06	2,18E+07	1,50E+08	0,00E+00	4,34E+07
5-7h	1,44E+06	1,81E+06	1,28E+07	0,00E+00	0,00+00
7-24h	1,44E+06	9,87E+06	1,53E+07	1,11E+08	9,89E+06
24-30h	1,44E+06	1,35E+06	1,02E+06	5,64E+06	7,50E+05
30-48h	1,44E+06	4,22E+06	3,56E+06	3,43E+05	1,10E+05
48-72h	1,44E+06	4,12E+06	4,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
total (nmol)	1,44E+06	1,59E+08	1,86E+08	1,17E+08	1,05E+08
Cant. admin...					
(DPM)	1,77E+08	1,90E+08	1,96E+08	1,49E+08	1,27E+08
Peso (kg)	0,3162	0,3196	0,3507	0,3363	0,3221
dosis (mg/kg)	0,93	1,04	1,05	1,12	0,87
% excretado	102,0	83,9	94,9	78,4	83
CL _{R(Qinf)} (ml/min/kg)	3,3	3,4	3,2	6,4	7,8
CL _{R(Qinf)} (ml/min/kg)	4,9	4,5	5,4	6,7	8
C.total (ml/min/kg)	3,2	4	3,4	8,2	9,4
dosis/AUC					
NS: Sin muestras					

Tabla VI – Grupo nº 6 –Inulina –3NH sin captopril - Concentración plasmática, urinaria y parámetros farmacocinéticos para la inulina –³H en presencia de captopril
Concentración plasmática (DPM/ml)

Ratas						
Tiempo (min)	1	2	3	4	5	media SD
5	1,64E+06	2,14E+06	8,72E+05	1,26E+06	5,51E+05	1,29E+06 6,26E+05
10	9,19E+05	1,64E+06	6,67E+05	7,82E+05	6,47E+05	9,32E+05 4,12E+05
15	7,16E+05	1,48E+06	5,84E+05	6,32E+05	6,15E+05	8,06E+05 3,82E+05
30	3,94E+05	1,15E+06	4,20E+05	3,62E+05	6,93E+05	6,04E+05 3,34E+05
60	1,64E+05	7,41E+05	2,52E+05	1,58E+05	5,02E+05	3,63E+05 2,53E+05
120	4,97E+04	3,67E+05	1,08E+05	4,60E+04	1,89E+05	1,52E+05 1,33E+05
180	4,21E+04	1,94E+05	6,79E+04	2,61E+04	6,34E+04	7,87E+04 6,66E+04
240	2,20E+04	1,09E+05	2,18E+04	2,06E+04	4,46E+04	4,36E+04 3,80E+04
300	2,53E+04	2,95E+04	2,24E+04	1,66E+05	4,25E+04	2,73E+04 9,71E+03
AUC ₀₋	5,25E+07	1,47E+08	5,16E+07	4,38E+07	8,40E+04	7,57E+07 4,26E+07
inDPM/mi*min	69,9	54,4	60,6	62,7	207,8	91,1 65,5
t1/2 B (min)	6,4	2,2	7,7	7,1	54,9	15,7 22
t1/2 A (min)	852	283	883	886	1732	9,47E+02 5,16E+02
VD (ml/kg)	4,99E+07	1,45E+08	4,96E+07	4,23E+07	7,05E+07	7,14E+07 4,22E+07
AUC ₀₋₃₀₀ min-DPM*min						
Conc.Ur.(DPM/ml)						
0 -2h	7,81E+07	NS	3,77E+07	NS	NS	
2-4h	8,16E+06	NS	1,92E+07	NS	NS	
4-24h	6,83E+04	3,66E+06	4,48E+04	1,72E+06	3,76E+07	
Vol.Urin.(ml)						
0 -2h	1,59	NS	1,75	NS	NS	
2-4h	2,7	NS	2,75	NS	NS	

4,24h	19,50	39,00	52,00	52,00	3,00	
C.Urin. (DPM)						
0 -2h	1,17E+08	0,00E+00	6,60E+07	0,00E+00	0,00E+00	
2-4	2,20E+07	0,00E+00	5,28E+07	0,00E+00	0,00E+00	
4-24H	1,33E+06	1,43E+08	2,33E+06	8,93E+07	1,13E+08	
total (DPM)	1,40E+08	1,43E+08	1,21E+08	8,93E+07	1,13E+08	
Cant.						
admin.(DPM)	1,50E+08	1,60E+08	1,58E+08	1,37E+08	1,51E+08	
Peso (kg)	0,3030	0,3016	0,3043	0,3185	0,3111	0,31
dosis (mg/kg)	1,12	1,19	1,17	0,97	1,09	1,11
% excretado	93,5	89,3	76,4	65,3	74,7	79,84
CL _{R(0inf)} (ml/min/kg)	8,8	3,2	7,7	6,4	4,3	6,10
CL _{R(0inf)} (ml/min/kg)	9,3	3,3	8	6,6	5,1	6,47
C.total (ml/min/kg)	9,5	3,6	10,1	9,8	5,8	7,75
dosis/AUC						2,36
NS: Sin muestras						2,9

TABLA VII
Tabla recapitulativa

	AcSDKP sin captopril	AcSDKP con captopril	AcSDKP NH₂ sin captopril	AcSDKP NH₂ con captopril	Inulina- ³H sin captopril	Inulina- ³H con captopril
% excretado	10	99	93	99	88	80
T ½ vida (min)	6,8	30,7	23,3	23,1	10,9 (α) 91,1(β)	15,7(α) 91,1(β)
Aclarac. Renal (ml/min/kg)	11,2	11,7	7,6	8,0	5,9	6,47
Aclarac. Total (ml/min/kg)	144,4	11,9	8,1	8,1	5,6	7,7

IV Conclusiones

Según los datos de la documentación pertinente, el aclaramiento renal en la rata está comprendido entre 5 y 10 ml/min/kg /Woods, 1998: 10 ml/min/kg - Lin, 1995: 8,07 ml/min/kg - Davies, 1993: 5,2 ml/min/kg).

Los porcentajes medios de inulina-³H encontrados en las orinas para los grupos testigos son del 88,44% (sin captopril) y de 79,84% (con captopril). Estos valores demuestran que (asumiendo los errores de medida), la inulina-³H es totalmente excretada y que su eliminación no se ha modificado por la administración de captopril. Las aclaraciones renales medias son de 5,90 ml/min/kg (sin captopril) y de 6,47 ml/min/kg (con captopril). Los grupos testigos validan el sistema utilizado (sistema animal).

Los porcentajes medios de AcSDKP encontrados en las orinas para los grupos n° 1 y n° 2 son del 7,86% (sin captopril) y del 97% (con captopril). Estos valores demuestran que el AcSDKP está protegido por el inhibidor de la enzima de conversión (el captopril) y que en ausencia de captopril, el AcSDKP es rápidamente degradado *in vivo*. Las aclaraciones renales medias son de 11,21 ml/min/kg (sin captopril) y de 11,67 ml/min/kg (con captopril).

Los porcentajes medios del AcSDKP-NH₂ encontrados en las orinas para los grupos n° 3 y n° 4 son del 92,67% (sin captopril) y del 98,76% (con captopril). No son pues modificados por la administración de captopril. El medio del área bajo la curva (AUC) del AcSDKP-NH₂ para el grupo tratado sin captopril es inferior en aproximadamente un 10% con relación al medio de la concentración plasmática del grupo tratado con el captopril (conviene observar que la dosis inyectada media para el grupo tratado en presencia de captopril es un 11% superior al grupo tratado sin captopril). Las aclaraciones renales medias son de 7,59 ml/min/kg (sin captopril) y de 8,03 ml/min/kg (con captopril). El tiempo medio de la ½ vida del péptido es de 23,3 minutos para el grupo tratado sin captopril y de 23,1 minutos para el grupo tratado con captopril.

A la vista de estos resultados, se puede concluir que el AcSDKP -NH₂ no es degradado *in vivo* en la rata ni por la ECA ni por otros sistemas enzimáticos y que es totalmente excretado por vía urinaria sin ser reabsorbido ni secretado. La curva de decrecimiento en función del tiempo, la media vida de eliminación y el aclaramiento urinario del AcSDKP -NH₂ no se ven influidos por la coadministración de captopril confirmando que el péptido no es degradado por la ECA *in vivo*.

La DFG medida después de administración de inulina-[³H] o de AcSDKP -NH₂ no difiere significativamente entre los diferentes grupos de ratas.

Ejemplo 2

Estudio comparativo de la degradación de dos péptidos in vitro en presencia de conversión en animales y humanos

5 Los péptidos (100 nM) se han incubado con un triturado de pulmón de rata (a 0,1 mg/ml) o de enzima de conversión humana (5 mU final) en presencia o no de captopril (10 μ M final) en tampón Tris/HCl 0,1 M + 0,3 mM de NaCl pH=7,5. Se ha realizado un testigo que comporta únicamente los péptidos en presencia de tampón Tris/HCl 0,1 M + 0,3 mM de NaCl pH=7,5.

10 Las incubaciones fueron: T₀ min - T₃₀ min - T₆₀ min - T₁₂₀ min - T₂₄₀ min (se realizó un tiempo de T₂₄ horas para el AcSDKP -NH₂).

Para parar la reacción, se realizó una extracción en metanol. A cada tiempo, la concentración del péptido no degradado fue medida por enzimo-inmunodosis.

15 Los resultados se expresan en porcentaje de péptido dosificado con relación al testigo por cada tiempo de toma de muestra.

TABLA VIII

20 *Resultados de la degradación in vitro del AcSDKP y del AcSDKP -NH₂ en presencia de ACE*

25 Tiempo de incubación (min)	AcSDKP	AcSDKP + captopril	AcSDKP - NH ₂	AcSDKP - NH ₂ + captopril
30 T ₃₀ min (1/1)	28 %	129 %	100 %	125 %
T ₆₀ min (1/1)	9 %	111 %	65 %	65 %
35 T ₁₂₀ min (1/1)	5 %	75 %	95 %	109 %
T ₂₄₀ min (1/1)	5 %	89 %	126 %	136 %

TABLA VIII

40 *Resultados de la degradación in vitro del AcSDKP y del AcSDKP -NH₂ en presencia de ACE*

45 Tiempo de incubación (min)	AcSDKP	AcSDKP + captopril	AcSDKP - NH ₂	AcSDKP - NH ₂ + captopril
50 T ₁₀ min (1/1)	82 %	90 %	79 %	90 %
T ₃₀ min (1/1)	75 %	100 %	100 %	162 %
T ₆₀ min (1/1)	50 %	85 %	116 %	78 %
55 T ₁₂₀ min (1/1)	25 %	85 %	116 %	95 %
T ₂₄₀ min (1/1)	7 %	100 %	107 %	104 %
60 T ₁₄₄₀ min (1/1)	-	-	86 %	117 %
- sin realizar				

65 Estos resultados muestran que el AcSDKP es degradado por la ECA de rata o de origen humano y que esta degradación está inhibida en presencia de captopril.

A la inversa, el AcSDKP -NH₂ no parece degradado por la enzima de conversión de rata o de origen humano. En efecto, las concentraciones encontradas son de 100 +/- 25%, es decir, en los límites de variabilidades de dosis.

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de análogos del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro, resistentes a la RCA, seleccionados en el grupo formado por los pseudopéptidos, en los que uno de los enlaces periódicos ha sido reemplazado por un grupo amino-metileno $\Psi(\text{CH}_2\text{-NH})$ y un péptido modificado en su extremo C-terminal por amidación, para la preparación de un reactivo o trazador adaptado a la medida del índice de filtración glomerular.

10 2. Utilización según la reivindicación, **caracterizada** porque los citados análogos presentan las fórmulas siguientes:

N-acetil-Ser ($\text{CH}_2\text{-NH}$)-ASP-Lys-Pro : S Ψ

N-acetil-Ser-Asp ($\text{CH}_2\text{-NH}$)-Lys-Pro : D Ψ

15 N-acetil-Ser-Asp-Lys ($\text{CH}_2\text{-NH}$)-Pro : K Ψ , y

N-acetil-Ser-Asp-Lys -Pro-NH₂

20 3. Utilización según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizada** porque el citado análogo está radio-marcado.

25 4. Kit o paquete de medida del índice de filtración glomerular, **caracterizado** porque comprende un análogo del N-acetil-Ser-Asp-Lys-Pro seleccionado de entre el grupo formado por N-acetil-Ser-($\text{CH}_2\text{-NH}$)-Asp-Lys-Pro (S Ψ), N-acetil-Ser-Asp ($\text{CH}_2\text{-NH}$)-Lys-Pro: D Ψ , N-acetil-Ser-Asp-Lys ($\text{CH}_2\text{-NH}$)-Pro : K Ψ , y N-acetil-Ser-Asp-Lys -Pro-NH₂ y un medio de detección de dicho análogo en al menos una muestra biológica.

30 5. Kit o paquete según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el medio de detección de dicho análogo es seleccionado del grupo formado por las inmunodosificaciones, las técnicas de cromatografía y/o de espectrometría de masas.

35 6. Kit o paquete según la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicho análogo está radiomarcado y dicho medio de detección se selecciona entre el grupo formado por las técnicas de creación de imágenes y las técnicas de conteo radioactivo.

40

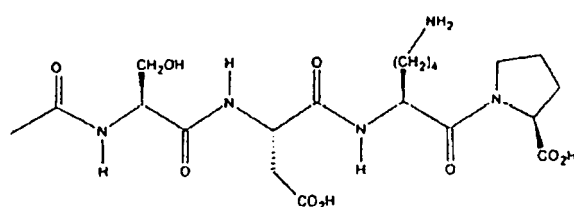
45

50

55

60

65



Acetilo	Ser (CO-NH)	Asp (CO-NH)	Lys (CO-N)	Pro	(AcSDKP)
Acetilo	Ser (<u>CH₂-NH</u>)	Asp	Lys	Pro	(SΨ)
Acetilo	Ser	Asp (<u>CH₂-NH</u>)	Lys	Pro	(DΨ)
Acetilo	Ser	Asp	Lys (<u>CH₂-N</u>)	Pro	(KΨ)
Acetilo	Ser	Asp	Lys	Pro-NH ₂	(AcSDKP-NH ₂)
Acetilo	Ser	oAsp	Lys	Pro	(AcSi ₁ DKP)

FIGURA 1

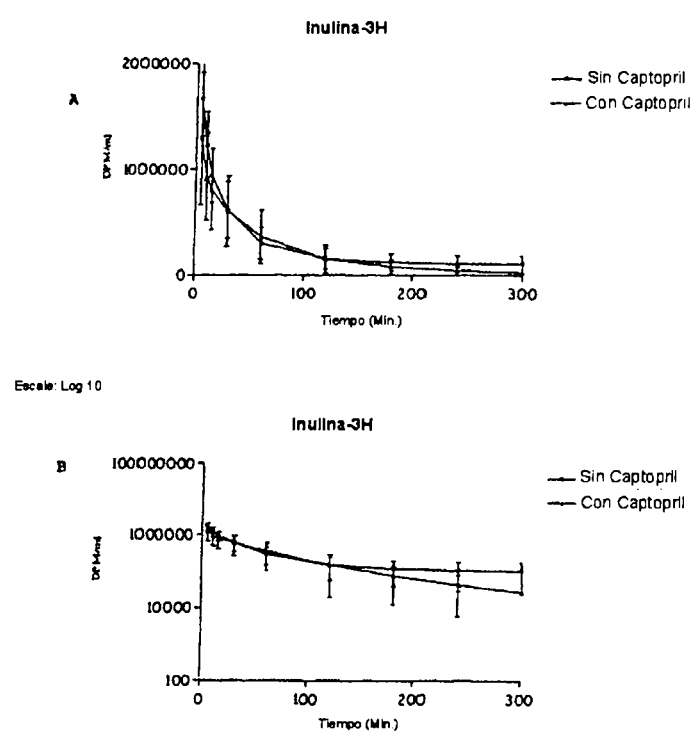


FIGURA 2

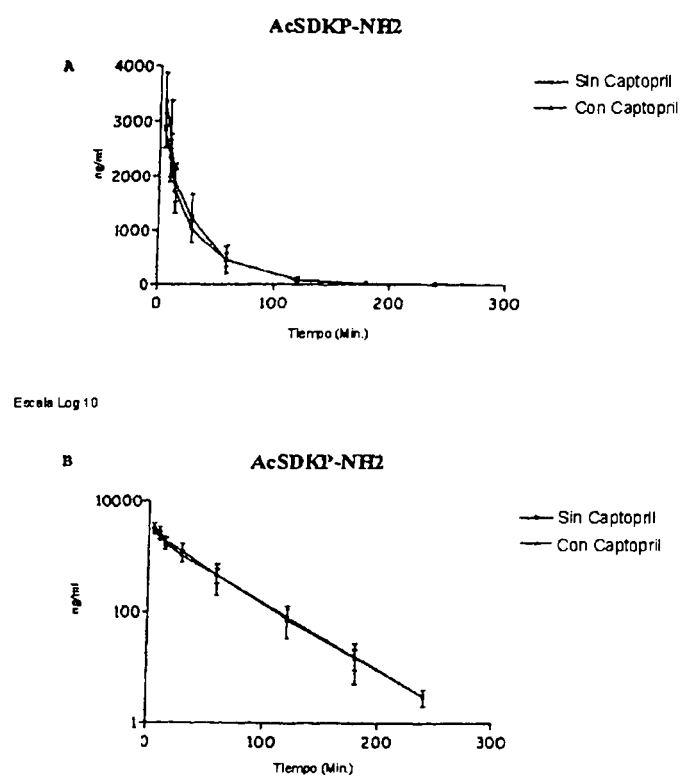


FIGURA 3

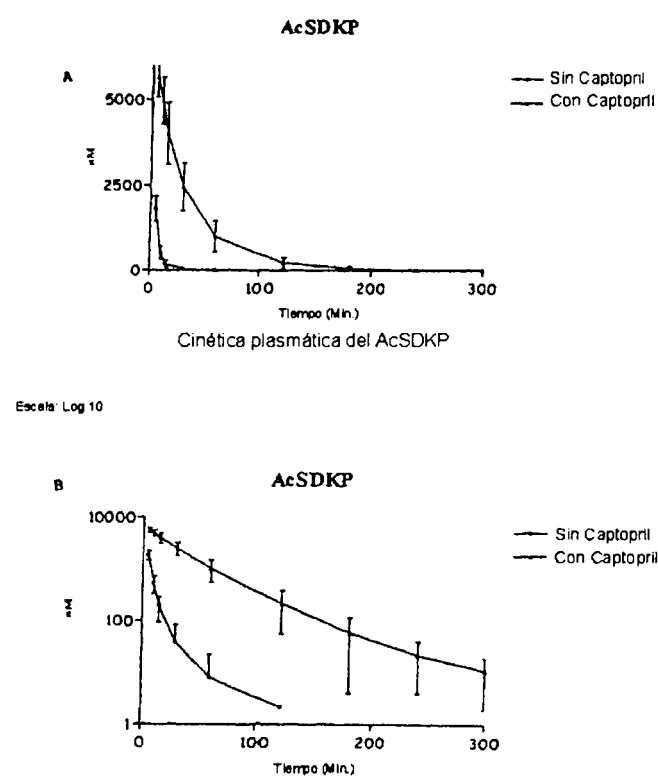


FIGURA 4