



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 991**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/23 (2006.01)

A61K 38/29 (2006.01)

A61K 31/59 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98912339 .3**

86 Fecha de presentación : **19.02.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1007566**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2000**

54

Título: **Uso terapéutico de la proteína SMR1 así como de los derivados activos de la misma.**

30

Prioridad: **20.02.1997 US 801405**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73

Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR

72

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

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 271 991 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

Uso terapéutico de la proteína SMR1 así como de los derivados activos de la misma.

5 **Antecedentes de la invención**(i) **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al uso terapéutico de una molécula de péptido derivada de los productos de maduración de SMR1 (proteína submandibular de rata 1).

(ii) **Descripción de la técnica relacionada**

15 El desequilibrio hidro-mineral intracelular o sistémico del cuerpo de un mamífero, y más específicamente del cuerpo humano es la causa de múltiples patologías que afectan al metabolismo y al comportamiento fisiológico de diversos órganos y tejidos, tales como huesos, riñones, paratiroides, páncreas, intestino, la mucosa glandular del estómago o la próstata, así como glándulas salivares.

20 En el cuerpo de un mamífero, el mantenimiento de las relaciones potasio/sodio y magnesio/calcio de las transmembranas es de una importancia fundamental en el control de la excitación celular y la regulación de muchos aspectos del metabolismo intracelular. Los tejidos más activos, tal como nervios, hígado y músculos tienen una relación mayor de potasio/sodio y magnesio/calcio que los tejidos inactivos, tales como la piel y los eritrocitos. Además, los tejidos más activos tienen un mayor contenido de fósforo que los tejidos inactivos, manteniendo el papel de ésteres de fosfato en el metabolismo de energía celular.

25 Un humano adulto contiene aproximadamente 1.000 g de calcio (Krane *et al.*, 1970). Sobre el 99% de este calcio está en el esqueleto en forma de hidroxiapatita, y el 1% está contenido en los fluidos extracelulares y tejidos blandos. Aproximadamente un 1% del contenido de calcio del esqueleto es libremente intercambiable con los fluidos extracelulares. Aunque pequeño como porcentaje del contenido del esqueleto, esta masa intercambiable es aproximadamente igual al contenido total de calcio en los fluidos extracelulares y tejidos blandos, y sirven como un tampón o depósito importante de calcio. Así, el calcio juega dos papeles fisiológicos predominantes en el organismo. En los huesos, las sales de calcio proporcionan la integridad estructural del esqueleto. En los fluidos extracelulares y en el citosol, la concentración de iones de calcio es de una importancia fundamental en el mantenimiento y el control de una serie de procesos bioquímicos, y las concentraciones de Ca^{2+} en los dos compartimentos se mantienen con gran constancia (Broadus, 1993). Otros iones minerales importantes tales como sodio, magnesio o fósforo están profundamente implicados en el equilibrio de iones minerales necesario para un buen metabolismo intra y extracelular. El término equilibrio de iones minerales se refiere al estado de homeostasis mineral en el organismo en relación con el ambiente. En equilibrio cero, la entrada y la adición mineral coinciden exactamente con las pérdidas minerales; en equilibrio positivo, la entrada y la adición mineral son mayores que las pérdidas minerales, y en equilibrio negativo, las pérdidas minerales son mayores que la entrada y la adición mineral. Bajo circunstancias normales la absorción neta de calcio proporciona un excedente de calcio que supera considerablemente los requerimientos sistémicos.

45 La masa extracelular de ortofosfato (aproximadamente 550 mg en humanos) está en equilibrio dinámico con la entrada y la salida de fósforo a través del intestino, huesos, riñones y tejidos blandos. En equilibrio cero, la absorción fraccional de fósforo neta es aproximadamente dos tercios de la entrada de fósforo. Esta cantidad representa un vasto exceso sobre los requerimientos sistémicos y se excreta de manera cuantitativa en la orina.

50 La masa extracelular de magnesio (aproximadamente 250 mg en humanos) está en equilibrio bidireccional con los flujos de magnesio a través del intestino, huesos, riñones y tejidos blandos. En equilibrio cero, el magnesio derivado de la absorción intestinal neta (aproximadamente 100 mg/día en humanos) representa un excedente sistémico y se excreta de manera cuantitativa.

55 Dos órganos están principalmente implicados en la absorción y la excreción de los diferentes iones minerales del cuerpo: 1) Mecanismos hormonales y/o intrínsecos de absorción de iones minerales en el intestino proporcionan al cuerpo un suministro mineral que supera las necesidades minerales sistémicas en una medida considerable; 2) el conducto renal juega el papel cuantitativo dominante en el mantenimiento de la homeostasis mineral normal.

60 Unos pocos metabolitos producidos de manera endógena ya han mostrado que participan de manera activa en el mantenimiento del equilibrio de iones minerales en el cuerpo.

65 La 1,25-dihidroxitamina D (también llamada calcitriol) es el único estímulo hormonal reconocido de absorción de calcio intestinal activa que se produce principalmente en el duodeno y el yeyuno (Lemann Jr J., 1993). En consecuencia, se produce una absorción de calcio intestinal neta reducida cuando la entrada de calcio alimenticio es limitada, cuando las concentraciones de suero de 1,25-dihidroxitamina D son bajas o cuando el intestino no responde a esta hormona. Por el contrario, se produce una absorción de calcio intestinal aumentada cuando las concentraciones de suero de 1,25-dihidroxitamina D son altas. Así, los defectos en la regulación de la concentración de 1,25-dihidroxitamina D en el suero pueden provocar desórdenes mayores que reducen o mejoran la absorción de calcio intestinal y provocan un estado patológico. La 1,25-dihidroxitamina D también influye en la entrada de fosfato al cuerpo.

ES 2 271 991 T3

Un segundo factor endógeno implicado en el equilibrio de iones minerales es la hormona paratiroides (PTH). La hormona paratiroides (PTH). La hormona paratiroides regula el nivel de calcio, y fosfato en la sangre modulando la actividad de las células específicas en los huesos y los riñones. Estas acciones sirven para: 1) estimular la reabsorción de calcio y fosfato de los huesos; 2) estimular la reabsorción de calcio e inhibir la reabsorción de fosfato del filtrado glomerular; y 3) estimular la síntesis renal de la 1,25-dihidroxitamina D, aumentando así la absorción intestinal de calcio y fosfato.

Un tercer factor endógeno que interviene en el equilibrio de los iones minerales es la calcitonina. La calcitonina (CT) es un péptido 32-amino-ácido que se secreta principalmente mediante las células C tiroideas (Deftos, 1993). Este efecto biológico principal es inhibir la resorción osteoclástica de los huesos. Esta propiedad ha llevado al uso de la CT para desórdenes caracterizados por una resorción de huesos aumentada, tal como la enfermedad de Pager, la osteoporosis y para la hipercalcemia de malignidad. La secreción de CT se regula plenamente mediante el calcio en la sangre y de manera crónica mediante el género y quizás la edad. La calcitonina se metaboliza mediante los riñones y el hígado. La secuencia de aminoácidos de la CT se conserva ampliamente a lo largo de la evolución, desde los peces a los mamíferos.

Los defectos en el equilibrio de los iones minerales son la causa de múltiples desórdenes que afecta a los huesos, los riñones, el intestino, el páncreas, los tejidos dentales (esmalte o marfil), o la mucosa estomacal.

Un desequilibrio de iones minerales afecta a la capacidad de remodelación de los huesos, que provoca desórdenes tales como osteoporosis o afecta a la capacidad de resorción de los huesos, tal como en la enfermedad de hiperparatiroidismo. El sistema de remodelación ósea se ha caracterizado en numerosas publicaciones en el pasado reciente (Parfitt, 1986). La remodelación ósea se produce en superficies óseas trabeculares o Harvesian. La primera etapa es la activación de los precursores de osteoclastos para formar osteoclastos que a continuación empiezan a excavar una cavidad sobre una superficie. Después de la retirada de los tejidos óseos (0,05 mm³ aproximadamente), el lugar permanece quiescente durante un corto periodo de tiempo, después de lo cual se produce la activación de los precursores de los osteoblastos en el lugar y se rellena la excavación. Este proceso sirve para varias funciones, entre las mismas la retirada del tejido óseo envejecido y microdañado y la redistribución de la arquitectura ósea para satisfacer las necesidades de soporte mecánico. Con el uso diario normal del esqueleto, la pérdida ósea, la acumulación anormal de microdaños, o los errores en la geometría solamente pueden ocurrir solamente a través de defectos en este sistema, por ejemplo un defecto en el equilibrio de iones minerales. La osteoporosis es un asunto de salud pública importante y, en consecuencia, hay una gran necesidad de nuevas moléculas terapéuticas que serán capaces de regular el equilibrio de iones minerales en el cuerpo y, si es posible, más eficientes y más selectivas (específicas para el objetivo) que las moléculas actuales usadas en la terapia, tales como oestrógeno y calcitonina. Otras enfermedades de absorción o resorción ósea puede estar causadas por defectos en el metabolismo de iones minerales renal o gastrointestinal, tal como osteodistrofia o incluso provocadas por una insuficiencia pancreática.

El hiperparatiroidismo primario en una causa muy común de hipercalcemia, con estimaciones de incidencia tan altas como de 1 de cada 500 a 1 de cada 1000 (Bilezikian, 1990). El hiperparatiroidismo es una hipercalcemia que se produce en asociación con niveles elevados de hormona paratiroide, a menudo provocado por un adenoma solitario benigno.

La hipercalcemia puede ser el resultado de otros desórdenes diferentes, tales como síndromes hiperparatiroides familiares (Szabo J. *et al.*, 1993), hipercalcemia hipocalciúrica familiar (Marx S.J., 1993), hipercalcemia debido a estados malignos (Stewart A.F., 1993; Mundy G.R., 1993) o debido a desórdenes que forman granulomas (Adams, J.S., 1993).

Por otro lado, los defectos en el equilibrio de iones minerales pueden provocar hipercalcemia que se encuentran en enfermedades asociadas con una baja concentración de albúmina en suero o también con hipoparatiroidismo idiopático. La propia hipocalcemia a veces es debida a hipomagnesemia o hiperfosfatemia, o a una secreción reducida de la hormona paratiroide (Shane E., 1993) o también a desórdenes de vitamina D (Insogna K.L., 1993).

Los tejidos dentales también pueden estar afectados en el caso de un defecto en la mineralización y formación del marfil y esmalte dental. El páncreas es también un órgano muy sensible a un defecto en el equilibrio iónico mineral, que puede provocar una inflamación llamada pancreatitis. Incluso la glándula submandibular puede verse afectada, provocando un estado patológico de litiasis que está asociada con depósitos de calcio. El riñón también puede verse afectado, provocando el desarrollo de nefrolitiasis.

De la misma manera, la acumulación de aluminio en pacientes urémicos está asociada con una enfermedad ósea, que se caracteriza por una formación ósea reducida que provoca osteodistrofia (Sherrard *et al.*, 1988).

Otros dos problemas de preocupación de la salud pública son respectivamente una hipercalcemia resultante de medicaciones (Stewart, 1993) y los síndromes de resistencia de hormona paratiroide (Levine, 1993).

Debido a los múltiples desórdenes provocados por una disminución o un aumento del metabolismo iónico mineral (principalmente iones de calcio, magnesio, fósforo o aluminio) y el número muy pequeño de moléculas que son, hasta la fecha, de valor terapéutico en la prevención o en el tratamiento de los estados patológicos descritos anteriormente,

existe una gran necesidad pública de nuevas moléculas activas que sean capaces de regular las concentraciones iónicas minerales en el interior del cuerpo.

Los inventores han caracterizado previamente una nueva proteína de glándula submandibular de rata, llamada SMR1 (proteína submandibular de rata 1), que tiene la estructura de una prohormona y cuya síntesis es bajo control andrógeno (Rosinsky-Chupin *et al.*, 1988 y solicitud de patente PCT W/O 90/03981). El gen que codifica la SMR1 pertenece a una nueva familia multigénica, la familia VCS, que se ha localizado en el cromosoma 14, bandas p21-p22 (Courty *et al.*, 1996; Rosinsky-Chupin *et al.*, 1995) y para el que se ha caracterizado el gen humano contrapuesto. El gen tiene una organización similar a una serie de genes precursores de hormonas (Rosinsky-Chupin *et al.*, 1990). SMR1 ARNm se expresa de una manera muy específica del tejido, edad y sexo en las células acinares de la glándula submaxilar (SMG) de rata macho y en la próstata (Rosinsky-Chupin *et al.*, 1993).

Se ha descrito que, en vivo, la SMR1 se procesa de manera selectiva en pares de sitios aminoácidos básicos de una manera específica del tejido y el sexo para producir productos péptidos maduros, de una manera similar a la trayectoria de maduración de los precursores de hormonas péptidas (Rougeot *et al.*, 1994). Generalmente, esta fragmentación proteolítica selectiva se ha mostrado que es crítica para la generación de péptidos biológicamente activos (Lindberg *et al.*, 1991; Steiner *et al.*, 1992). La biosíntesis de los péptidos generados a partir de SMR1 o a partir de su contrapuesto humano mediante división en pares de residuos de arginina, por ejemplo el undecapéptido: VRGPRRQHNPR; el hexapéptido: RQHNPR; y el pentapéptido: QHNPR, está sometida a trayectorias reguladoras distintas dependiendo de 1) el órgano: SMG y próstata, 2) la etapa de desarrollo: a partir de 6 semanas después del nacimiento, 3) el sexo: predominantemente en el macho, y 4) hormonas de las gónadas: los andrógenos. Además, en vivo, los péptidos maduros que se acumulan en la SMG de la rata macho, se exportan al espacio extracelular en respuesta a un estímulo externo específico y, de esta manera se transportan a los fluidos salivares y sanguíneos (Rougeot *et al.*, 1993). El hecho de que estos péptidos se producen principalmente en las ratas macho postpubescentes y se segregan a la saliva y la sangre bajo condiciones estimuladas, lleva a postular que tienen un papel fisiológico local y sistémico en la mediación de algunas características de comportamiento específicamente en los machos, pero este papel era totalmente desconocido.

Descripción y objetivos de la invención

Los inventores han descubierto ahora que los productos de maduración de la proteína SMR1, específicamente un péptido de fórmula estructural XQHNPR reconocen sitios objetivo específicos en órganos que están profundamente implicados en la concentración de iones minerales. Este descubrimiento han llevado a los inventores a asignar al pentapéptido, hexapéptido o undecapéptido de SMR1 un papel activo en la regulación de las concentraciones de iones metálicos en los fluidos y tejidos corporales, y así un papel terapéutico de estos péptidos en todos los desórdenes metabólicos relacionados con un desequilibrio de iones minerales.

Así, la presente invención se refiere al uso terapéutico del péptido de fórmula estructural XQHNPR en el que X indica un átomo de hidrógeno o X representa una cadena de aminoácido elegida entre las siguientes: X = V o X = VR o X = VRG o X = VRGP o X = VRGPR o X = VRGPRR, para evitar o tratar enfermedades provocadas por un desequilibrio de iones minerales en un mamífero, específicamente en humanos.

Más particularmente, un objetivo de la presente invención es el uso de los péptidos terapéuticos descritos anteriormente para el tratamiento de desórdenes de los huesos, dientes, renales, riñones, intestino, páncreas, mucosa del estómago o paratiroides provocados principalmente por un desequilibrio de iones minerales en los fluidos o tejidos del cuerpo.

En consecuencia, los péptidos terapéuticos según la presente invención se usan para evitar o tratar enfermedades como el hiper o el hipotiroidismo, la osteoporosis, la pancreatitis, la litiasis glandular submandibular, la nefrolitiasis o la osteodistrofia.

El descubrimiento de la actividad terapéutica de la proteína SMR1 y sus péptidos derivados, así como sus objetivos fisiológicos in vivo han permitido a los inventores diseñar nuevas moléculas que se pueden considerar como derivados biológicamente activos de los péptidos terapéuticos descritos anteriormente.

Estos derivados biológicamente activos de los péptidos terapéuticos según la invención son péptidos que están estructural y químicamente relacionados con el XQHNPR, tal como péptidos que tienen la misma secuencia de aminoácidos que los péptidos iniciales pero que contienen uno o más aminoácidos modificados que pueden conferir una mejor estabilidad in vivo a la molécula terapéuticamente activa y que posee la misma actividad biológica que el péptido endógeno o que se comporta como una molécula antagonista del péptido endógeno.

Así, el uso terapéutico de los péptidos que son homólogos al péptido XQHNPR es también parte de la presente invención. Mediante péptido homólogo según la presente invención se indica un péptido que contiene una o varias sustituciones de aminoácido en la secuencia XQHNPR. La sustitución de aminoácido consiste en el reemplazo de uno o más aminoácidos consecutivos o no consecutivos mediante aminoácidos "equivalentes". La expresión aminoácido "equivalente" se usa aquí para indicar cualquier aminoácido que se puede sustituir por uno de los aminoácidos que pertenecen a la estructura del péptido inicial sin modificar las propiedades de hidrofiliicidad y el objetivo biológico de la estructura del péptido inicial. Preferiblemente, los péptidos que contienen uno o varios aminoácidos "equivalen-

tes” retienen sus propiedades de especificidad y afinidad en los objetivos biológicos del péptido XQHNPR. En otras palabras, los aminoácidos “equivalentes” son aquellos que permiten la generación o la obtención de un polipéptido o péptido con una secuencia modificada respecto a la XQHNPR, siendo capaz dicho polipéptido o péptido modificado de actuar como un agonista o una molécula antagonista del péptido XQHNPR.

5

Estos aminoácidos equivalentes se pueden determinar mediante su homología estructural con los aminoácidos iniciales que se han de reemplazar y mediante su actividad biológica sobre las células objetivo del péptido XQHNPR.

Como ejemplo ilustrativo, debe mencionarse la posibilidad de realizar sustituciones como, por ejemplo, leucina por valina o isoleucina, ácido aspártico por ácido glutámico, glutamina por asparagina, arginina por lisina, etc., entendiéndose que las sustituciones inversas están permitidas en las mismas condiciones.

Mediante aminoácido modificado según la presente invención también se indica el reemplazo de un residuo en la forma L por un residuo en la forma D o el reemplazo del residuo de glutamina (Q) por un compuesto de ácido Pyroglutámico. La síntesis de los péptidos que contienen por lo menos un residuo en la forma D se describe, por ejemplo, por Koch *et al.* en 1977.

15

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Autorradiografías de cuerpo entero representativas de una rata macho de cinco semanas de vida, 60 minutos después de inyección i.v. de pentapéptido ^3H derivado de SMR1 ($2\ \mu\text{g}$ o $3\ \text{nmoles}/100\ \text{g}$ de peso corporal). A: sección sagital lateral, y B: sección media sagital.

Las secciones de $20\ \mu\text{m}$ se expusieron durante 15 días con hiperfilm 3H. Las zonas negras corresponden a una alta retención de radiactividad. La mayor concentración de granos de plata se aprecia en la medular renal externa, la mucosa glandular gástrica, los lóbulos pancreático y submandibular, así como en los tejidos óseos visibles (base del cráneo, costilla, vértebras y extremidad) y el tejido dental.

25

Figura 2. Mapeado representativo de los órganos objetivo para pentapéptido ^3H derivado de SMR1 usando el generador de imágenes de β -radio de alta resolución.

30

A: sección sagital media, y B: sección sagital lateral de todo el cuerpo de la rata, 60 minutos después de la inyección de $3\ \text{nmoles}$ o $2\ \mu\text{g}$ de péptido tritiado.

Las secciones de $20\ \mu\text{m}$ se expusieron durante 8 horas. Las zonas rojas corresponden a una alta retención de radiactividad. La mayor concentración de radiactividad se aprecia en la medular externa renal, la mucosa glandular gástrica, los lóbulos pancreático y submandibular, así como en los tejidos óseos visibles (base del cráneo, costilla, vértebra y extremidad) y el tejido dental.

35

Figura 3. Perfil cuantitativo de radiactividad en varios tejidos después de la administración de $2\ \mu\text{g}$ o $3\ \text{nmoles}$ de pentapéptido ^3H (QHNPR), 60 minutos después de la dosis. Se determinó la cuantificación directa usando el generador de imágenes de β -radio en secciones sagitales de todo el cuerpo. El número de partículas β emitidas por área se contó durante 8 horas, y se expresó en cuentas/ mm^2 . La determinación de las diferencias regionales cuantitativas se realizó con análisis de imagen ayudado con ordenador usando el programa de visión β . Las barras representan medio \pm SD de las determinaciones triplicadas a partir de la misma estructura y dos secciones de todo el cuerpo.

40

Figura 4. Perfil cuantitativo de radiactividad en varios tejidos después de la administración de $100\ \text{pmoles}$ de hexapéptido ^3H , 60 minutos después de la dosis o más $100\ \text{nmoles}$ de péptido no marcado en unión específica.

La cuantificación se determinó usando un espectrómetro y se calculó como cpm/mg de proteína a partir de todos los extractos del tejido.

50

Figura 5. Perfil cuantitativo de radiactividad en varios tejidos después de la administración de $5\ \text{pmoles}$ de undecapéptido ^{125}I (VRGPRRQHNPR), 10 minutos después de la dosis o más de $100\ \text{nmoles}$ de péptido no marcado en unión no específica.

55

La cuantificación se determinó usando un espectrómetro gamma y se calculó como cpm/g de tejido.

Figura 6. Perfil representativo del transcurso del tiempo de niveles de plasma de pentapéptido derivado de SMR1, en ratas macho, después de una sola inyección intravenosa de $110\ \text{ng}$ de pentapéptido tritiado.

60

La fracción de péptido libre de plasma se midió después de purificación RP porapak Q (valores son media \pm SD de 2 ratas) y la fracción de pentapéptido libre después de cromatografía RP HPLC, tal como se describe en “materiales y procedimientos”.

65

Figura 7. Fotomicrografía sobre campo claro de autorradiografía de retención celular de pentapéptido ^3H en vivo en secciones de varios órganos, incluyendo A: médula externa del riñón, B: mucosa gástrica glandular, C: lóbulos pancreáticos, D: raíz de incisivo superior, E: hueso vertebral, F: hueso largo proximal tibia.

ES 2 271 991 T3

Las imágenes sobre campo claro representan secciones de 5 μm de radiomarcaje. 60 minutos después de la inyección de concentraciones fisiológicas de péptido tritiado (160 ng). Las secciones se tiñeron con azul de hematoxilina y toluidina para verificar los detalles microanatómicos y se fotografió con una magnificación de impresión final de 400X (A, B, D, E, F) y 600X (C).

5
Figura 8. A: Mapeado de la distribución renal de pentapéptido ^3H usando el generador de imágenes de radio β de alta resolución. Radiomarcado *en vivo*, 60 minutos después de la inyección de concentraciones fisiológicas de péptido tritiado (160 ng) (A-1), o más exceso 100-pliegue de péptido no marcado en unión no específica (A-2). Las secciones de 5 μm se expusieron durante 50 horas. La zona blanca corresponde a la mayor concentración de radiactividad.

10
B: Cuantificación de radiactividad en el riñón después de 60 minutos de la administración de concentraciones fisiológicas de pentapéptido ^3H *en vivo* o más un exceso de 100-pliegue de péptido correspondiente no marcado.

15
El contenido de radiactividad se midió directamente con un espectrómetro β y se calculó como cpm/mg de proteína a partir de todas las secciones de 20 μm de tejido (B-2) o a partir de todos los extractos de tejido (B-1) o con un generador de imágenes de radio β y calculado como cuenta X100/ mm^2 a partir de secciones de 5 μm (B-3-1). La determinación de las diferencias regionales cuantitativas se realizó con un análisis de imagen ayudada por ordenador usando el programa de visión β . (B-3-2 y B-3-3).

20
Figura 9: perfil cuantitativo de radiactividad de diferentes fracciones de preparaciones de la membrana de la médula externa del riñón.

Figura 10: Isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas de la membrana de la médula externa del riñón solubilizada con SB14 1% y SB201 1 M.

25
Figura 11: Tamiz molecular (Superdex 200) de las fracciones resultantes del isoelectroenfoque de preparaciones de la membrana solubilizadas de la médula externa del riñón.

Figura 12: Perfil de cromatografía correspondiente a la figura 10 con una densidad óptica en 274 nm, y resultante del fraccionamiento a 0,75 ml/min.

Fracciones de isoelectroenfoque de las preparaciones de membrana solubilizada de la médula externa del riñón.

Figura 13: Calibración del Superdex 200.

35
Figura 14: Cromatografía de líquido de fase inversa FPLC C_{18} (Rep RPC, Pharmacia).

Fracciones IEF de preparaciones de membrana de médula externa de riñón.

40
Figura 15: Perfiles de cromatografía FPLC RP-18 de radiactividad, densidad óptica a 280 nm, concentración de acetonitrilo y fraccionamiento a 0,75 ml/min.

Cromatograma representativo de fracciones IEF de preparaciones de membrana solubilizada de médula externa de riñón.

45
Figura 16: Perfil de isoelectroenfoque preparativo de preparaciones de membrana solubilizadas en SB14/SB201 de médula externa de riñón.

Figura 17: Preparaciones de membrana de lóbulos pancreáticos solubilizadas en SB14/SB201.

50
Figura 18: IEF de preparaciones de membrana de mucosa gástrica glandular solubilizada en SB14/SB201.

Figura 19: IEF de preparaciones de membrana de matriz trabecular ósea solubilizada en SB14/SB201.

55
Figura 20: IEF de proteínas de membrana de matriz dental solubilizada en SB14/SB201.

Figura 21: Tamiz molecular (Superdex 200) de fracciones citosólicas y de membrana de médula externa de riñón solubilizada en detergente.

60
Figura 22: Perfiles de cromatografía correspondientes a la figura 21 de OD a 274 nm y fraccionamiento a 0,75 ml/min.

A: fracción de membrana solubilizada

65
B: fracción citosólica de médula externa de riñón

Figura 23: Perfil de tamiz molecular (Superdex 200) de fracciones de membrana pancreática solubilizadas en SB14/SB201.

ES 2 271 991 T3

Figura 24: Perfil de tamiz molecular (Superdex 200) de proteínas de membrana de mucosa gástrica glandular solubilizada en SB14/SB201.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

5 Los péptidos usados según la presente invención se pueden preparar de una manera convencional mediante síntesis de péptido en fase líquida o sólida mediante acoplamientos sucesivos de los diferentes residuos de aminoácidos que se incorporan (a partir del extremo N-terminal al extremo C-terminal en fase líquida, o a partir del extremo C-terminal al extremo N-terminal en fase sólida) en donde los extremos N-terminal y las cadenas laterales reactivas están
10 previamente bloqueadas por grupos convencionales.

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

15 Para producir una cadena de péptido usando el proceso Merrifield, se usa un polímero de resina muy porosa, sobre el que se fija el primer aminoácido C-terminal de la cadena. Este aminoácido se fija a la resina mediante sus grupos carboxil y se protege su función amina, por ejemplo, mediante el grupo t-butiloxicarbonil.

20 Cuando el primer aminoácido C-terminal se fija así a la resina, el grupo de protección se retira de la función amina lavando la resina con un ácido. Si el grupo de protección para la función amina es el grupo t-butiloxicarbonil, se puede eliminar tratando la resina con ácido trifluoroacético.

25 El segundo aminoácido que suple el segundo residuo de la secuencia deseada se acopla a continuación a la función amina desprotegida del primer aminoácido terminal-C fijado a la cadena. Preferiblemente, la función carboxil de este segundo aminoácido se activa, por ejemplo, usando dicitclohexilcarbodiimida, y la función amina se protege, por ejemplo, usando t-butiloxicarbonil.

30 De esta manera, se obtiene la primera parte de la cadena de péptido deseado, que comprende dos aminoácidos, cuya función de amina terminal se protege. Como antes, la función amina se desprotege y el tercer residuo se puede fijar a continuación, bajo similares condiciones, a las usadas en la adición del segundo aminoácido terminal-C.

Así, se fijan los aminoácidos que son para formar la cadena de péptido, uno después del otro, al grupo amina, que cada vez se desprotege previamente, a la porción de la cadena de péptido ya formada, que se fija a la resina.

35 Cuando está formada toda la cadena de péptido deseada, se eliminan los grupos protectores a partir de los diferentes aminoácidos que constituyen la cadena de péptido y el péptido se separa de la resina, por ejemplo usando ácido hidrofúónico.

40 Los péptidos así sintetizados también pueden ser un polímero del péptido XQHNPR, que contiene de 2 a 20 unidades de monómero de la secuencia de aminoácido XQHNPE, preferiblemente de 4 a 15 unidades de monómero y más preferiblemente de 5 a 10 unidades de monómero. Los polímeros se pueden obtener mediante la técnica de Merrifield o cualquier otro procedimiento de síntesis de polímero de péptido convencional bien conocido por un experto en la materia.

45 Los péptidos así obtenidos se pueden purificar, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, tal como HPLC de fase inversa y/o intercambio catiónico, tal como describe Rougeot *et al.* en 1994.

50 Los péptidos usados en el procedimiento terapéutico según la presente invención también se puede obtener usando procedimientos de ingeniería genética. La secuencia de ácido nucleico del ADNc que codifica la proteína SMR1 de aminoácido 146 completa se ha descrito en la solicitud de patente PCT WO 90/03891 (Rougeon *et al.*). Para los derivados de péptido biológicamente activos del XQHNPR, un experto en la materia se referirá a la literatura general para determinar que codones adecuados se pueden usar para sintetizar el péptido deseado.

55 Para la expresión genética del péptido XQHNPR, se puede usar la siguiente secuencia de nucleótido, basada en el uso general del codón en mamíferos:

Péptido	V	R	G	P	R	R	Q	H	N	P
RDNAGTC	AGA	GGC	CCA	AGA	AGA	CAA	CAT	AAT	CCT	AGA

60 o una secuencia híbrida con la secuencia anterior bajo condiciones astringentes y que codifica un péptido que tiene cualitativamente la misma actividad de regulación de iones minerales que el péptido QHNPR.

Mediante condiciones de hibridación astringente según la presente invención, se indican las siguientes condiciones:

65 La etapa de hibridación se realiza a 65°C en presencia de 6 x SSC, solución 5 x Denhardt, 0,5% SDS y 100 µg/ml de ADN de espermatozoos de salmón. Las etapas de lavado consisten en:

ES 2 271 991 T3

- lavar dos veces durante 5 minutos a 65°C en un tampón de 2 x SSC y 0,1% SDS;

- lavar una vez durante 30 minutos a 65°C en un tampón de 2 x SSC y 0,1% SDS;

5 - lavar una vez durante 10 minutos a 65°C en 0,1 x SSC y 0,1% SDS.

La expresión del polinucleótido que codifica el XQHNPR se puede optimizar, según el organismo en el que la secuencia se ha de expresar y el uso del codón específico de este organismo (mamífero, planta, bacteria, etc.). Para las bacterias y las plantas, respectivamente, los usos del codón general se pueden encontrar en la solicitud de Patente Europea EP-0 359 472 (Mycogen).

Ahora es fácil producir proteínas en altas cantidades mediante técnicas de ingeniería genética usando, como vectores de expresión, plásmidos, fagos o fagémidos. Los nucleótidos que se codifican para los polipéptidos de la presente invención se insertan en un vector de expresión apropiada para producir el polipéptido de interés *in vitro*. En consecuencia, la presente invención también abarca la producción mediante técnicas de ingeniería genética de la proteína SMR1 o uno de sus productos de maduración. La proteína SMR1 (que se puede considerar como el precursor de los diferentes productos de maduración) se procesa mediante furina. La furina es una convertasa a modo de subtilisina implicada en el procesamiento endoproteolítico de postranslación de varias pro-hormonas. Así, la furina puede usarse ventajosamente en combinación con un precursor del péptido XQHNPR para obtener el correspondiente producto de maduración.

Así, un procedimiento para la producción de la proteína SMR1 o uno de sus productos de maduración tal como un péptido XQHNPR de la invención, o también un péptido que contiene aminoácidos "equivalentes" tal como se ha descrito anteriormente comprende las etapas de:

25 a) amplificar opcionalmente el ácido nucleico que se codifica para el polipéptido deseado usando un par de iniciadores específicos para la SMR1 genómica o secuencia de ADNc (mediante SDA, TAS, 3SR NASBA, TMA, LCR, RCR, CPR, replicasa Q-beta o PCR);

30 b) insertar el ácido nucleico que se codifica para la proteína SMR1 de interés en un vector apropiado;

c) insertar el ácido nucleico que se codifica para la furina en un vector adecuado, siendo dicho vector el vector de la etapa b) o siendo dicho vector un vector diferente del vector de la etapa b);

35 d) cultivar, en un medio de cultivo apropiado desprovisto de suero, una célula hospedadora previamente transformada o transfectada con el vector recombinante de la etapa b) o c);

40 e) cosechar el medio de cultivo así acondicionado y la célula hospedadora, por ejemplo lisando la célula hospedadora mediante sonicación o mediante choque osmótico;

f) separar o purificar, a partir del medio de cultivo, o a partir del pellet de la célula hospedadora lisada resultante, el polipéptido de interés así producido;

45 g) caracterizar el péptido de interés producido;

h) opcionalmente ensayar para el reconocimiento específico del péptido mediante un anticuerpo policlonal o monoclonal dirigido contra el péptido XQHNPR, específicamente contra el péptido QHNPR.

Un vector adecuado para la expresión de la proteína SMR1 y la proteína de convertasa definida anteriormente se usa para transfectar la línea de célula SF9 (ATCC N°CRL 1711) que se deriva de la *Spodoptera frugiperda*.

Otro vector adecuado para realizar el proceso descrito anteriormente es un vector de virus de vacuna. En esta realización específica, se usan BSC-40 o LoVo para las etapas de transfección y cultivo.

La purificación de la proteína recombinante se puede realizar mediante el paso sobre una columna de cromatografía de afinidad de níquel o cobre. La columna de cromatografía de níquel puede contener la resina Ni-NTA (Porta *et al.*, 1975).

60 La reacción de amplificación PRC fue descrita por Saiki *et al.* en 1985; la técnica SDA fue descrita por Walter *et al.* en 1992 y fue mejorada por Spargo *et al.* en 1996; la reacción de amplificación TAS fue descrita por Kwok *et al.* en 1989; la técnica 3SR fue descrita por Guatelli *et al.* en 1990; la técnica NASBA fue descrita por Kievitis *et al.* en 1991; la reacción LCR fue descrita por Landergen en 1991 y fue mejorada por Barany *et al.* en 1991; la técnica RCR fue descrita por Segev en 1992; la técnica CPR fue descrita por Duck *et al.* en 1990.

Ref Co-transfección con convertasa.XXX

Los péptidos producidos mediante procedimientos de ingeniería genética según la invención se pueden caracterizar por unirse sobre una columna de cromatografía de inmunoafinidad sobre la que se han inmovilizado previamente anticuerpos policlonales o monoclonales dirigidos a XQHNPR.

Más preferiblemente, el péptido de valor terapéutico contenido en las composiciones terapéuticas según la presente invención se purifica mediante HPLC tal como se describió por parte de Rougeot *et al.* en 1994. La razón para preferir este tipo de purificación del péptido o proteína es la falta de productos laterales encontrados en las muestras de elución.

Los anticuerpos se pueden preparar a partir de hibridomas según la técnica descrita por Kohler y Milstein en 1975. Los anticuerpos policlonales se pueden preparar mediante inmunización de un mamífero, especialmente un ratón o un conejo, con un péptido según la invención que se combina con un adyuvante de inmunidad, y a continuación mediante la purificación de los anticuerpos específicos contenidos en el suero del animal inmunizado sobre una columna de cromatografía de afinidad sobre la que se ha inmovilizado previamente el péptido que se ha usado como antígeno. Una técnica para preparar y usar una columna de cromatografía de inmunoafinidad fue descrita, por ejemplo, por Bird *et al.* en 1984.

Una realización preferida para preparar anticuerpos que se enfrentan contra la proteína SMR1 o sus productos de maduración se describe a continuación, usando el pentapéptido QHNPR como ejemplo. Brevemente, el péptido QHNPR se conjuga a albúmina de huevo (Calbiochem) usando el procedimiento de benzidina-bis-diazotada descrito por Gregory *et al.* en 1967, siendo la relación de residuos de péptido respecto a una molécula de ovalbúmina de 5:1. Se inyectan conejos en tiempo 0 con 1 mg del péptido conjugado. Dos meses después de la primera inyección, los animales son inyectados con 0,5 mg de péptido conjugado y se realiza una tercera inyección de 0,5 mg del mismo péptido entre dos y cuatro meses después de la segunda inyección. Se cosecha antisuero entre dos y cuatro semanas después de la tercera inyección de péptido conjugado y opcionalmente se purifica sobre una columna de cromatografía de afinidad tal como se ha descrito previamente. Preferiblemente, la inyección es una inyección en múltiples puntos intradérmica; generalmente se realizan diez puntos de inyección.

Otros derivados biológicamente activos de los péptidos terapéuticos de la invención consisten en moléculas que están estructural y/o químicamente no relacionadas con los péptidos endógenos, pero están vinculadas a los mismos objetivos específicos y tiene una actividad agonista o antagonista. Preferiblemente, los derivados biológicamente activos de los péptidos terapéuticos usados en el procedimiento terapéutico de la presente invención están dotados de una vida media *in vivo* más larga que sus homólogos endógenos naturales.

Los procedimientos que permiten a un técnico en la materia seleccionar y purificar los derivados biológicamente activos que se unen a los mismos objetivos y tienen una actividad biológica agonista o antagonista del péptido XQHNPR de la invención se describen a continuación.

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

La selección de los derivados biológicamente activos del péptido XQHNPR de la invención se realiza en el cálculo de la unión de una molécula de ligando candidata a las células o a los órganos objetivo conocidos del péptido XQHNPR, específicamente el pentapéptido QHNPR, y en la determinación de los cambios metabólicos inducidos por esta molécula candidata sobre su objetivo, tal como la síntesis de los metabolitos mensajeros primarios o secundarios como resultado de una señal de transducción a través de las quinasas de proteína o ciclasa de adenilato y la activación de una proteína de la familia G.

La unión de la molécula candidata con las células de cultivo primarias, establecida por líneas celulares o muestras de tejido frescas (criosecciones o cortes) se realiza tal como se describe a continuación.

Los ensayos de la unión de la molécula candidata se realiza generalmente a una temperatura fría (4°C). Sin embargo, las variaciones del procedimiento estándar descrito a continuación que implica incubación a 37°C son útiles para calcular la internalización y el destino del pentapéptido o una molécula de ligando candidata derivada biológicamente activa al unirse con la superficie de la célula (Wakefield, 1987). Para facilitar la lectura del protocolo descrito a partir de ahora, se usa el pentapéptido QHNPR en un lugar de una molécula candidata derivada biológicamente activa.

* En consecuencia, un objetivo de la presente invención es un procedimiento para tamizar moléculas de ligando que se unen específicamente al receptor objetivo para el pentapéptido XQHNPR, que comprende las etapas de:

a) preparar un cultivo de células objetivo monocapa confluyente o preparar un espécimen de órgano objetivo o una muestra tejido;

b) añadir la molécula candidata que se ha de probar en competición con una concentración medio saturada de pentapéptido marcado;

ES 2 271 991 T3

c) incubar el cultivo de células, el espécimen del órgano o la muestra de tejido de la etapa a) en presencia de la molécula candidata marcada durante un tiempo suficiente para que se realice la unión específica;

5 d) cuantificar el objetivo específicamente unido al cultivo de células objetivo, el espécimen del órgano o la muestra de tejido.

* Otro objetivo de la presente invención es un procedimiento para determinar la afinidad de las moléculas de ligando que se unen específicamente al receptor objetivo para el pentapéptido XQHNPR, que comprende las etapas de:

10 a) preparar un cultivo de células objetivo monocapa confluyente o preparar un espécimen de órgano objetivo o una muestra tejido;

15 b) añadir la molécula candidata a la que se ha marcado previamente con una marca radiactiva o no radiactiva;

c) incubar el cultivo de células, el espécimen del órgano o la muestra de tejido de la etapa a) en presencia de la molécula candidata marcada durante un tiempo suficiente para que se realice la unión específica;

20 d) cuantificar el objetivo específicamente unido al cultivo de células objetivo, el espécimen del órgano o la muestra de tejido.

La molécula candidata puede estar marcada radiactivamente (^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I , etc.) o marcada no radiactivamente (biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc.).

25 Específicamente, los materiales usados para realizar el procedimiento de unión anterior son:

- Tampón de unión I: 128 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgSO_4 , 1,2 mM CaCl, 50 mM HEPES, pH 7,5, BSA (entre 0,1 y 2 mg/ml).

30 - Tampón de unión II: medio de Eagle modificado de Dulbecco (Gibco Brl) suplementado con 25 mM HEPES, pH 7,5, y 2 mg/ml de BSA (entre 0,1 y 2 mg/ml).

35 - QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I : Se prepara una disolución apropiada en medio de unión inmediatamente antes de cada experimento. Esta disolución se ha de hacer en un tubo de plástico MinisorbTM (Nunc). El QHNPR marcado ^3H tiene una radiactividad específica de 60 Ci/mmol (CEA, Saclay, Francia). La técnica de marcado ^{125}I se describe a continuación.

40 - QHNPR: Diluida apropiadamente usando el mismo tampón y condiciones como para QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I .

- Tampón de solubilización celular: 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glicerol, 25 mM HEPES, pH 7,5, 1 mg/ml BSA.

45 - Células: Se usan monocapas confluentes de 2 ó 10 cm^2 preferiblemente sembradas con placas de múltiples pozos. Los ensayos que implican tipos de células que se separan fácilmente del sustrato se han de realizar con suspensiones celulares. Se pueden obtener suspensiones celulares simples mediante separación mecánica (mediante pipetado) o con una breve exposición a 37°C al tampón de separación que contiene 1 mM EDTA, 128 mM NaCl, 5 mM glucosa, 25 mM HEPES, pH 7,4, 2 mg/ml BSA.

50 La marca radio-iodinada de QHNPR se realiza como sigue:

55 El péptido QHNPR se marca según el procedimiento de Greenwood *et al.*, 1963, usando 1 mCi Na ^{125}I (Amersham), 0,8 μg (1 nmol) pentapéptido y 15 μg cloramina T (Fluka) en 50 μl borato de sodio, pH 8. Después de 2 minutos de reacción, a la mezcla se le realizó una cromatografía mediante filtración de gel GF05 (Pharmacia-LKB) para aislar el pentapéptido marcado ^{125}I y se cromatografió posteriormente sobre porapak QTM de fase inversa (Waters-Millipore) para diluir el pentapéptido marcado mono-ionatado. La radiactividad específica, correspondiente a un átomo de molécula radioiodina/péptido, se estima como 1500 Ci/mmol.

60 El ensayo, por sí mismo, comprende las siguientes etapas:

a) lavar monocapas celulares con tampón de unión. Los tampones de unión I y II se pueden usar de manera intercambiable en ensayos realizados a 4°C, pero el tampón de unión II se ha de usar en ensayos que implican una etapa de incubación a 37°C. Después de lavarlas una vez, las monocapas se dejan equilibrar con tampón de unión durante 30 minutos a 4°C.

65 b) aspirar el tampón y se añade tampón de unión frío helado en placas sobre hielo. El volumen del tampón es aproximadamente de 1 ml/2 cm^2 de pozo.

ES 2 271 991 T3

c) añadir QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I diluido aproximadamente en un pequeño volumen de tampón de unión. Concentraciones de QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I en el rango de pH definido por la curva de saturación (cerca de la disociación constante K_d). Si se desea, el QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I se puede incorporar en el tampón usado en la etapa b) antes de la adición a los pozos. Inmediatamente antes o después de la adición de QHNPR marcado ^{125}I , añadir QHNPR no marcado a los pozos que lo requieran. El QHNPR se usa para dos propósitos. El aumento de las concentraciones de QHNPR se usa para suplementar la concentración del trazador de QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I en experimentos diseñados para establecer la curva de saturación de QHNPR que se une a las células. El aumento de las concentraciones de QHNPR o de la molécula de ligando candidata también se usa en el procedimiento de receptor de unión competitivo. Además, un exceso de 50 pliegues o mayor de QHNPR no marcado se usa en todos los experimentos para determinar la cantidad de QHNPR marcado ^{125}I que no está específicamente unido. Esta determinación se basa en la presunción de que el QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I y el QHNPR completo se unen en sitios relevantes de alta afinidad, pero no en sitios no específicos sobre las superficies de las células o cápsulas.

d) Incubar ensayos durante 1,0 horas aproximadamente a 4°C sobre una plataforma que oscila a 120 cpm.

e) Aspirar el medio. Lavar los cultivos cinco veces con tampón de unión helado I.

f) Añadir tampón de solubilización (0,5 ó 1,5 ml para pozos de 2 ó 10 cm^2 , respectivamente). Incubar durante 40 minutos a 4°C .

g) Contar la radiactividad en los extractos solubles. Para determinar la unión específica, restar las cuentas por minuto obtenidas en pozos incubados con QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I en presencia de QHNPR en exceso a partir de las cuentas por minutos en pozos incubados con QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I en solitario. Contar una parte alícuota de cada disolución de QHNPR marcado ^3H o marcado ^{125}I usada en el experimento para determinar los valores de radiactividad específicos. Contar el número de células por pozo para determinar la cantidad de QHNPR unido por célula.

Mediante aproximadamente una hora de incubación según la etapa a) anterior, se indica un periodo de tiempo de incubación que es suficiente para el QHNPR o QHNPR marcado para unirse a sus sitios objetivo específicos en la célula, teniendo en cuenta que el ensayo se realiza a una temperatura de 4°C , es decir, a una temperatura para la que la fluidez de la membrana es baja. En consecuencia, el periodo de tiempo de incubación apropiado está comprendido entre 1 y 12 horas (de la noche a la mañana).

También se pueden usar otros procedimientos de unión receptores para seleccionar derivados biológicamente activos del péptido XQHNPR de la invención, tal como los descritos por Whitcomb *et al.* en 1993, Epelbaum *et al.* en 1993, Ricci *et al.* en 1993, Loring *et al.* en 1993, Walsh *et al.* en 1995, Roberts *et al.* en 1995 o también Wu *et al.* en 1996, incorporándose aquí por referencia los ensayos de unión descritos en los artículos citados anteriormente.

Para determinar la actividad biológica de una molécula de ligando candidata de interés para el propósito de la presente invención que se ha seleccionado positivamente según el ensayo de unión descrito previamente y para determinar si esta molécula de ligando competitiva seleccionada actúa como molécula agonista o antagonista del péptido XQHNPR de la invención, se pueden realizar diferentes ensayos metabólicos. A partir de ahora se describe un ensayo de adenilato ciclasa que se realiza sobre cultivos primarios de células objetivo o sobre líneas de células o sobre tejidos homogeneizados objetivo.

En resumen, los tejidos homogeneizados o las células cultivadas (proteína 1-100 μg) se incuban en 50 mM de tampón Tris/HEPES, pH 7,5, que contiene 1 mM MgSO_4 , 1 mM EGTA, 1 mM 3-isobutil-1-metilxantina, 0,1% (peso/vol) BSA, 1 mM ATP, 25 mM fosfato de creatinina, 260 U/ml creatina quinasa (E.C. 2.7.3.2), y 6,5 U/ml mioquinasa (E.C. 2.7.4.3) en un volumen final de 100 μl durante 10 minutos a 37°C . La reacción se detiene mediante la adición de 100 μl 0,5 (peso/vol) SDS y se hierve durante 2 minutos. El AMP cíclico se extrae con Dowex 50WX-8 y se analiza mediante RIA (Stangi *et al.*, 1993).

La cantidad de AMP cíclico producido en respuesta a la presencia de la molécula de ligando candidata (rango 10^{-10} - 10^{-5} M.) se determina tal como se ha descrito anteriormente. Una estimulación de actividad de adenilato ciclasa que es equivalente, cuando se usa en solitario, o mayor, cuando se asocia con una concentración subóptima de QHNPR, que la estimulación de actividad de adenilato ciclasa inducida por el XQHNPR en solitario, y más específicamente QHNPR en solitario, se considera como positivo y la molécula de ligando candidata se clasifica así como agonista del péptido XQHNPR de la invención.

En otra realización del procedimiento de tamizado según la presente invención, se determina la cantidad de AMP cíclico producido en presencia de los dos XQHNPR, específicamente QHNPR, y la molécula de ligando candidata. Si la presencia de la molécula de ligando candidata puede abolir o bloquear la estimulación de la actividad de adenilato ciclasa inducida por el XQHNPR, específicamente QHNPR, entonces la molécula de ligando candidata se clasifica entre los compuestos antagonistas del péptido según la invención.

Incluso, la cuantificación de la actividad de adenilato ciclasa representa solamente una realización del procedimiento de tamizado según la presente invención. Un experto en la materia podría haber entendido que se pueden

ES 2 271 991 T3

visualizar diversos cambios metabólicos de la fisiología celular para determinar la actividad agonista o antagonista de la molécula de ligando candidata que se ha de ensayar. Otros ensayos de cuantificación de los cambios metabólicos también está incluidos por la presente invención, tal como los cambios en la actividad de las quinasas, en la actividad dependiente de las proteínas GTP-G, en la producción de tejidos o células metabolizados específicos tales como colágenasa mediante tipos de células osteogénicas.

Así, la presente invención también pertenece a un procedimiento para tamizar moléculas de ligando que poseen una actividad biológica agonista sobre el receptor objetivo del pentapéptido XQHNPR, que comprende las etapas de:

10 a) Preparar una monocapa de cultivo de células objetivo confluentes o preparar un espécimen de órgano objetivo o una muestra de tejido (criosecciones o cortes);

15 b) Incubar el cultivo celular, el espécimen del órgano o la muestra de tejido de la etapa a) en presencia de la molécula candidata (10^{-10} - 10^{-5} M) y de una concentración submaximal de QHNPR (70 al 80% de saturación del receptor) durante un tiempo suficiente para que se produzca la activación del adenilato ciclasa;

20 c) Cuantificar la actividad del adenilato ciclasa presente en el material biológico de la etapa a), respectivamente en presencia o en ausencia de la molécula de ligando candidata y en presencia o en ausencia de una concentración submaximal de XQHNPR.

Otro objetivo de la presente invención comprende un procedimiento para tamizar moléculas de ligando que poseen una actividad biológica antagonista sobre el receptor objetivo del pentapéptido XQHNPR, que comprende las etapas de:

25 a) Preparar una monocapa de cultivo de células objetivo confluentes o preparar un espécimen de órgano objetivo o una muestra de tejido;

30 b) Incubar el cultivo celular, el espécimen del órgano o la muestra de tejido de la etapa a) en presencia del péptido XQHNPR, específicamente el péptido QHNPR, en presencia o en ausencia de la molécula candidata durante un tiempo suficiente para que se produzca la activación del adenilato ciclasa, más particularmente durante 2-20 minutos, preferiblemente 5-15 minutos, y más preferiblemente 10 minutos;

35 c) Cuantificar la actividad del adenilato ciclasa presente en el material biológico de la etapa a), respectivamente en presencia o en ausencia de la molécula de ligando candidata.

40 Tal como se ha indicado anteriormente, otro ensayo metabólico para determinar la actividad agonista o antagonista comprende incubar el candidato de ligando en presencia de un cultivo de células primarias osteogénicas o línea celular y determinar, cuantitativa y/o cualitativamente, el colágeno producido en respuesta a la estimulación *in vitro* (con un rango de concentración de 10^{-10} - 10^{-5} M de la molécula que se ha de probar).

Tal como ya se ha mencionado, el ensayo de unión y el ensayo metabólico, tal como el ensayo de adenilato ciclasa, puede realizarse sobre cultivos de células primarias, sobre líneas celulares establecidas o sobre cortes de tejido fresco, criosecciones de tejido o tejidos homogeneizados.

45 Una línea celular preferida que se usa en los procedimientos de tamizado según la presente invención es una línea celular mesodermal clonal osteogénica de ratón, llamada C1, que se deriva del teratocarcinoma de ratón. Expresa los oncogenes SV40 bajo el control del promotor adenovirus E1a (Chentoufi *et al.*, 1993; Kellermann *et al.*, 1990; Poliard *et al.*, 1993; Poliard *et al.*, 1995).

50 Otras líneas celulares preferidas consisten en varias líneas celulares clonales de la misma raza de ratón de la cual se ha derivado inicialmente la línea celular clonal C1 anterior, más específicamente, las líneas celulares clonales derivadas de las células epiteliales de los túbulos proximales renales.

55 Otras líneas celulares preferidas de diferente origen son las siguientes, que están disponibles públicamente en la colección de cultivos celulares ATCC:

1) Líneas celulares del páncreas

60 - AsPC-1 (ATCC N° CRL 1682), origen humano;

- Bx PC-3 (ATCC N° CRL 1687), origen humano;

- Capan-1 (ATCC N° HTB 79), origen humano;

65 - Capan-2 (ATCC N° HTB 80), origen humano;

- PANC-1 (ATCC N° CRL 1469), origen humano;

ES 2 271 991 T3

- AR42J (ATCC N° CRL 1492), origen rata;

- ARIP (ATCC N° CRL 1674), origen rata;

5

2) Líneas celulares de la próstata

- DU145 (ATCC N° HTB 81), origen humano;

10 - LNCaP.FGC (ATCC N° CRL 1740), origen humano;

- PC-3 (ATCC N° CRL 1435), origen humano;

15 3) Línea celular del riñón

- RAG (ATCC N° CCL 142), origen ratón;

20 4) Línea celular de la glándula submandibular

- SCA-9 Clon 15 (ATCC N° CRL 1734), origen ratón;

25 5) Línea celular del intestino

- IA-XsSBR (ATCC N° CRL 1677), origen ratón;

30 6) Líneas celulares osteogénicas

- FC25T (ATCC N° CRL 6090), origen gato;

- D-17 (ATCC N° CCL 183), origen perro;

35

- 143B (ATCC N° CRL 8303), origen humano;

- HOS (ATCC N° CRL 1543), origen humano;

40

- Saos-2 (ATCC N° HTB 85), origen humano;

- SK-ES-1 (ATCC N° HTB 86), origen humano;

- UMR-106 (ATCC N° CRL 1661), origen rata;

45

- UMR-108 (ATCC N° CRL 1663), origen rata.

Para el propósito de una realización específica del ensayo metabólico según la presente invención, a saber el análisis de colágeno, el ensayo se realiza tal como se describe a continuación:

50

Las células osteogénicas confluentes, específicamente la línea celular C1 descrita anteriormente, se marcan durante 24 horas con 50 $\mu\text{Ci/ml}$ de 4,5 $[\text{^3H}]$ prolina (32 Ci/mmol; Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, Francia) en DME suplementado con 1% FBS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico, y 50 $\mu\text{g/ml}$ de b-aminopropionitrilo fumarato (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, USA). Las células se recogen en 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4) que contienen 150 mM de NaCl, 25 mM de EDTA, 10 mM de N-etilmaleimida, y 2 mM de PMSF, y se mezclan con el medio de cultivo. Después de la sonicación y la adición de tricloroacetato (TCA) (10%), el residuo insoluble se recoge mediante centrifugación.

55

La cantidad de $[\text{^3H}]$ prolina incorporada en la proteína digestible colagenasa y la proteína no colagenasa se determina tal como describió Peterkofsky *et al.* en 1971.

60

Los tipos de colágeno se determinan mediante PAGE: cortes resuspendidos en ácido acético 0,5 M se digieren con 100 $\mu\text{g/ml}$ de fumarato de pepsina (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, USA), pH 2,0 durante 4 horas a 4°C. La pepsina digerida se lleva a un pH de 8,0 se dializa y se liofiliza. Las muestras se analizan a continuación mediante SDS-PAGE. Se usa una reducción retrasada con 2-mercaptoetanol en algunas muestras. Las proteínas marcadas se visualizan mediante fluorografía o autoradiografía y se cuantifican mediante un dispositivo de producción de imágenes por radio beta.

65

ES 2 271 991 T3

Siguen otros eventos metabólicos en la determinación de los cambios metabólicos inducidos por las moléculas terapéuticas usadas según la presente invención, tales como los depósitos de componentes minerales sobre la matriz de colágeno. Para este propósito, se usa en ensayo descrito a continuación:

5 - Cultivos celulares: Se usa la línea celular C1 mesodermal clonal. Las células C1 se colocan en placas de 3 x 10⁵ células en platos de plástico no tratado de 100 mm de diámetro y se cultivan en un medio Tagle modificado Dulbecco (DMEM, Gobo, Gradn Island, N.Y., USA) con un 10% de suero de ternero fetal (FCS). Después de 8-10 días de cultivo, se forman agrupaciones tridimensionales. En ese momento (día 0), las células se cultivan en DMEM con 1% de FCS en presencia de 10 mM beta-glicerofosfato (Sigma) y 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma). En algunos pozos, se añade 50 µg/ml de tetraciclina al medio para visualizar mediante marcado fluorescente el mineral incorporado en la matriz. El medio se cambia cada 3 días y los cultivos se conducen hasta 30 días.

15 - Determinaciones bioquímicas. En 0, 2, 7, 11, 16, 22 y 30 días, los cultivos se recogen, se enjuagan tres veces en PBS libre de calcio, y se dividen en tres partes iguales para la evaluación de calcio, la actividad de la fosfatasa alcalina y la síntesis de ADN. Para la determinación del calcio, los cultivos se disuelven en 1 ml de HCl 6N durante 1 hora a 100°C. El calcio se ensaya en alícuotas mediante espectrometría de absorción atómica después de su disolución en cloruro de lantano. Para la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina, se añade 1 ml de agua destilada fría a los cultivos. Después de su sonicación durante 10 segundos, se retira el material insoluble mediante centrifugación. Algunas muestras se calientan a 56°C durante 1 hora para medir la actividad de la fosfatasa alcalina del tipo de huesos (lábil térmica). La actividad de la enzima se determina midiendo la cantidad de p-nitrofenol formado a 37°C después de 30 minutos. El contenido de la proteína celular se mide mediante el procedimiento descrito por Lowry *et al.* en 1951.

25 El beta-glicerofosfato no radiactivo se puede reemplazar mediante una molécula radiactiva. El compuesto fosforoso usado convencionalmente como agente de localización óseo es un fosfato o pirofosfato inorgánico. Una molécula radiactiva que se puede usar en el ensayo anterior es tetrasodio ³²P pirofosfato (NEX 019, New England Nuclear) o ⁹⁹tecnecio que se une al compuesto fosforoso.

30 Así, otro objeto de la presente invención comprende un procedimiento para tamizar moléculas de ligando que posee una actividad biológica agonista o antagonista sobre el receptor objetivo del pentapéptido XQHNPR, que comprende las etapas de:

a) Cultivar una célula eucariótica capaz de sintetizar colágeno;

35 b) Incubar la célula eucariótica de la etapa a) en beta-glicerofosfato en presencia de la molécula candidata (10⁻¹⁰-10⁻⁵ M) y de una concentración submaximal de péptido QHNPR;

40 c) Cuantificar la producción de un metabolito específico, tal como calcio, fosfatasa alcalina o síntesis de ADN, respectivamente en presencia o en ausencia de la molécula de ligando candidata y en presencia o en ausencia de una concentración submaximal de QHNPR.

45 La célula eucariótica del procedimiento anterior puede ser una célula que se ha transfectado o transformado con un ácido nucleico que se codifica para colágeno, o una célula eucariótica que puede sintetizar colágeno de una manera constitutiva o inducible. Una célula preferida es una célula de mamífero que puede sintetizar colágeno de manera natural, tal como la línea celular C1.

Otros cambios metabólicos inducidos por las moléculas terapéuticas usadas según la presente invención también se pueden determinar, tales como otros ensayos de enzimas, ensayos de transporte de iones o ensayos de transducción de señal. Los ensayos de enzimas que se pueden realizar comprenden ensayos de acetilcolinesterasa (Ellman G.L. *et al.*, 1961, *Biochem. Pharmacol.*, 7:88), catepsina (Barret A.J. *et al.*, 1981, *Methods Enzymol.*, 80:535), ATPase, ciclooxigenasa (Mitchell J.A. *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:11693), guanilato ciclasa (Wolin M.S. *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.*, 257, 13312), lipoxigenasa (Shimizu T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, 81:689), monoamina oxidasa (Weyler W. *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260: 13199), mieloperoxidasa (Desser R.K. *et al.*, 1972, *Arch. Biochem. Biophys.*, 148:452), fosfofiterasa (Nicholson C.D. *et al.*, 1989, *Br. J. Pharmacol.*, 97:889), proteína quinasa (Hannun Y.A. *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260:10039), tirosina hidroxilasa (Nagatsu *et al.*, 1964, *Analyt. Biochem.*, 9:122) o xantina oxidasa (McCord J.K. *et al.*, 1969, *J. Biol. Chem.*, 244:6049). Los ensayos de transporte de iones comprenden ensayos de bomba de Ca (Jean T. *et al.*, 1986, *J. Biol. Chem.*, 261:16414), canal de Ca (Galizzi J.P. *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:6947), canal de Na (Jacques Y. *et al.*, 1978, *J. Biol. Chem.*, 253:7383), bomba de Na-K (Chassande O. *et al.*, 1988, *Eur. J. Biochem.*, 171:425), antipuerto de Na-Ca (Barle A.B. *et al.*, 1990, *Am. J. Physiol.*, 259:19), antipuerto de Na-H (Jean T. *et al.*, 1986, *Eur. J. Biochem.*, 160:211), cotransporte de Na/K/Cl (Chassande O. *et al.*, 1988, *Eur. J. Biochem.*, 171:425). Los ensayos de transducción de señal que también se pueden usar comprenden liberación de Ca (Grynkievicz G. *et al.*, 1985, *J. Biol. Chem.*, 260:3440) o renovación PI (White T.E. *et al.*, 1993, *Br. J. Pharmacol.*, 108:196). El contenido técnico de los artículos referenciados anteriormente respecto a los ensayos metabólicos se incorporan aquí por referencia.

65 Otro objetivo de la presente invención es también un procedimiento para tamizar las moléculas de ligando que poseen una actividad biológica agonista o antagonista sobre el receptor objetivo del pentapéptido XQHNPR, que comprende las etapas de:

ES 2 271 991 T3

a) Preparar una monocapa de cultivo celular objetivo confluyente o preparar un espécimen de órgano objetivo o una muestra de tejido (criosecciones o cortes);

5 b) incubar el cultivo celular, el espécimen de órgano o la muestra de tejido en la etapa a) en presencia de la molécula candidata (10^{-10} - 10^{-5} M) y de una concentración submaximal de QHNPR durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca el cambio metabólico;

10 c) Cuantificar la producción del metabolito correspondiente, respectivamente en presencia o en ausencia de la molécula de ligando candidata y en presencia o en ausencia de una concentración submaximal de QHNPR.

15 El cambio metabólico indicado en el procedimiento de tamizado anterior es de manera intercambiable un cambio en la producción de cualquiera de los metabolitos que se ensayan según los procedimientos referenciados anteriormente. En consecuencia, el tiempo que es suficiente para que se produzca el cambio metabólico dependerá del metabolito ensayado y está indicado, para un metabolito particular, en cada artículo de referencia que se ha dado anteriormente.

20 Los cortes de tejido, las criosecciones de tejido o los tejidos homogeneizados se usan en la realización de los ensayos de unión o metabólicos para seleccionar las moléculas de ligando de interés que representan los derivados biológicamente activos del XQHNPR, específicamente QHNPR, péptido según la presente invención. Las muestras de tejido preferidas son de origen del riñón, el páncreas, los huesos, los dientes, la mucosa glandular del estómago, la próstata y el intestino, así como de las glándulas salivares.

25 Los tejidos homogeneizados se preparan sumergiendo primero biopsias en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se homogenizan a continuación en 20 vol de hielo frío de tampón Tris/HEPES 50 mM, pH 7,5, que contiene 1 mM EGTA, 0,3% (peso/vol) de bacitracina, 20 mM de fluoruro de 4-amidinofenilmetanosulfonil, y 10 mM de leupeptina con un homogenizador de Teflón-vidrio accionado a motor. Los homogenizados se centrifugan a $24.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C y los pedazos se lavan una vez con 50 mM Tris/HEPES, pH 7,5, que contienen 1 mM EGTA. Los pedazos finales se suspenden en 50 mM Tris/HEPES pH 7,5 que contienen 1 mM EGTA y 0,3% (peso/vol) de bacitracina, y se guardan a -20°C . Otros detalles del procedimiento son descritos por Stangi *et al.* en 1993, dependiendo del origen del tejido que se ha de homogeneizar, los procedimientos usados por Stangi *et al.* estando incorporados aquí por referencia.

30 Para obtener muestras de tejido intactas, por ejemplo de origen renal, se usa el siguiente procedimiento.

35 Antes de recoger el órgano o tejido, por ejemplo en una rata, el animal es anestesiado con hidrato cloral (35%, 0,14 ml/100 g de peso corporal) o con pentobarbital (45 mg/kg de peso corporal). A continuación, se realiza una perfusión intracardiaca con 100 ml de sucrosa isotónica a 4°C (Loring *et al.*, 1993).

40 Se pueden obtener riñones después de biopsias humanas o a partir de ratas Wistar macho inmediatamente después de su muerte mediante dislocación cervical, o anestesia tal como se ha descrito anteriormente. Las muestras de tejido se incrustan inmediatamente en Tissue-Tek (Miles, Elkhart, IN) y se congelan para tapar portaobjetos en isopentano en fusión (a -70°C) sin fijación previa. Los especímenes se almacenan a -70°C hasta su uso. Se cortan secciones de 10-30 μm de espesor en un criostato (a una temperatura de -20°C a -30°C) y se montan en deshielo sobre portaobjetos no recubiertos de vidrio de bajo hierro. A continuación se usan inmediatamente o se secan en vacío y se almacenan a -20°C con gel de sílice hasta 5 días hasta su uso. Esta técnica fue descrita por Walsh *et al.* en 1995, cuyos detalles se incorporan aquí por referencia.

45 Alternativamente, las secciones de tejido se congelan en hielo seco en presencia de isopentano y se montan en deshielo sobre portaobjetos de microscopio, y se almacenan a -80°C hasta su uso (Whitcomb *et al.*, 1993).

50 Como otro procedimiento alternativo para obtener muestras de tejido fresco, se obtienen especímenes de córtex renal y médula a partir de sujetos que sufren nefrectomía. Las porciones del riñón recogidas se colocan en una solución de 0,9% NaCl fría en hielo para retirar la sangre y los restos celulares. Los bloques que incluyen el córtex renal o la médula o las muestras separadas del córtex o de la médula se incrustan en un medio crioprotector (OCT, Ames, IA) y se congelan en isopentano refrigerado con nitrógeno líquido o hielo seco. Los bloques de OCT se almacenan a -80°C hasta su uso. Se obtienen secciones de 8 μm de grueso en serie usando un criostato micrótopo a -20°C , montado sobre portaobjetos de microscopio recubiertos con gelatina y se secan al aire. Esta técnica fue descrita por Ricci *et al.* en 1993.

55 Los derivados biológicamente activos preferidos del péptido XQHNPR de la composición terapéutica según la presente invención tienen una mejor farmacocinética que el péptido XQHNPR natural endógeno o sintético y así poseen una vida media *in vivo* más larga comparada con sus homólogos naturales.

60 Un procedimiento para determinar la farmacocinética de las moléculas de ligando según en ensayo de unión y el ensayo metabólico descrito anteriormente se ejemplifica en el Ejemplo 3. Alternativamente o además, se determina el aclaramiento de plasma de las moléculas de ligando seleccionadas según la técnica descrita por Wu *et al.* en 1996 o la técnica descrita por Ezan *et al.* en 1986, o por Ezan *et al.* 1996, cuyas técnicas se incorporan aquí por referencia.

65 Los derivados biológicamente activos descritos anteriormente, que no se podrían haber identificado antes del descubrimiento de los inventores, también son un objeto de la presente invención.

ES 2 271 991 T3

Así, la invención también se refiere a los derivados biológicamente activos del péptido XQHNPR que se han seleccionado según los procedimientos de tamizado descritos anteriormente, estando previsto que no tengan la siguiente estructura: Y-HNP-Z, en donde Y indica una glutamina (Q) o un residuo de ácido piroglutámico e Y representa un grupo OH o un aminoácido básico, siendo el aminoácido básico una Lisina (K) o una Arginina (R). Incluso, también
5 excluido, como miembro de los derivados biológicamente activos del péptido XQHNPR, es la proteína de aminoácido 146 que constituye el propio péptido SMR1 (solicitud de patente PCT N° WO 90/03981). Sin embargo, el uso terapéutico de estas moléculas que se excluyen por sí mismas de la presente invención, es un objeto principal de la invención actual.

10 Los derivados biológicamente activos del péptido XQHNPR usado en las composiciones terapéuticas según la presente invención, en una realización preferida, se han seleccionado en primer lugar según su capacidad para unirse a los mismos objetivos que el péptido XQHNPR, específicamente QHNPR, y en segundo lugar por su capacidad para inducir cambios metabólicos (estimulación de actividad del adenilato ciclasa, producción de colágeno, etc.) en el
15 objetivo o para abolir, bloquear o evitar dichos cambios metabólicos del objetivo que se inducen mediante el péptido XQHNPR, específicamente QHNPR.

La presente invención también tiene relación con el uso de composiciones terapéuticas que comprenden una cantidad efectiva del péptido XQHNPR o de uno de sus derivados biológicamente activos.

20 Tal como se ha detallado previamente, el uso de las composiciones terapéuticas según la invención se indica en el caso de un desequilibrio hidro-mineral del cuerpo. Este uso de las composiciones también es indicada en el caso donde se diagnostica un defecto en el nivel endógeno normal del pentapéptido QHNPR a partir de una muestra biológica del paciente, particularmente a partir de fluidos del paciente tales como suero o plasma, saliva y orina. El nivel de concentración de pentapéptido en la muestra biológica se considera defectuosa cuando es por lo menos
25 cinco pliegues menos importante que la concentración no patológica usualmente encontrada, así como cuando es por lo menos cinco pliegues más importante que la concentración no patológica usualmente encontrada en esta muestra biológica particular.

Un procedimiento de diagnóstico que permite la determinación de la concentración del pentapéptido QHNPR en
30 una muestra biológica, específicamente a partir de suero o plasma, es un radioinmunoensayo (RIA) competitivo, tal como fue descrito por Rougeot *et al.* en 1994.

En breve, el RIA en fase líquida se realiza en Tris/HCl 0,2 M, pH 8,5, que contiene un 0,25% de albúmina de suero bovino (Fr 5, Miles), 0,1% de Triton X-100 (Sigma), 1000 KIU (unidad internacional de calicreína)/ml, Trasyol
35 (un inhibidor de tripsina y calicreína; Bayer), EDTA (1 mM) y 0,1 g/l NaN₃. Estándar o muestra (0,1 ml), 0,1 ml de suero de anti-pentapéptido diluido (Rougeot *et al.*, 1994) y pentapéptido marcado ¹²⁵I (15 x 10³ dpm, 01 ml) se incuban de un día al otro a 4°C. Se separan las fracciones unidas y libres mediante precipitación de propanol (10 µl de suero de conejo normal y 1 ml de 1-propanol en hielo frío) y se determina la radiactividad del precipitado usando un contador gamma. Las muestras de plasma, saliva u orina se recogerían en unos tubos previamente enfriados que
40 contienen una mezcla de inhibidores de peptidasa (1 mM de EDTA, 100 U/ml de aprotinina, 130 µM de bestatina, 1 µM de leupeptina, 0,4 mM de pefabloc, 1 µM de pepstatina).

El procedimiento de diagnóstico anterior se usa ahora como herramienta de uso médico para determinar el tipo de defecto que se puede asociar con un síntoma de desequilibrio de iones minerales. En su uso médico, esta prueba de
45 diagnóstico es también un objeto de la presente invención. Las etapas sucesivas de esta prueba de diagnóstico son las siguientes:

a) Incubar un péptido XQHNPR marcado, específicamente QHNPR, con un anticuerpo policlonal o monoclonal dirigido contra el mismo péptido;
50

b) Llevar en contacto los complejos inmunes formados con una muestra biológica de un paciente para ser probada sospechosa de contener un péptido XQHNPR endógeno no marcado, específicamente el péptido QHNPR;

c) Detectar los péptidos marcados unidos al anticuerpo monoclonal o policlonal, que no han sido desplazados por el péptido XQHNPR endógeno no marcado, específicamente QHNPR, contenido en la muestra biológica para
55 determinar la concentración de este péptido endógeno que está contenido en la muestra biológica;

d) Comparar la concentración del péptido XQHNPR, específicamente QHNPR, encontrada en la etapa c) con la concentración del péptido XQHNPR, específicamente QHNPR, normalmente encontrada en un individuo sano;
60

e) Calcular la cantidad de una composición terapéutica que es necesaria para suministrar el defecto del péptido XQHNPR en los fluidos y los tejidos corporales.

Se calcula la cantidad de molécula terapéutica que se ha de administrar, teniendo en cuenta la farmacocinética *in vivo* de dicha molécula terapéutica, determinándose la farmacocinética *in vivo* tal como se describe en el Ejemplo 3 y, por supuesto, la cantidad normal de péptido XQHNPR, específicamente QHNPR, encontrado normalmente en los fluidos corporales (plasma, saliva, orina) o en los órganos.

ES 2 271 991 T3

El péptido XQHNPR marcado usado en la prueba de diagnóstico se marca de manera radiactiva o no radiactiva.

El anticuerpo policlonal usado en este procedimiento de diagnóstico puede ser opcionalmente bajo la forma de un suero inmune.

5

El sistema de inmunodetección cuantitativa particular designado por los inventores es extremadamente específico y sensible: se obtiene un 50% de desplazamiento del pentapéptido QHNPR marcado ¹²⁵I con no más de 570 fmol de pentapéptido estándar, pentapéptido [Glp¹] o pentapéptido [Gln¹]. El límite de detección (80% de unión) es 106 fmol de pentapéptido estándar. El coeficiente de variación de inter-ensayo es del 12%, n = 24. La reactividad transversal del antisuero con la secuencia de tetrapéptido (QHNP) y la hormona de liberación de la tirotropina (Glp-His-Pro) es menor del 0,01%.

10

En una realización específica de la presente invención, las concentraciones de péptido XQHNPR cuantificadas según el procedimiento de diagnóstico descrito anteriormente se usan para determinar la cantidad del péptido XQHNPR o de uno de sus derivados biológicamente activos que se han de administrar al paciente para suministrar para el defecto diagnosticado, en caso de un bajo nivel en el péptido endógeno y para determinar sus parámetros farmacocinéticas en sujetos patológicos y no patológicos.

15

Las composiciones terapéuticas que contienen la proteína SMR1 o productos de maduración SMR1 o sus derivados y usadas según la presente invención pueden ser bajo la forma de una solución líquida, bajo la forma de un gel o bajo la forma de un polvo seco.

20

Los péptidos terapéuticos según la presente invención son ventajosamente complejos con iones de sales metálicas, tales como Ca⁺⁺, Cu⁺⁺, Ni⁺⁺, Mg⁺⁺ o Al⁺⁺ directa o indirectamente con las proteínas de iones portadores o también fosfato de calcio tal como se describe en las patentes francesas FR-2.543.439 y FR-2.181.426 (Reliveld *et al.*), o también con ATP.

25

Los péptidos terapéuticos según la presente invención también pueden ser complejas a dextrano o derivados de dextrano.

30

Una realización específica del uso de los sistemas de suministro controlado que contienen moléculas de dextrano se representa mediante una forma de "larga acción (LA)" y una forma de "larga acción renovable (RLA)". La forma LA consiste en microesferas de ácido poliláctico que contienen bromocriptina incluida en dextrano. En la forma RLA, la bromocriptina está contenida en microesferas de D, L-poliacturo-coglicoluro-glucosa, cuya degradación es casi completa en un periodo de tiempo menor de tres meses y que permite repetir los numerosos tiempos de administración durante un largo periodo de tiempo (Montini *et al.*, 1986; Kato *et al.*, 1988).

35

Preferiblemente, las composiciones terapéuticas según la presente invención se administran localmente, cerca del sitio, órgano o tejido, que se ha de tratar. Como realización alternativa, las composiciones terapéuticas de la invención se administran mediante vía oral para actuar sistémicamente o al nivel de la mucosa bucal o del estómago o al nivel del tracto gastro-intestinal. Estas composiciones terapéuticas pueden ser en forma de una solución salina o una tableta, preferiblemente una tableta de liberación controlada. Una tableta de liberación controlada típica se describe en la solicitud de patente PCT WO 9622768, que contiene entre un 30 y un 70 por ciento en peso aproximadamente de uno o más éteres de celulosa, tal como hidroxipropil metilcelulosa, y entre un 30 y un 70 por ciento en peso aproximadamente de una sustancia inerte tal como almidón.

45

En otra realización de las composiciones terapéuticas de la presente invención, el péptido XQHNPR o sus derivados biológicamente activos se incluyen en un dispositivo de liberación controlada que se coloca localmente en el cuerpo, para obtener un suministro sostenido de las moléculas activas en las inmediaciones del sitio que se ha de tratar.

50

Preferiblemente, los dispositivos de liberación controlada que se usan para el propósito de la presente invención son micropartículas de lípido o polímero que se disuelven o se hidrolizan lentamente en el interior del cuerpo, específicamente en el estómago o en el tracto intestinal.

55

En una realización preferida de los dispositivos de liberación controlada de la presente invención, estos últimos se pueden implantar localmente para asegurar un área de difusión limitada de la molécula activa, rodeando el órgano o tejido que se ha de tratar.

Los dispositivos de suministro sostenido preferidos según la presente invención contienen polímeros biodegradables tales como se describen en la solicitud de patente PCT WO 9701331. El polímero puede ser un polisacárido como en la solicitud de patente PCT WO 9613253, tal como alginato de sodio. Una preparación sostenida biodegradable está compuesta preferiblemente de un polisacárido que está recubierto con moléculas catiónicas tales como kitosan, estando el portador lentamente hidrolizado de manera enzimática, por ejemplo mediante lisozima, *in vivo* después de la liberación de la molécula activa.

65

El polímero usado en los dispositivos de liberación controlada según la presente invención también puede ser un polímero de tipo polivinilpirrolidona, tal como se describe en la solicitud de patente PCT WO 8804922 o un hidrolisato de almidón, tal como se describe en la solicitud de patente PCT WO 9417676.

ES 2 271 991 T3

En una realización específica, el polímero es un polímero bioadhesivo tal como carboximetilcelulosa, Carbopol™, Polycarbophil™ o alginato de sodio, que se une con una excelente eficiencia a la mucina presente en la superficie del epitelio (Robinson *et al.*, 1998), usándose estos polímeros especialmente en el caso de un suministro de medicamento oral.

Otros dispositivos de suministro sostenido preferidos según la presente invención son bajo la forma de microcuentas de polímero, por ejemplo microcuentas poliméricas reticuladas porosas, tales como se describen en la solicitud de patente PCT WO 9533553.

Otra realización de los dispositivos de liberación controlada según la presente invención son liposomas en una forma hidratada, tal como en la solicitud de patente PCT WO 8601102 o en la solicitud de patente PCT WO 9522961 (Capron *et al.*), o en una forma deshidratada, tal como en la solicitud de patente PCT WO 8601103. Otras emulsiones de lípido usadas como sistemas de suministro de medicamentos que se pueden usar para el propósito de la presente invención son descritas por Davis *et al.* en 1988, que se pueden administrar por vía oral, pararteral o intravenosa. Los liposomas pueden contener determinantes sacáridos que se unen a los componentes específicos de la membrana de la célula para facilitar el suministro de la molécula activa hacia una célula objetivo seleccionada, en particular determinantes sacáridos que se unen a las lectinas específicas de la membrana celular (Shen, 1988).

Otra realización de las formulaciones de suministro sostenido usada según la presente invención consiste en un vector de partículas que comprende, desde la capa interna hasta la capa externa:

- un núcleo hidrofílico no líquido, por ejemplo una matriz de polisacárido u oligosacárido reticulado, estando dicho núcleo opcionalmente injertado con ligandos iónicos que llevan por lo menos un grupo seleccionado entre fosfato, sulfato, ácido carboxílico, amonio cuaternario, amina secundaria o amina terciaria;

- una capa externa que consiste en compuestos lípidos que están injertados sobre el núcleo mediante uniones covalentes.

Un vector particulado de este tipo se describe en la solicitud de patente PCT WO 94/23701 (Perrin *et al.*).

Excepcionalmente, el péptido XQHNPR de la invención se puede administrar a la piel a través de un sistema de suministrar iontoforético transdermal, tal como fue descrito por Chien *et al.* en 1988.

Las composiciones terapéuticas según la presente invención contienen una cantidad farmacéuticamente efectiva del péptido XQHNPR o de uno de sus derivados biológicamente activos.

La cantidad de principio activo contenido en una dosis terapéutica del péptido XQHNPR o derivado péptido activo está contenida en el rango entre 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 5 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente entre 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1 mg/kg de peso corporal.

Un objeto de la presente invención es también una composición terapéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de proteína SMR1, sus productos de maduración, específicamente el péptido XQHNPR, más específicamente el pentapéptido QHNPR, así como los derivados biológicamente activos de este último, usados en combinación con una cantidad farmacéuticamente efectiva de otra molécula implicada en la regulación del equilibrio iónico mineral. Las moléculas preferidas que se asocian con la proteína SMR1 o sus derivados son la hormona paratiroide (PTH), calcitonina (CT) y 1,25-dihidroxitamina D.

El hecho de que los inventores hayan determinado, en la rata macho, la precisa distribución topográfica de los órganos objetivo para los péptidos XQHNPR, ha permitido a los presentes inventores entender y especificar el papel de estos péptidos en sistemas locales y periféricos.

Más específicamente, los inventores han mapeado los objetivos periféricos para el producto de maduración de secreción final de SMR1, el pentapéptido, examinando *in vivo* la distribución de tejido bruto del péptido radiomarcado con la auroradiografía de todo el cuerpo (WBA) (Ullberg *et al.*, 1981). Este procedimiento proporciona una imagen visual de todo el animal, haciendo posible por lo tanto examinar simultáneamente la absorción del pentapéptido en un gran número de tejidos y compartimientos. Además, esta aproximación es considerablemente más atractiva que un procedimiento *in vitro*, ya que el marcado en tejido vivo minimiza la posibilidad de malas interpretaciones debido a una distribución no específica, a la degradación del sitio receptor y al péptido unido al sitio no receptor eliminado a través del torrente sanguíneo (Lindberg *et al.*, 1991). Por estas razones, la respuesta al tejido en relación en el tiempo para el pentapéptido se ha determinado *in vivo*. Para eliminar la posibilidad de competición para los sitios de unión disponibles a partir del péptido endógeno, se ha conseguido el marcado mediante la infusión de pentapéptido tritiado en ratas pubescentes de cinco semanas de vida. Además de filmar la autoradiografía, se han registrado el mapeado y el transcurso del tiempo de la absorción del péptido tritiado por parte de los órganos vivos mediante el productor de imágenes β -radio desarrollado recientemente, que ofrece la capacidad única de detectar y cuantificar las partículas β emitidas desde el ligando tritiado unido a las superficies planas tales como secciones de todo el cuerpo (Charpak *et al.*, 1989; Tribollet *et al.*, 1991). Los inventores también han analizado las características cromatográficas del compuesto marcado asociado con el órgano objetivo.

ES 2 271 991 T3

Los sitios receptores biológicos tienen dos características esenciales que permiten identificar la unión específica, *in vivo*; tienen una alta afinidad para el ligando y la unión es saturable (Whitcomb *et al.*, 1993). Por lo tanto, se han realizado experimentos de desplazamiento, usando la administración sistémica paralela de un exceso del péptido no marcado correspondiente. Además, la localización celular específica del pentapéptido marcado en los tejidos objetivo se ha identificado mediante autoradiografía de sección microscópica.

Finalmente, para apreciar la relevancia de la absorción del pentapéptido bajo condiciones fisiológicas, los inventores han determinado el diseño de secreción endógena de la corriente sanguínea de los péptidos relacionados con SMR1 en ratas macho adultas conscientes. Es importante destacar que todos los estudios farmacocinéticos y distribución de sitio celular se realizaron usando concentraciones fisiológicas de pentapéptido marcado.

La presente invención se representará en detalle en los Ejemplos adjuntos, sin estar limitada de ninguna manera en el ámbito a estas realizaciones específicas.

15 *Materiales y procedimientos*

A. *Química*

- Los péptidos correspondientes a las secuencias (Glp₁)-His-Asn-Pro-Arg, (Gln₁)-His-Asn-Pro-Arg y (Gln₁)-His-Asn-(D3,4-Pro)-Arg se sintetizaron por el Laboratoire de Chimie Organique, Institut Pasteur, París, Francia.

- Compuesto marcado: (Glp₁/Gln₁)-His-Asn-(3,4³H)Pro-Arg se sintetizó por el Dr. R. Genet, Departement, d'ingénierie et d'étude des protéines, CEA/Saclay, Gif/Yvette, Francia. El producto purificado RP-C18 HPLC (≥ 98% de pureza) con una radiactividad específica estimada como 2,22 TBq/mmol se almacenó a -80°C en 10% metanol/0,1% ácido trifluoroacético (1,11 GBq/ml). La pureza del pentapéptido tritiado se determinó sistemáticamente antes de su uso, mediante fase inversa C18 y cromatografías FPLC de intercambio de cationes según los procedimientos descritos previamente (Rougeot *et al.*, 1994).

B. *Animales*

Ratas macho Wistar (de 4 semanas de vida), adquiridas a Iffa-Credo (Francia), se mantuvieron en 2-4 animales/jaula bajo iluminación y temperatura controladas con libre acceso a comida y agua, hasta que se usaron 5-7 días más tarde para el estudio de la distribución del sitio receptor del pentapéptido, y 5-6 semanas más tarde para el estudio de la secreción endógena de pentapéptido. Se manejaron cuidadosamente a diario por parte del operador a lo largo de todo este periodo. Todos los experimentos se realizaron entre las 10.00 y las 14.00 h.

C. *Administración del compuesto marcado*

Se diluyó compuesto marcado, es decir, 6,66 MBq, 3 nmoles o 2 mg para la autoradiografía del cuerpo completo (WBA) y 370-555 KBq, 170-250 pmoles o 110-160 ng para los estudios farmacocinéticos y distribución de sitio celular, en 100-200 ml de salino tamponado con fosfato (PBS Dulbecco's, Bio Media, Francia) y se administró de manera intravenosa en la vena yugular de ratas anestesiadas (halotan para WBA o pentobarbital para todos los otros experimentos).

D. *Visualización de la autoradiografía macro de cuerpo completo*

Los tejidos objetivo para el producto de SMR1 de maduración de secreción final, el pentapéptido, se examinó, *in vivo*, mediante el procedimiento de autoradiografía de todo el cuerpo según el procedimiento de Ullberg (Ullberg *et al.*, 1981).

Las ratas de cinco semanas de vida se sacrificaron bajo halotano, en 90 seg., 3, 60 y 240 minutos, después de inyección intravenosa de 3 nmoles (6,66 MBq o 2 µg) de pentapéptido tritiado. En el tiempo seleccionado, el animal contenido se sumergió inmediatamente en una mezcla a -80°C de hielo seco e isopentano, para evitar la redistribución del trazador artefactual. Después de 48 horas en plástico autosellante almacenado a -30°C, el animal se bloqueó a continuación en medio montante. Se hicieron secciones sagitales de todo el cuerpo (20 mm) de la rata congelada a -30°C con un criostato (micrótopo de sección de cuerpo completo Leitz 300 con un congelador móvil de arcón Leitz OM, Leica, Francia). Las secciones adheridas a cinta Scotch se dejaron en un congelador, temperatura -30°C, durante 4 días para asegurar un secado completo. Las cintas se colocaron en casete de película con ³H Hyperfilm (Amersham, Francia) a -20°C. Después de dos semanas, las películas se desarrollaron en un desarrollador Kodak D19 y se fijaron en un fijador Kodak.

E. *Preparación del tejido para seccionado y visualización micro-autoradiográfica brillante*

La localización de sitio celular para las concentraciones fisiológicas de pentapéptido marcado fue investigada mediante un procedimiento de autoradiografía microscópica de sección de parafina o resina. Sesenta minutos después de la administración intravenosa de ³H-pentapéptido (555 KBq, 160 ng o 250 pmoles), las ratas mecho anestesiadas se perfusionaron a través de las venas yugulares con tampón de bicarbonato glucosado Krebs Ringer en hielo frío y a continuación tampón PBS de fijación de 0,5% paraformaldehído/0,5% glutaraldehído (más glucosa 1,6%, CaCl₂

ES 2 271 991 T3

0,002% y DMSO 1%) (50 ml/5 minutos para cada uno). Los tejidos se retiraron rápidamente y se cosecharon para el seccionado de parafina (Paraplast plus-Sherwood medical, OSI, Francia) o para el seccionado de resina (histo-resina Leica, Francia). Todas las secciones se cortaron en 5 micrones (Reichert Jung para parafina y RM2155 Leica para secciones de resina) y se montaron sobre portaobjetos de vidrio Superfrost/Plus (sin recubrimiento de gelatina). La parafina se retiró con xileno, y las secciones se llevaron a través de unas series de etanol descendente y a continuación ascendente (del 100 al 50%, VN e inversa). Las secciones secas se procesaron a continuación para autoradiografía de microscopio de luz mediante la fijación de cubreobjetos recubiertos de emulsión nuclear (Kodak, NTB2, diluida 1:1 con agua destilada) a las mismas. Después de secarse al aire durante 2 horas a temperatura ambiente se expusieron las autoradiografías durante 6 a 10 semanas en cajas aisladas de la luz a 4°C. Los cubreobjetos radiosensibles se desarrollaron en un desarrollador Kodak D19 (3 minutos) y se fijaron en un fijador Kodak (3 minutos). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Harris (Prolabo, Francia) y azul Toluidine (Sigma, Francia), deshidratadas y montadas en medio Eukitt. El tejido y los granos de plata subyacentes se vieron y fotografiaron con fotomicroscopio Leica equipado con óptica de campo brillante (DMRD Leitz, Leica).

15 F. Mapeado y cuantificación de absorción del 3H-pentapéptido por parte de los tejidos vivos

La determinación cuantitativa de la radiactividad en varias secciones de órganos se realizó usando un detector gaseoso de partículas β , que se han desarrollado recientemente (Chapak *et al.*, 1989; Tribollet *et al.*, 1991). Los datos de las secciones del cuerpo completo o secciones de órganos individuales colocadas en el detector de la cámara de gas se recogieron durante 8 horas, o 50 horas, respectivamente. El número de cuentas por píxel se registró en el generador de imágenes β 2200 (Biospace, Francia) con un detector de superficie de 20 x 20 cm², seguido por un análisis de imágenes asistido por ordenador con el programa β Vision usando un ordenador HP Vectra. La actividad del tritio se determinó como cuentas/m². La linealidad de este procedimiento de detección permitió la medición de la unión no específica del ³H-pentapéptido, medida en varias estructuras o compartimientos en la sección con sitios de no unión aparentes para el péptido (tejidos de fondo, por ejemplo músculo y sangre cardiaca excepto el cerebro y la cuerda espinal) o en la misma estructura marcada, en experimentos de desplazamiento.

En el caso de cuantificación radiactiva de las secciones de los órganos o extractos ácidos, usando un contador de centelleo líquido (MR300 Kronton), se determinó la actividad del tritio como cpm/mg de proteína. La concentración de proteína se determinó mediante el procedimiento Bradford (Bradford *et al.*, 1976).

30 G. Caracterización cromatográfica de absorción del péptido radiactivo por parte de los tejidos

Las características cromatográficas del compuesto marcado asociado, *in vivo*, con los órganos objetivo se determinaron mediante HPLC.

En puntos de tiempo seleccionados (2 y 180 minutos) después de la administración de pentapéptido tritiado, las ratas anestesiadas se sacrificaron (inyección de sangre cardíaca) y se retiraron rápidamente los tejidos sobre hielo. Los tejidos se homogenizaron inmediatamente a 4°C en 5-10 volúmenes de ácido clorhídrico 0,1 M usando un homogenizador antidifusor (la desmineralización del tejido óseo se realizó después de 24-48 horas a 4°C en hidrócloruro de guanidino y pretratamiento EDTA, con concentración final 4 M y 0,25 M, respectivamente). Los tejidos homogeneizados se centrifugaron durante 30 minutos a 4°C y 15.000 g. Para determinar la radiactividad total, se añadieron alícuotas de la solución sobrenadante a 50 volúmenes de Biofluor (NEN, Dupont de Nemours, Francia) y se contó en un contador de centelleo líquido.

Para determinar la radiactividad en la fracción de pentapéptido, las alícuotas de los extractos de tejido se sometieron a un procedimiento de extracción de metanol (Rougeot *et al.*, 1994) después de neutralización con Tris/HCl pH 8,5 que contiene DTPA 16 mM (ácido dietilenoTriaminaPenta-Acético, Sigma, Francia). La fase de metanol se retiró del sobrenadante mediante evaporación parcial, a continuación liofilización y se aplicó la fase acuosa reconstituida que contiene DTPA 16 mM a una columna ODS AQ (cromatografía HPLC RP C18) (AIT, Francia). Se realizó una elución con un gradiente lineal de trifluoro acético (TFA) 0,1% en agua/TFA 0,1% en acetonitrilo (Merck, Francia) de 100/0 (vol/vol) a 50/50 (vol/vol) durante 30 minutos, con un índice de flujo de 1 ml/min. Las fracciones se recogieron cada 60 segundos y se analizaron para su radiactividad usando un contador de centelleo líquido.

55 H. Secreción al torrente sanguíneo y farmacocinética del pentapéptido, *in vivo*

a) - *Secreción sistémica de pentapéptido bajo tensión éter o basal - y secreción glandular submandibular inducida de agente adrenérgico de ratas macho conscientes*

La secreción endógena al torrente sanguíneo *in vivo* de péptidos relacionados con el precursor SMR1, en particular el pentapéptido, fue investigada en ratas macho adultas conscientes.

Se colocaron ratas de 9-10 semanas de vida en una jaula expuesta a emanaciones de éter durante 2 minutos, o se colocaron durante 20-40 minutos en canastas metabólicas individuales después de la administración intra-peritoneal de agentes de secreción adrenérgicos (fenilefrina, 4 mg/kg más isoproterenol, 1 mg/kg) o vehículo (PBS de Dulbecco). En tiempos seleccionados, las ratas se anestesiaron con pentobarbital (45 mg/kg). Se tomaron muestras de sangre mediante punción cardíaca y se recogieron en tubos previamente enfriados que contienen una mezcla de inhibidores de peptidasa (EDTA 1 mM, Aprotinina 1000 U/ml, bestatina 130 μ M, leupeptina 1 μ M, pepstatina

ES 2 271 991 T3

1 μM). Se centrifugaron inmediatamente durante 15 minutos en 4000 g y 4°C. Las fracciones de plasma se sometieron a continuación a un procedimiento de extracción de columna Porapak Q (Rougeot *et al.*, 1988) y se probaron para el contenido de pentapéptido antes y después de las separaciones HPLC.

5 En resumen, las muestras de plasma acidificadas (concentración final de HCl 0,1 N) se aplicaron a cuentas de Porapak Q (Waters, Francia) empaquetadas en una columna de 0,5 X 2 cm. Después, se lavaron con TFA 0,1% en agua, los péptidos se eludieron con TFA 0,1% en metanol 50% (recuperación del pentapéptido marcador añadido fue del $93 \pm 6\%$, $n = 5$). Cada una de las muestras extraídas se analizaron a continuación usando un sistema HPLC (spectraphysic SP8000) conectado a una columna de carboximetil HEMA-IEC BIO-1000 (Alltech, Francia). La cromatografía de intercambio de cationes se realizó con un gradiente lineal de 30 minutos de una etapa de acetato de amonio 1-1000 mM
10 pH 4,6 con un índice de flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml y se probaron después de la liofilización para su contenido de pentapéptido. El procedimiento RIA y las características para las mediciones de pentapéptido se han descrito previamente (Rougeot *et al.*, 1994).

15 b) - *Estudios metabólicos y farmacocinéticos del pentapéptido*

Se investigó el transcurso de tiempo *in vivo* de la distribución, el metabolismo y la eliminación del pentapéptido en ratas macho adultas anestesiadas usando concentraciones fisiológicas de pentapéptido tritiado en circulación.

20 A las ratas macho anestesiadas se les dio una inyección intravenosa de bolus de 170 pmoles o 110 ng de pentapéptido tritiado diluido en 100 μl de PBS de Dulbecco. La sangre se recogió en tubos que contienen una mezcla de inhibidores de peptidasa descrita anteriormente, a través de un catéter silástico implantado en la vena yugular externa. La sangre se retiró justo antes y 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de pentapéptido. Se tomaron dos milímetros de sangre por rata en todas y se recogió el contenido de toda la vejiga urinaria en
25 un punto seleccionado final.

Las muestras biológicas se sometieron a centrifugación y a las condiciones de extracción de Parapak Q, tal como se ha descrito anteriormente. Se aplicó a continuación cromatografía usando el procedimiento HLPC descrito anterior y en la referencia (Rougeot *et al.*, 1994) a cada muestra extraída. El ODS AQ RP-C18 se usó para la identificación
30 de metabolitos de terminal amino y Pep RPC HR C18 (Farmacia, Francia) para la identificación de metabolitos de terminal carboxil. El contenido de radiactividad de las muestras antes y después de las separaciones cromatográficas se determinó usando un contador beta (Kontron, MR300).

Ejemplos

35 Ejemplo 1

Distribución de órganos objetivo de pentapéptido, hexapéptido o undecapéptido derivados de SMR1 marcado ^3H en ratas macho examinadas mediante autoradiografía de cuerpo completo (WBA)

40 La WBA tiene una aplicación considerable en estudios de unión al receptor y en el análisis del destino biológico de las proteínas y los péptidos. Cuando se aplica esta aproximación al examen de los tejidos objetivo potenciales del pentapéptido SMR1 derivado de SMG. El mapeado y el transcurso del tiempo de la distribución del tejido del pentapéptido radiactivo fue investigado en 90 segundos, 3 minutos, 60 minutos, y 240 minutos, después se inyectaron
45 sistémicamente 3 nmoles o 2 μg de pentapéptido ^3H en ratas macho de 5 semanas de vida. Para generar imágenes autoradiográficas de densidad suficiente en un tiempo de exposición razonable, y para apreciar la absorción específica comparada con el marcado no específico, se utilizó una cantidad de isótopo 6,66 MBq en estos experimentos. Aunque hemos usado péptido tritiado de alta actividad específica (2,22 TBq/mmol), la dosis de péptido infundido en la circulación resultó en cantidades de pentapéptido en sangre de 10 pliegues su nivel fisiológico (ver el capítulo siguiente).
50 Además, para eliminar la posibilidad de sitios de unión del péptido previamente ocupados por péptido endógeno, se usaron ratas macho pubescentes de cinco semanas de vida, ya que hemos mostrado previamente que los péptidos derivados del SMR1 eran detectables en la rata macho SMG solamente a partir de una edad postnatal de seis semanas (Rougeot *et al.*, 1994).

55 La distribución anatómica bruta de la absorción del pentapéptido ^3H 60 minutos después de la dosis, sobre todas las secciones sagitales del cuerpo de la rata se muestra en las figuras 1 y 2. Tal como se representa en los autoradiogramas representativos (Figuras 1-A, 1-B), sesenta minutos después de una inyección intravenosa bolus de pentapéptido radiactivo, fue evidente una acumulación densa y distinta de los granos de plata en el riñón y en todos los tejidos óseos, así como en el tejido dental, la mucosa glandular del estómago, los lóbulos pancreáticos y la glándula submandibular.
60 En este tiempo seleccionado, se apreciaron niveles moderados de marcado en el hígado, bazo, timo y pared intestinal. No el cerebro ni la médula espinal acumularon pentapéptido radiactivo, demostrando que una barrera sangre-cerebro astringente limitó la absorción del péptido *in vivo*.

La determinación del objetivo del péptido del tejido se realizó mediante una cuantificación de producción de
65 imágenes radio β (figura 2). El número de partículas β emitidas por unidad de superficie se recogió directamente a partir de las secciones del cuerpo completo, durante 8 horas. La linealidad y la selectividad de este procedimiento de detección permitió un medición relevante de las estructuras marcadas comparadas con el ennegrecimiento definido con un área anatómica seleccionada de la misma sección (aquí, sangre en el espacio cardíaco) (Tribollet *et al.*, 1991).

En el riñón, el páncreas, los huesos, los incisivos, la glándula submandibular y la mucosa gástrica glandular, la concentración de radiactividad 60 minutos después de la dosis, en cuentas/mm² por 8 horas, era marcadamente más alta, 4 a 10 veces, que la de la sangre en el corazón. Mucha más radiactividad estaba presente en estos espacios de tejido que la predicha por el mismo espacio sanguíneo anatómico (figura 3). Esta sobreestimación del plasma anatómico y de los espacios intersticiales puede reflejar la presencia de unión en el sitio receptor del péptido en estos tejidos (Whitcomb *et al.*, 1993). En el hígado, el timo, la pared intestinal y el bazo, la acumulación de tejido relativa era igual o menor que 2 pliegues del ennegrecimiento. Y, en todos los otros tejidos visualizados (músculo, gónada, cartilago, mucosa gástrica no glandular, cerebro) el nivel de radiactividad era igual, o menor, que en el área sanguínea, reflejando la restricción del péptido solamente en el plasma anatómico y en los espacios intersticiales de estos órganos (figura 3).

Los resultados de la absorción del hexapéptido ³H (figura 4) y del undecapéptido ³H (figura 5) indican claramente que los órganos objetivo de estos otros productos de maduración de la proteína SMR1 son casi los mismos que los órganos objetivo del pentapéptido. Específicamente, el riñón y el páncreas son los órganos preferidos, aunque el hexapéptido también es retenido muy eficientemente por la mucosa glandular del estómago.

El perfil dinámico de la absorción del pentapéptido ³H reveló que la radiactividad se distribuye rápidamente y se acumula diferencialmente tan rápido como en 90 segundos y 3 minutos, en el riñón, páncreas, tejido dental y pared glandular gástrica, con un tejido de relación sanguínea próxima a 2. La marca persistió en estos tejidos más de 240 minutos. Más precisamente, en el riñón, el marcado era predominantemente en la zona medular externa, a lo largo del transcurso del tiempo estudiado desde 90 segundos a 240 minutos después de la inyección (figura 1-A, 60 minutos después de la inyección). En el hueso, el marcado se visualizó predominantemente tan pronto como 90 segundos y 3 minutos, sobre las superficies del hueso periosteal (perioste). En los dientes, el marcado se acumuló de manera larga y duradera en la masa interna de la raíz de los incisivos, así como en el hueso alveolar. Por el contrario, en la sangre y en los órganos ricos en sangre tal como el pulmón y los músculos, la radiactividad se distribuyó ampliamente en 90 segundos y 3 minutos, pero de donde se excluyó completamente en 60 minutos. No se encontró radiactividad en el contenido intestinal 240 minutos después de la inyección, mientras que la vejiga tenía radiactividad, indicando que parte del pentapéptido y/o los metabolitos ha se había excretado en la orina. Esto es consistente con el alto marcado encontrado en la pelvis renal y la ausencia de marcado en el hígado 90 segundos y 3 minutos después de la inyección sistémica. Este resultado se puede explicar mediante una eliminación más eficiente del pentapéptido del flujo sanguíneo a través de la filtración glomerular que la limpieza hepática y la excreción biliar.

Para determinar si la especie radiactiva detectada es realmente el compuesto administrado, se analizaron tejidos homogeneizados ácidos de los órganos objetivo después de la extracción de metanol y la cromatografía de fase inversa, 2-20 minutos y 180-200 minutos después de la inyección sistémica de 2 µg o 3 nmoles de pentapéptido ³H. Se obtuvo una buena correlación entre el generador de imágenes radio β y los valores de contabilización del centelleo líquido para cada órgano, cuentas/mm² y peso del tejido cpm/g, respectivamente. Después de 5-20 minutos de tiempos de supervivencia, casi toda la absorción de radiactividad por parte de los tejidos se extrajo a partir de los tejidos homogeneizados ácidos mediante el solvente orgánico usado: 72 ± 4%. Mientras que 180 minutos después de la inyección de pentapéptido ³H, se recogió una fracción de péptido radiactivo solamente cuando se realizó la extracción de metanol de los tejidos homogeneizados, a los cuales se añadió DTPA (16 mM), un agente de quelación de metal fuerte: 53 ± 9%. Además, solamente bajo esta condición de extracción la cromatografía RP-HPLC reveló que la radiactividad fue recuperada predominantemente en el pico correspondiente al pentapéptido libre: 52 ± 8%. El resto de la extracción radiactiva representó metabolitos, o complejo péptido no disociado: 8 ± 6% y 29 ± 14%.

Tomados juntos, estos datos proporcionan una fuerte evidencia de una absorción selectiva, rápida y estable del pentapéptido por parte de la médula externa del riñón, mediante los lóbulos pancreáticos, mediante la mucosa glandular y mediante los tejidos óseos y dentales.

Ejemplo 2

Patrón de secreción al torrente sanguíneo del pentapéptido derivado de SMR1 en la rata macho adulta

Para apreciar la relevancia de la absorción de pentapéptido bajo condiciones fisiológicas, se investigó la concentración en el torrente sanguíneo endógeno de péptidos relacionados con la proteína del precursor SMR1, en particular del pentapéptido, en ratas macho adultas conscientes en respuesta a los estímulos farmacológico y de stress agudo. Las muestras de sangre y la extracción descrita en "procedimientos" se realizó en presencia de una mezcla de inhibidores de peptidasa más EDTA y bajo estas condiciones, el nivel de pentapéptido inmunoreactivo en plasma basal de las ratas macho de 10 semanas de vida fue: 1,9 ± 0,2 ng/ml, n = 5. En ratas anestesiadas, la respuesta a lo largo del tiempo a los agentes de secreción adrenérgicos de la secreción en sangre del péptido derivado de SMR1 habían revelado previamente que los péptidos mostraban niveles de circulación máximos en los 10-30 minutos siguientes a la administración peritoneal de la epinefrina (Rougeot *et al.*, 1994). En ratas macho conscientes, 20-40 minutos después de la inyección de la fenilefrina y el isoproterenol, se encontró que la respuesta inmunoreactiva al péptido en plasma era de 12,5 ± 5,4 ng/ml, n = 4.

La exposición de las ratas a vapor éter saturado durante 2 minutos se usa ampliamente para provocar stress, y su efecto sobre la secreción de adrenalina endógena y adrenocorticotropina, dos de los mediadores mayores de respuesta al stress, se bien conocida (Rougeot *et al.*, 1991; Van Herck *et al.*, 1991). La respuesta de la secreción adrenérgica

ES 2 271 991 T3

endógena a stress agudo de éter en ratas conscientes resultó en un nivel de circulación de pentapéptido inmunoreactivo de $7,0 \pm 4,1$ ng/ml, $n = 4$. La extracción y el fraccionamiento mediante HPLC de intercambio de cationes de las muestras de plasma obtenidas bajo condiciones farmacológicas o de stress agudo inducido mostraron que $56 \pm 21\%$, $n = 6$ de la fracción de péptido inmunoreactivo corresponde a pentapéptido libre; el resto corresponde principalmente a hexapéptido y undecapéptido derivado de SMR1. La cuantificación inmuno de la fracción de plasma del pentapéptido se puede determinar solamente si se realizaron el muestreo y las etapas de extracción sucesivas en presencia de EDTA o DTPA.

El rango fisiológico de pentapéptido en circulación, en ratas macho conscientes, se estableció, por lo tanto, en 1-7 ng/ml.

Ejemplo 3

Transcurso del tiempo en la distribución y la eliminación del pentapéptido derivado de SMR1 en plasma

Se investigó el destino *in vivo* del pentapéptido infundido en la circulación. El pentapéptido en plasma y sus metabolitos se midieron con el tiempo después de una única inyección de una cantidad fisiológica de 110 ng de pentapéptido tritiado en la circulación de dos ratas macho. La determinación de la fracción radiactiva de péptido en plasma se realizó mediante purificación RP Porapak Q, y la del pentapéptido radiactivo en metabolitos mediante cromatografía RP-HPLC. Después de alcanzar un nivel máximo en 2 minutos, la concentración de pentapéptido en plasma disminuyó rápidamente, volviendo a cerca de un nivel basal en 30 minutos (figura 6).

Los fraccionamientos de HPLC de los extractos de péptido en plasma revelaron que en el torrente sanguíneo un 35% del pentapéptido infundido se metabolizó en 4 minutos, y que se produjo proteólisis a partir de la parte amino terminal del péptido. De otra manera, el tratamiento de pH ácido en plasma antes de la extracción de porapak Q disoció parcialmente un complejo de sustancia de unión del pentapéptido, que representa aproximadamente el 45% de la fracción de péptido en circulación.

Se investigó la eliminación midiendo la radiactividad excretada a lo largo del transcurso del tiempo del experimento y se estimó en ratas anestesiadas, en 6 pmoles, eliminada a través de filtración glomerular, a lo largo de un periodo de 60 minutos. Aproximadamente el 80% de la radiactividad en la orina pareció que era metabolitos de pentapéptido.

Estos resultados sugieren que la distribución del pentapéptido en circulación en los tejidos era casi completa 30 minutos después de la inyección. Después de este periodo, para permitir la distribución total del péptido examinamos su absorción celular, 60 minutos después de la inyección con concentraciones fisiológicas de péptido ^3H .

Ejemplo 4

*Localización celular de sitios de unión de pentapéptido ^3H mediante autoradiografía microscópica con luz: radiomarcado *in vivo* 60 minutos después de la inyección de concentraciones fisiológicas en circulación de péptido ^3H*

La comprensión de la función del péptido relacionado con SMR1 requiere información sobre la identidad de la localización celular de sus sitios de unión en los tejidos objetivo identificados anteriormente. Este nivel de se puede conseguir solamente mediante el recubrimiento directo de las secciones de órganos radiomarcadas *in vivo* con una emulsión nuclear líquida radiosensible, estando previsto que el péptido radiactivo unido está reticulado de manera segura en los sitios de unión con aldehídos divalentes. Además, como la absorción de medicamentos u hormonas puede verse influenciada por la dosis, el significado de la absorción celular selectiva del pentapéptido se determinó usando concentraciones de circulación fisiológicas de la molécula tritiada. El volumen de distribución para el pentapéptido en la rata macho se calculó que era de 35-40 ml/100 g de peso corporal, lo que es similar al volumen del fluido extracelular. Para conseguir una concentración en plasma del pentapéptido final de 1-7 ng/ml, una rata macho de 100 g y de cinco semanas de vida requeriría una inyección sistémica de 40-280 ng de péptido marcado. Por lo tanto, ratas de cinco semanas de vida recibieron entre 110-160 ng de pentapéptido ^3H para reproducir las concentraciones en plasma de péptido fisiológico de ratas macho de diez semanas de vida para los siguientes experimentos: 1- localización celular de los sitios de unión del péptido, y 2- saturación regional y celular de los sitios de unión del péptido después de la coinyección de exceso de péptido no marcado.

Las autoradiografías de microscopio con luz del riñón revelaron la presencia de granos de plata confinados preferiblemente en el córtex interno profundo y la banda externa de la médula externa, sobre las células epiteliales del segmento S3 de la porción recta de los túbulos proximales. También se apreciaron granos de plata densos en los segmentos S1 y S2 de la porción inicial convoluta de estos túbulos (figura 7-A). No era noticable ninguna marca celular específica en los glomérulos, o en el epitelio de los túbulos distales y de recogida.

En la mucosa gástrica glandular, 60 minutos después de la inyección de pentapéptido ^3H , los granos de plata se distribuyeron exclusivamente en la mitad basal de las glándulas gástricas, sobre las células patrón o pépticas (figura 7-B). En el tejido pancreático, los granos de plata se concentraron de manera selectiva y homogénea sobre las células de acini (figura 7-C). No se observó ninguna marca en los diferentes conductos e islotes de Langerhans. Al contrario de lo esperado, en el tejido objetivo submandibular, no era identificable ninguna asociación celular selectiva de la marca.

ES 2 271 991 T3

Las figuras 7-E y 7-F representa una sección de parte de las vértebras torácicas y el extremo proximal de la tibia respectivamente, mostrando ambas el hueso trabecular. En el tejido óseo, la mayor acumulación de granos de plata se produjo exclusivamente en la superficie interna del hueso, en los espacios con tejido medular, los espacios del hueso trabecular. Los espacios intratrabeculares atrapan células óseas, principalmente los osteocitos y sus procesos largos citoplásmicos ocupan las lacunae y las canaliculi, respectivamente. En estos espículos de hueso, los granos de plata eran más densos sobre la capa canalicular que sobre la capa lacunar. La acumulación específica de granos de plata no era noticable en la placa de crecimiento cartilaginoso o en la médula hematopoiética (figuras 7-E, 7-F). La figura 7-D representa una sección en raíz del incisivo superior de la rata. En este tejido dental, los granos de plata se concentraron selectivamente sobre toda la capa de la dentina, a lo largo de la longitud de los túbulos dentilanes y del sistema canalicular.

En experimentos de desplazamiento, se examinó la distribución celular y del tejido total del pentapéptido ^3H , después de 60 minutos después de la inyección de 100 pliegues en exceso de péptido no marcado. El gran exceso de concentración de ligando frío resultó en el desplazamiento casi completo de la absorción de pentapéptido ^3H en la médula externa renal y la difusión de la marca hacia los conductos de recogida de la médula interna (figura 8-A). El exceso de péptido no marcado redujo la unión en varias extensiones en la mucosa glandular del estómago, los lóbulos pancreático y submandibular y el hueso largo, con un porcentaje de marcado específico de 38-61%, 37-55%, 51-91% y 29-38%, respectivamente. La floja reducción detectable de péptido radiomarcado se podría explicar por la baja abundancia de sitios receptores, o la presencia de productos de degradación radiactivos significativos distribuidos entre el plasma y el espacio intersticial, y puede oscurecer la unión saturable, *in vivo* (Whitcomb *et al.*, 1985). En nuestro experimento, parece que la efectividad en la detección de la unión saturable *in vivo* depende de la distribución de los sitios de unión del péptido en los órganos específicos, una distribución amplia (lóbulos pancreático y submandibular), o una distribución estrecha (huesos, estómago, riñón) y en la selectividad de los procedimientos de análisis usados, es decir, las cuentas de tejido totales o el análisis de diferencias regionales, respectivamente (figura 8-B, riñón, porcentaje de marcado específico entre el 12 y el 92%).

En el presente estudio, usando un procedimiento de marcado *in vivo* acoplado a un generador de imágenes de radio β cuantitativo de secciones del cuerpo de la rata al completo, los inventores demuestran que el pentapéptido derivado de SMR1 que circula tiene acceso a regiones selectivas en riñón, páncreas, glándula submandibular, hueso, diente y estómago. Los perfiles de absorción del tejido tienen características esenciales que permiten identificar los sitios de unión específicos *in vivo*, la unión es rápida (90 segundos después de la administración, a más tardar), estable (240 minutos), selectiva y saturable. También se ha demostrado que este péptido a modo de hormona se puede unir a estos sitios receptores del tejido en concentraciones de circulación fisiológicas de rata macho adulta.

Tal como se soporta por el análisis del generador de imágenes radio β cuantitativo y la cinética de la distribución y la eliminación del pentapéptido en el torrente sanguíneo de la rata, en 90 segundos, y 3 minutos (fase de distribución del péptido en circulación), la cantidad de pentapéptido en un tejido distinto refleja la suma de las cantidades en el plasma y el espacio intersticial más los sitios receptores de unión. En 60 minutos (fase de eliminación del péptido en circulación) y más tarde, la cantidad refleja el secuestro de los sitios de unión del péptido mediados. Por lo tanto, la medición de la selectividad y de la saturabilidad de la absorción celular y del tejido, realizada 60 minutos después de la administración del péptido, refleja realmente los sitios de unión específicos para el pentapéptido. Se demostró una distribución rápida y estable y una acumulación del pentapéptido en la médula externa del riñón, los lóbulos pancreáticos, la mucosa glandular del estómago y tejidos óseos periosteales y alveolares, así como en la estructura dentinal del incisivo. La falta de una absorción temprana del pentapéptido por la matriz ósea interna podría estar relacionada con un índice substancialmente más lento de intercambio entre la sangre y el fluido extracelular óseo, comparado con el intercambio entre la sangre y los fluidos extracelulares no óseos (Billinghurst *et al.*, 1982).

Los inventores extendieron este estudio mediante la identificación de la localización celular a la que se une el pentapéptido en cada tejido *in vivo*. Esta aproximación proporciona el sitio de acción, una etapa esencial en la determinación del papel del péptido derivado de SMR1 en ratas macho.

Los presentes resultados proporcionan una evidencia directa que los sitios de unión del pentapéptido están localizados en porciones específicas del nefrón de la rata macho, con una densidad de distribución en el área del córtex interno profundo y la banda externa de la médula externa, y en particular sobre las células epiteliales de segmentos S3, S2 y S1 de los túbulos proximales. Por lo tanto, desde un punto de vista histológico, lo que se ha encontrado evidencia un papel del pentapéptido en circulación en la regulación de la función renal en ratas macho adultas. La tabula convoluta proximal juega un papel mayor en la reabsorción de Na^+ , NCO_3^- , Cl^- , Ca^{2+} , PO_4^- , agua y solutos orgánicos tales como glucosa y aminoácidos. La actividad de la mayoría, si no todos, los sistemas de transporte epiteliales renales, está regulada hormonalmente mediante esteroides (esteroides gonadales y glucocortico-adrenales) y hormonas de péptido (hormonas pancreáticas, pituitarias y paratiroides). La mayoría de las hormonas que modulan la reabsorción tubular y los procesos de secreción actúan sobre los receptores de membrana y pueden ganar acceso a las células del flujo sanguíneo (Tisher *et al.*, 1996).

La visualización de los sitios de unión del pentapéptido en el área interna del hueso, el tejido óseo trabeculae y en la superficie ósea periosteal, el periostio, proporciona una evidencia *in situ* para un papel para el pentapéptido en la regulación de las actividades de remodelación ósea. Aunque la remodelación ósea es un proceso poco entendido, numerosos datos indican que esta actividad se asegura mediante varias hormonas, que incluyen esteroides (andrógenos, oestrógenos y glucocorticoides) y hormonas de péptido (hormona paratiroide, hormona del crecimiento, factor

de crecimiento de insulina-1, tiroxina, glucagón), derivadas del suministro sanguíneo al hueso. Además, en la unidad de remodelación ósea trabecular que tiene el mayor índice de movimiento óseo y la capacidad de respuesta de las hormonas, el pentapéptido se acumula sobre los largos procesos citoplásmicos de los osteocitos, los canalículos. Estos procesos de canales tubulares son adyacentes a los lacunae de osteocitos y se abren al fluido extracelular en la superficie ósea. Están implicados en la deposición, o resorción de los iones de calcio y fosfato que están presentes en el fluido extracelular óseo, y con la deposición de cristales de hidroxapatita. Además, el periostio es necesario en la regeneración ósea durante la reparación de fracturas (Jee *et al.*, 1988). Este descubrimiento sugiere que los péptidos derivados de SMR1 pueden contribuir a la regulación de la dinámica ósea y su movimiento en una rata macho adulta, como moduladores hormonales.

Además, el pentapéptido derivado de SMG también podría actuar como agente de transporte mineral, sin embargo su absorción exclusiva mediante la matriz ósea del esqueleto (no mediante la matriz cartilaginosa) y los túbulos proximales renales (no mediante túbulos distales) está reñida con esta hipótesis. También podría interactuar como agente efector de la actividad de la enzima de la membrana, que está implicada en la mineralización del esqueleto y en la reabsorción renal mineral. Sin embargo, la interacción péptido-enzima podría tener unas características de unión de alta afinidad para identificar su localización selectiva *in vivo* justo como se observó en el presente estudio.

Se obtuvo la evidencia de la existencia de los sitios de unión del pentapéptido localizados en los túbulos del incisivo dental de la rata. La capa de la dentina madura se postula que está implicada en la iniciación de un proceso de mineralización del diente (Bernard, 1972). Sorprendentemente, se ha indicado que la estimulación hormonal del movimiento del fluido a través de estos túbulos dentales puede ser dependiente en parte de factores paratídeos que son llevados por la circulación de los dientes (Leonora *et al.*, 1987; Tieche *et al.*, 1994).

La absorción del pentapéptido por el tejido dental y el hueso alveolar de los incisivos, que están sometidos en la rata a un crecimiento continuo y una rápida remodelación, respectivamente, proporciona una evidencia adicional que el pentapéptido derivado de la glándula submandibular está implicado en la regulación del equilibrio mineral entre el transporte mineral esquelético, dental y renal y así la homeostasis mineral. Además, en relación con las características de comportamiento específicas de la rata macho, estos datos sugieren que el pentapéptido derivado de SMR1 y regulado con andrógenos puede ser un componente, que funciona bajo circunstancias de stress que provocan su secreción sistémica, de un bucle de retroalimentación para regular los efectos laterales en cascada sobre el equilibrio mineral, satisfaciendo así los requerimientos homeostáticos minerales.

De otra manera, el intestino y el hígado, así como las glándulas salivares con todavía importantes sitios potenciales de manipulación y regulación de los iones. La absorción de pentapéptido moderada y retrasada mediante el intestino y el hígado podría estar relacionada con una débil distribución de péptido activo en estos tejidos. Además, la distribución celular retrasada y amplia de acumulación de péptido en la glándula submandibular podría ser debida a una producción endógena suficiente de péptidos derivados de SMR1 en concentraciones que ocupan sitios de unión disponibles, y/o una diferenciación funcional incompleta de células SMG de rata de 5 semanas de vida que están potencialmente implicadas en la absorción de péptido. Incluso, si se produce la diferenciación de células acinosas que segregan SMR1 durante las primeras seis semanas, las células ductales se diferenciaron completamente solamente a partir de 10 semanas de etapa de desarrollo después del nacimiento (Leeson *et al.*, 1959). Sin embargo, la acumulación específica del pentapéptido en los lóbulos submandibulares soporta la hipótesis de que los péptidos producidos de manera endógena actúan localmente. Además, como la concentración local de péptidos derivados de SMR1 podría ser mayor que el rango micromolar en SMG de rata macho adulta, el péptido en circulación se debilitaría si interviniera por completo en la función glandular.

Las células gástricas patrón y las células acinares pancreáticas son también objetivos para el pentapéptido, soportando la conclusión de que los péptidos derivados de SMR1 tienen un papel funcional en la modulación de la síntesis y/o secreción en las células de secreción de zimógeno y/o la secreción del fluido y los electrolitos en las células acinares. La secreción de las enzimas gástricas y pancreáticas digestivas está muy regulada y se liberan cantidades significativas de las enzimas solamente bajo la estimulación de las células zimogénicas, tal como se produce durante la alimentación (revisado en Hersey 1994 y en Jensen, 1994). Además, el mayor mecanismo de regulación de la secreción de enzimas se soporta generalmente que es la estimulación mediante secretagogos. Los receptores de secretagogos para una serie de hormonas de péptido se han descrito sobre estas células, incluyendo el péptido intestinal de secretina/vasoactiva y las familias de colecistoquinina (más péptidos de liberación de gastrina, taquiquininas para células acinares). La demostración de los sitios de unión de pentapéptido en estas células exocrinas soporta la hipótesis de un papel regulador de los péptidos derivados de SMR1 en el control sistémico de los procesos digestivos tempranos. Las características de cromatografía de la circulación y el péptido unido al tejido revelaron que el transporte y la absorción del péptido implica una especie molecular compleja que incluye un elemento de catión mineral. Para un acuerdo general, el pentapéptido derivado de SMG, como todas las hormonas mayores, se puede fijar a las moléculas de unión del plasma como depósito en circulación para evitar la degradación y/o para facilitar el transporte a continuación de la asociación a los sitios receptores de las células.

En conclusión, los datos presentados en la memoria inmediata llevaron a los inventores al descubrimiento que el pentapéptido derivado de SMR1 en circulación está principalmente implicado en el control hormonal del equilibrio mineral entre por lo menos cuatro sistemas: el hueso, el riñón, el diente y la circulación. Puede producirse un desequilibrio mineral en respuesta a circunstancias de stress agudo o crónico que incluyen intraspecies que luchan y sensaciones de dolor, sed, hambre y temperaturas dañinas. El pentapéptido dependiente de andrógeno en circulación

ES 2 271 991 T3

puede ser un componente de un bucle de retroalimentación que regula, en ratas macho adultas, la respuesta en cascada a la tensión ambiental en la que se modifican la absorción o la excreción mineral, controlando así la homeóstasis mineral.

5 Ejemplo 5

El complejo receptor celular que une in vivo el pentapéptido SMR1 se ha aislado y caracterizado bioquímicamente

Procedimiento experimental: Primeras etapas de purificación del sitio receptor de la médula externa del riñón.

10

El procedimiento presentado a continuación representa el resultado final de los estudios relativos a la optimización de las condiciones apropiadas al aislamiento específico del complejo pentapéptido receptor SMR1 molecular, cuya localización subcelular y características moleculares era desconocidas previamente.

15

La selección de la población molecular que se busca se hace realidad detectando de manera sistémica la radiactividad (^3H) creada por el ligando (pentapéptido SMR1) que está en sí mismo reticulado de manera covalente en su sitio receptor celular.

Como la unión y la reticulación se realizaron *in vivo*, se asegura la relevancia fisiológica de esa interacción.

20

Los sitios receptores de tejido objetivo se radiomarcaban *in vivo* mediante el pentapéptido SMR1 tritidado (procedimiento usado para las localizaciones celulares, Rougeot *et al.*, Am. J. of Physiol., 1997).

25

- 45 minutos después de la inyección del ligando radiomarcado (300 ng), el sujeto (rata) se infunde (KREBS; +4°C) para retirar el péptido libre y el péptido con una baja absorción por parte de los órganos objetivo (no específicos).

30

- La reticulación covalente del ligando radiomarcado en los sitios objetivos se obtiene después de una infusión con agentes de conjugación para las aminas primarias, lisina epsilon, o arginina de guanidinio (paraformaldehído + glutaraldehído: 0,5% en presencia de glucosa: 2,5%, cloruro de calcio: 1,2 mM y DMSO: 0,5%).

30

- Los riñones, el páncreas, los huesos femorales, los incisivos y la mucosa gástrica glandular se retiran rápidamente, se lavan y se incuban a +4°C en presencia de formaldehído 0,25% + glucosa 2,5% durante 3 a 17 horas.

35

- Los órganos se lavaron con PBS 25 mM pH 7,4 y se incubaron en presencia de glicina 0,2 M a +4°C para asegurar la saturación del resto de grupos de aldehído libres.

40

- Los órganos se diseccionaron: la médula externa del riñón, el contenido mineral y orgánico de los incisivos y los huesos femorales.

40

- Los tejidos cortados en piezas se lavan a +4°C con 20 vol de PBS (en dos etapas de 10 vol cada uno) en presencia de inhibidores de proteasa (ver cócteles en Am. J. Physiol., Rougeot *et al.*, 1994).

45

- Los tejidos se muelen a +4°C (homogenizador Potter) en 2 x 10 vol. de acetato de amonio (AcNH_4) 5 mM pH 8,8 en presencia de inhibidores. El tejido homogenizado es sonificado a +4°C y a continuación se centrifuga a 1000 g a +4°C durante 15 minutos. Los supernatantes (= extractos totales) contienen típicamente 60-85% de la radiactividad inicial contenida en el extracto crudo.

50

- La fracción soluble (proteínas citosol) se separa de los componentes insolubles (membranosos) después de una centrifugación a 100 000 g durante 30-60 minutos a +4°C.

55

- Dependiendo de los tejidos, los supernatantes de citosol juntan el 30-50% de la radiactividad contenida en el extracto crudo. La radiactividad citosol se supone que representa la internalización y/o los componentes de degradación intracelular del complejo ligando radiactivo/receptor. Los mayores puntos isoeléctricos son de 5,23-5,85 y sus pesos moleculares aparentes son ≥ 6 kDa (figuras 21-24).

60

Los diferentes ensayos conducidos con las preparaciones de la membrana de la médula externa del riñón y varios tipos de detergentes:

- un detergente amforético o ión anfótero, tal como Chaps®

- un detergente no iónico tal como NP40 o Hecameg®

65

- un detergente aniónico tal como SDS

ES 2 271 991 T3

5 todos usados en concentraciones micelares críticas (CMC) revelan que solamente el SDS proporciona una solubilización completa del complejo radiactivo empezando desde las preparaciones de la membrana (tabla 1, figura 9). Aunque el SDS tiene una excelente potencia de solubilización, las interacciones con las proteínas son tales que, por un lado, es desnaturizador, y por otro lado, es difícil de retirar y también interfiere con los sistemas de separación cromatográficos, haciendo así imposible cualquier separación resolutive de las diferentes poblaciones moleculares. Por lo tanto, los inventores han llevado al uso de un agente de solubilización del tipo amforético, teniendo las sulfobetainas SB14 y SB201 un bajo efecto de desnaturalización pero remarcablemente eficiente respecto a las proteínas asociadas con la doble capa de lípidos de la membrana a través de varios dominios de transmembrana (Vuillard *et al.*, *Biochem. J.* 305, 337-343, 1995).

10 Además, los SBs hacen posible el uso posterior de varios sistemas de separación tales como isoelectrofocalización (IEF) de flujo líquido de preparación que permite la separación de la población molecular basada en su punto isoelectrónico (pHi).

15 Dependiendo de las preparaciones de la membrana tisular, se solubiliza del 40 al 90% del complejo de la membrana radiactiva, en presencia de ese agente de solubilización.

20 Las etapas posteriores consisten en aislar el complejo radiactivo empezando a partir de las preparaciones de membrana solubilizada de la médula externa del riñón mediante varios sistemas de separación, y al mismo tiempo delimitando algunas de sus características moleculares que son comunes o diferentes para los diferentes tejidos objetivo: Aquí otra vez el procedimiento propuesto es uno que es el resultado final de varias pruebas para optimizar las condiciones apropiadas para el aislamiento específico del receptor molecular del pentapéptido receptor de SMR1.

25 - la isoelectrofocalización (IEF) de flujo líquido de preparación (gradiente de amfolito en Rotofir, Biorad) se ha seleccionado como la primera etapa para purificar las proteínas de la membrana solubilizada que contiene en complejo sitio receptor/pentapéptido SMR1 (Marchase *et al.*, *Arch. Biochem. and Biophys.* 280: 122-129, 1990; Rich *et al.*, *Technique 1*: 1-203, 1989; Vesper *anal. Biochem.* 182: 217-221, 1989 y Petrash *et al. electroforesis* 12: 84-90, 1991). Los extractos solubilizados en SB14/SB20 se aplican directamente y se somete a un campo eléctrico continuo (500-30 1000 voltios) durante 3 horas a través de un gradiente lineal de punto isoelectrónico que varía entre 3 y 11.

Tal como se representa en la figura 10, para las proteínas de la membrana solubilizadas desde la médula externa del riñón, este procedimiento de separación basado en el punto isoelectrónico es muy resolutive. El pico radiactivo coincide con una baja cantidad de proteínas (actividad máxima específica/cpm/mg de proteína).

35 Las proteínas con un pH alcalino que son predominantes se retiran de esta manera.

En lo que se refiere a la médula externa del riñón, la(s) población(es) molecular(es) radiactiva(s) tiene(n) un pH de 5,89.

40 A pesar de un rendimiento de purificación relativamente bajo (20-40%) el procedimiento de purificación se ha usado para aislar el complejo del ligando y el sitio receptor renal.

45 Además, una etapa analítica de cromatografía de exclusión del tamaño que permite la separación de las especies con un peso molecular comprendido entre 6 y 500 kDa ([®]Superdex 200, Pharmacia) muestra que las fracciones resultantes de la isoelectrofocalización de las preparaciones de la membrana de la médula externa del riñón representan una población radiactiva predominante con un peso molecular de 130 kDa (figura 13) determinada mediante una calibración representativa (log PM*VeNm figura 13).

50 - una cromatografía líquida (FPLC) que usa una fase C₁₈ inversa estacionaria (Rep RPC Pharmacia) representa la segunda etapa de purificación. Como los dominios transmembrana de las proteínas de la membrana son dominios muy hidrofóbicos, era razonable asumir que el sitio receptor para el pentapéptido SMR1 igualmente poseía esa característica.

55 Después de la diálisis y la liofilización de las fracciones IEF radiactivas, el liofilizado se disuelve en acetato de amonio 5 mM pH 8,8 aplicado a la columna en su cabezal y sometido a un gradiente lineal de acetonitrilo (ACN) de 1-100% durante 30 minutos con un índice de flujo de 0,75 ml/min (figuras 14 y 15). Tal como se representa en la figura 15, esta etapa es también muy resolutive. Las dos poblaciones radiactivas coinciden en una baja cantidad de proteínas que se detectan en 280 nm.

60 En esta etapa, es necesaria una etapa analítica para controlar la pureza de las fracciones radiactivas aisladas, a saber, las eluadas mediante acetonitrilo 40%.

65 Esta etapa analítica se realiza después de una etapa de migración electroforética sobre geles acrilamida en condiciones de desnaturalización (SDS-PAGE) de las fracciones resultantes del procedimiento de cromatografía, seguida por una etapa de revelación de las fracciones mediante tinte con nitrato de plata. Los resultados preliminares indican que la población molecular representada mediante el pico 1 de radiactividad (tiempo de retención de 6 minutos) resultante del C₁₈-RP (tiempo de retención de 6 minutos) corresponde a dos bandas con un peso molecular (MW) entre

ES 2 271 991 T3

100 y 200 kDa. El pico 2 de radiactividad (tiempo de retención de 20-22 minutos en FPLC C₁₈-RP) corresponde a una banda detectable (con un MW entre 100 y 200 kDa).

Características químicas de los diferentes sitios receptores tisulares

5 En el transcurso de varios procedimientos realizados para el ajuste de las etapas de purificación del sitio receptor de la médula del riñón (tejido que forma predominantemente el pentapéptido SMR1 junto con el páncreas) hemos determinado también algunas de las características bioquímicas que son comunes o distintas para los diferentes tejidos objetivo.

10 Los procedimientos de isoelectrofocalización sucesivos revelan que las poblaciones receptoras del ligando molecular radiactivas tiene un punto isoeléctrico de:

- 5,64 ± 0,30, n = 10 determinaciones para la médula externa del riñón (figura 16);

15 - 5,58 ± 0,30, n = 3 determinaciones para los lóbulos pancreáticos (figura 17);

- 6,62 ± 0,35, n = 3 determinaciones para la mucosa gástrica glandular (figura 18);

20 - entre 4,2 y 4,9 para la población predominante y de 5,6 para la segunda población de la matriz trabecular ósea (figura 19, n = 1); y

- 5,74 - 6,08, n = 1 para la matriz dentinal (figura 20).

25 Tomados juntos, estos resultados sugieren que están presentes por lo menos 2 poblaciones moleculares de los sitios receptores para el pentapéptido SMR1: una con un pHi de 5,58/5,64 ± 0,30, representada principalmente en la médula del riñón, el páncreas y en menor extensión en la matriz trabecular ósea - y dentinal -, y la otra con un pHi de 6,62 ± 0,35, representada principalmente en la mucosa gástrica glandular. La tercera población con un pHi de 4,5 ± 0,4 que está presente en la matriz trabecular ósea necesita una confirmación adicional, porque la presencia de altas cantidades de componentes minerales en esa matriz puede introducir algunas modificaciones en los parámetros de la separación IEF.

35 Las cromatografías de exclusión de tamaño sucesivas se han usado como etapas analíticas más que preparativas (pobre procedimiento resolutivo) o como una etapa para la retirada de los agentes de solubilización (que realmente no se produjo).

40 Los cromatogramas (figuras 21 a 24) representativos de cada tejido revelan que las poblaciones moleculares radiactivas tienen un peso molecular aparente entre 200 y 400 kDa. Estas poblaciones con un alto peso molecular encontradas en todos los tejidos objetivo se corresponden realmente a las microcélulas "detergentes de proteínas" bajo las circunstancias analíticas, estando así el peso molecular de la proteína receptora algo sobreestimado.

45 (Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 271 991 T3

Riñón: médula externa	Cpm (pentapéptido unido a SMR1)	Rendimiento	Actividad específica
Homogenato crudo	130 000		43 200 cpm/mg de proteínas
Extracto completo (1000 g)	105 600	81%	
Fracción soluble citosol 100 000 g	26 000	27%	21 533 cpm/mg de proteínas
Fracción insoluble membrana 100 000 g	40 560	61%	
Fracciones membrana solubilizadas: chaps 5%	2 520	6%	
Fracciones de membrana solubilizada: NP40 1%	3 200	8%	
Fracciones de membrana solubilizada: hecameg 0,35%	1 520	4%	
Fracciones de membrana solubilizada: SDS 0,2%	35 140	87%	139 900 cpm/mg de proteínas
Fracciones de membrana solubilizada: SB 14 1 % + SB201 IM	28 040	69%	46 733 cpm/mg de proteínas

Como es evidente a partir de las enseñanzas de la memoria, la invención no está limitada en ámbito a una o varias de las realizaciones detalladas anteriormente; la presente invención también abarca todas las alternativas que se puedan realizar por parte de un experto en la materia en el mismo campo técnico, sin desviarse del objeto o del ámbito de la invención.

ES 2 271 991 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para determinar la cantidad de XQHNPR o uno de sus derivados biológicamente activos que se han de administrar a un paciente que sufre de un desequilibrio de iones minerales, que comprende las etapas de:
- a) incubar un péptido XQHNPR marcado con un anticuerpo policlonal o monoclonal dirigido contra el mismo péptido;
- 10 b) llevar en contacto complejos inmunes formados con una muestra biológica de un paciente que se ha de probar sospechoso de contener un péptido XQHNPR endógeno no marcado;
- c) detectar péptidos marcados unidos al anticuerpo monoclonales o policlonales que no se han desplazado mediante el péptido XQHNPR endógeno no marcado contenido en la muestra biológica para determinar una concentración de dicho péptido endógeno que está contenido en la muestra biológica;
- 15 d) comparar dicho péptido endógeno del péptido XQHNPR encontrado en la etapa c) con la concentración del péptido XQHNPR normalmente encontrada en un individuo sano; y
- 20 e) calcular la cantidad de composición terapéutica, que comprende una cantidad farmacéuticamente activa de una proteína SMR1, o un producto de maduración de la proteína SMR1 o de uno de sus derivados biológicamente activos, necesaria para suministrar el defecto del péptido XQHNPR en los fluidos y los tejidos corporales.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho péptido XQHNPR es QHNPR.
- 25 3. Composición que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de:
- una proteína SMR1;
 - un producto de maduración SMR1; o
 - 30 - un derivado biológicamente activo de los anteriores;
- en combinación con una cantidad farmacéuticamente efectiva de una molécula implicada en la regulación de un equilibrio de iones minerales que se selecciona entre el grupo que consiste en hormona paratiroide (PTH), calcitonina (CT) y 1,25-dihidroxitamina (D).
- 35 4. Composición según la reivindicación 3, en la que dicho producto de maduración SMR1 es un péptido XQHNPR.
- 40 5. Composición según la reivindicación 4, en la que dicho péptido XQHNPR es un pentapéptido QHNPR o un polímero del mismo.
6. Utilización de una proteína SMR1, o un producto de maduración de la proteína SMR1 o de uno de los derivados biológicamente activos para la preparación de un medicamento para evitar o tratar un desequilibrio de iones minerales en un mamífero.
- 45 7. Utilización según la reivindicación 6, para el tratamiento de un desorden que afecta a los huesos, dientes, renal, riñón, intestino, páncreas, mucosa estomacal, o paratiroide, provocada principalmente por un desequilibrio de iones minerales.
- 50 8. Utilización según la reivindicación 6 ó 7, para evitar o tratar un desorden que afecta los huesos provocado principalmente por un desequilibrio de iones minerales.
9. Utilización según la reivindicación 8, para evitar o tratar la osteoporosis.
- 55 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que dicho mamífero es un humano.
11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que el medicamento comprende un péptido de fórmula XQHNPR, donde X es un átomo de hidrógeno, un amino ácido V o R, o un polipéptido VR, VRG, VRGP, VRGPR o VRGPRR, o uno de sus derivados biológicamente activos.
- 60 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que el péptido XQHNPR o uno de sus péptidos derivados biológicamente activos comprende uno o más amino ácidos en la forma D.
- 65 13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que el medicamento es una solución líquida.
14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que el medicamento es un gel.

ES 2 271 991 T3

15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que el medicamento es un polvo seco.

16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que el medicamento es un dispositivo de suministro de medicamento controlado.

5

17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que el medicamento se administra localmente cerca de un sitio que se ha de tratar.

18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en la que el medicamento que se administra mediante vía oral.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

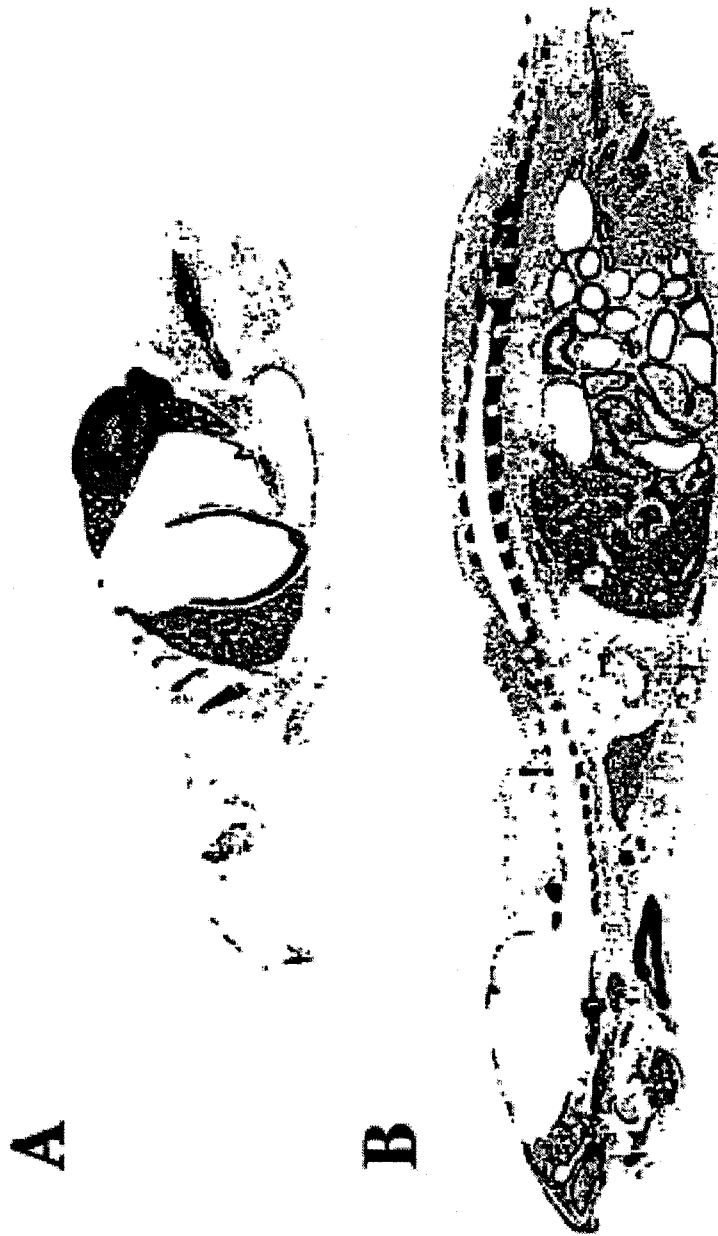


FIG.1

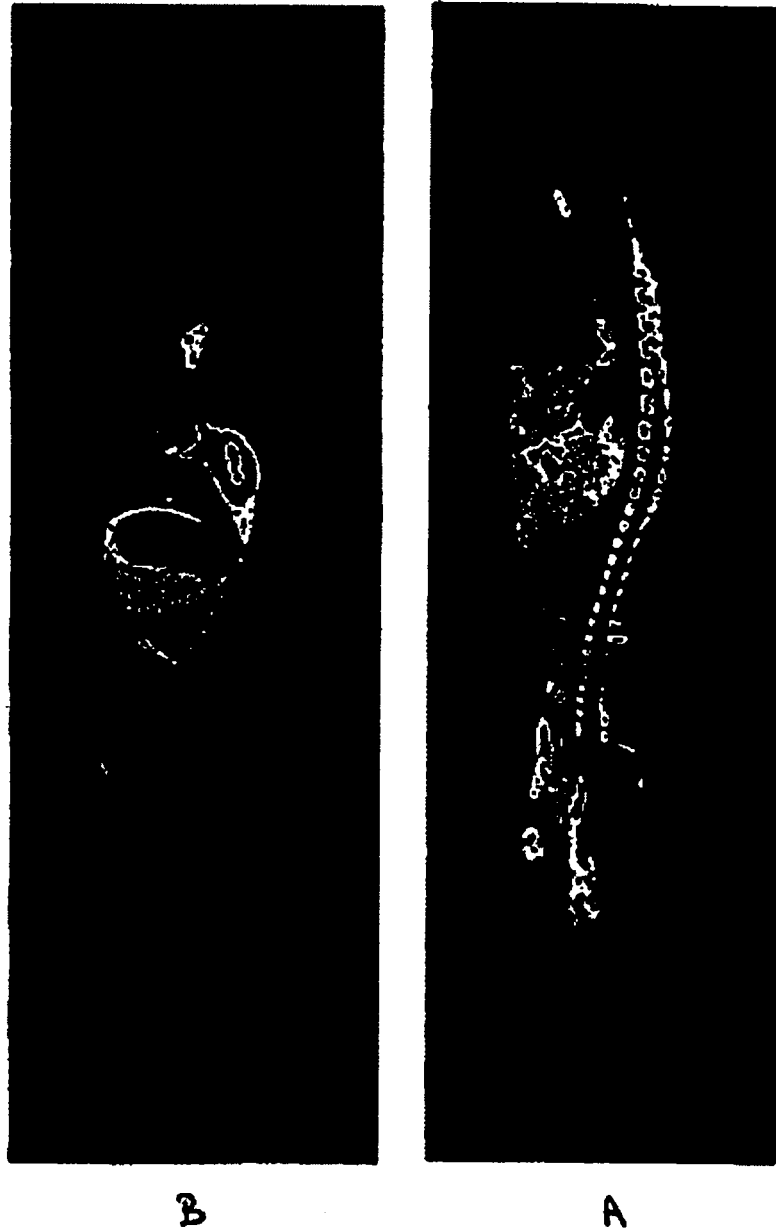


FIGURA 2

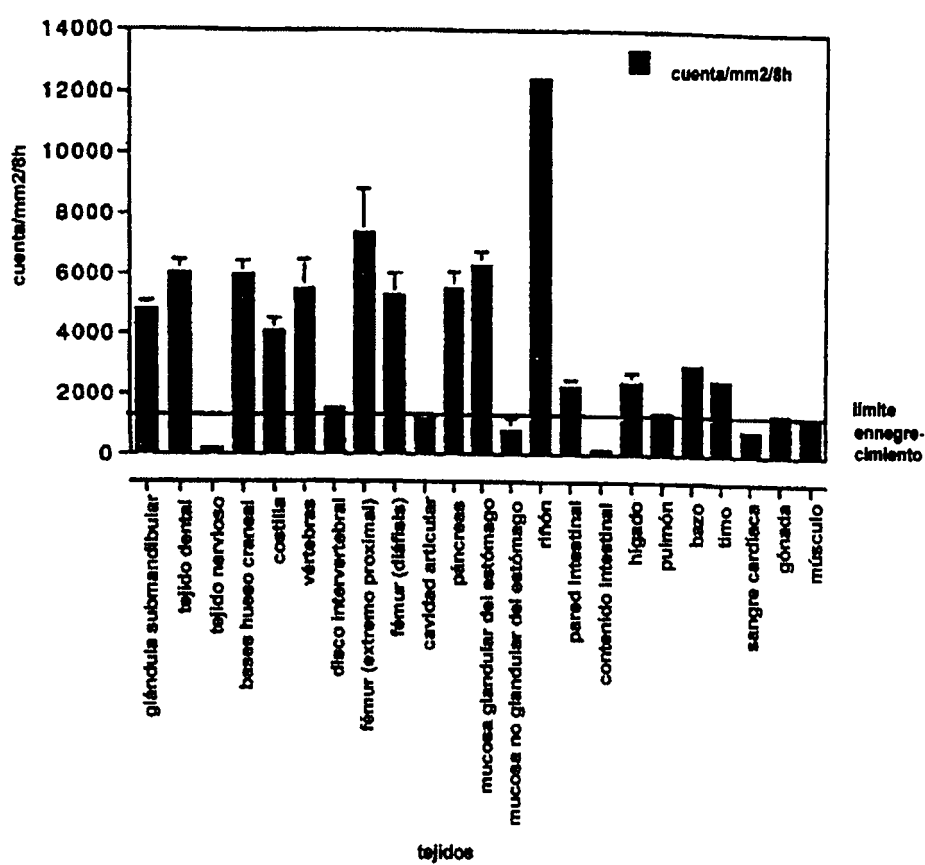


Figura 3

Distribución del fármaco de hexapéptido
60 minutos después de inyección i.v. de 100 pmoles
de péptido marcado

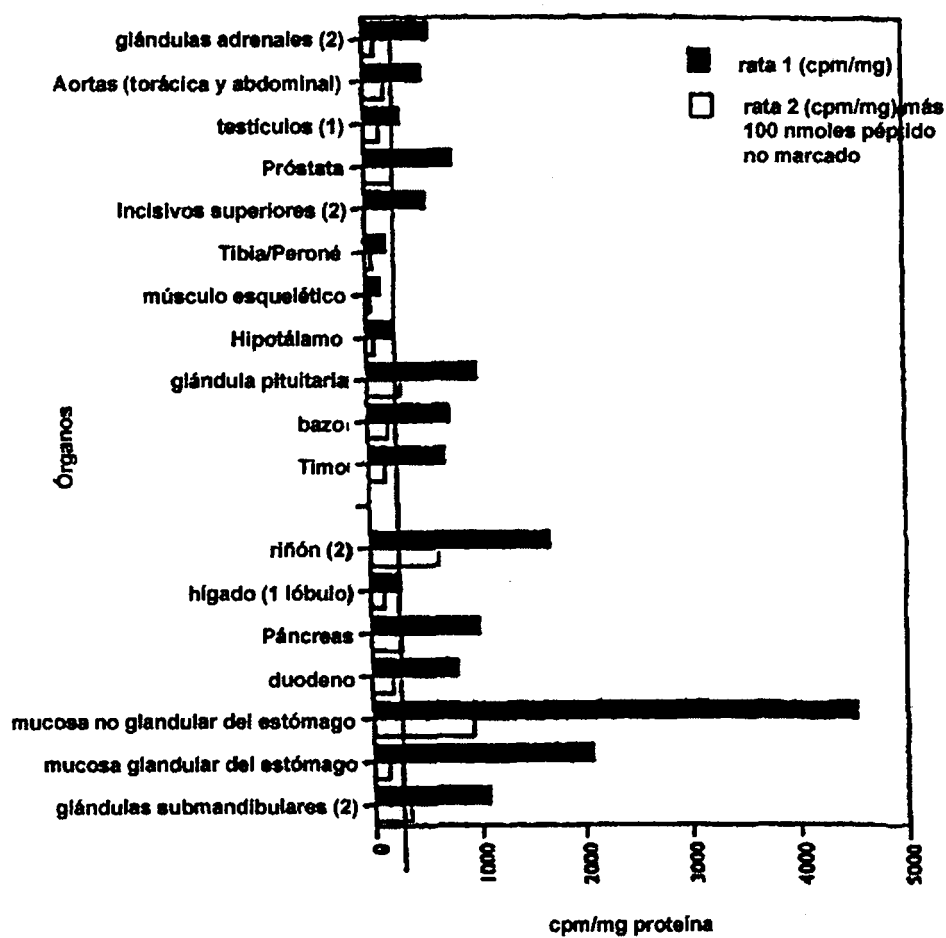


Figura 4

Distribución de fármaco de undecapéptido 10 minutos después de inyección i.v. de 5 pmoles de péptido marcado

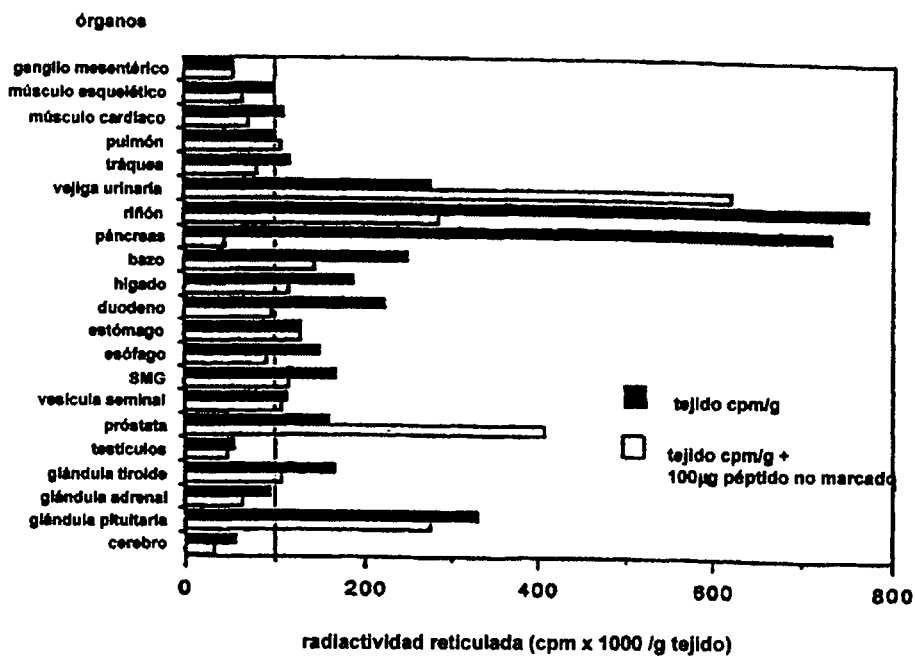


FIGURA 5

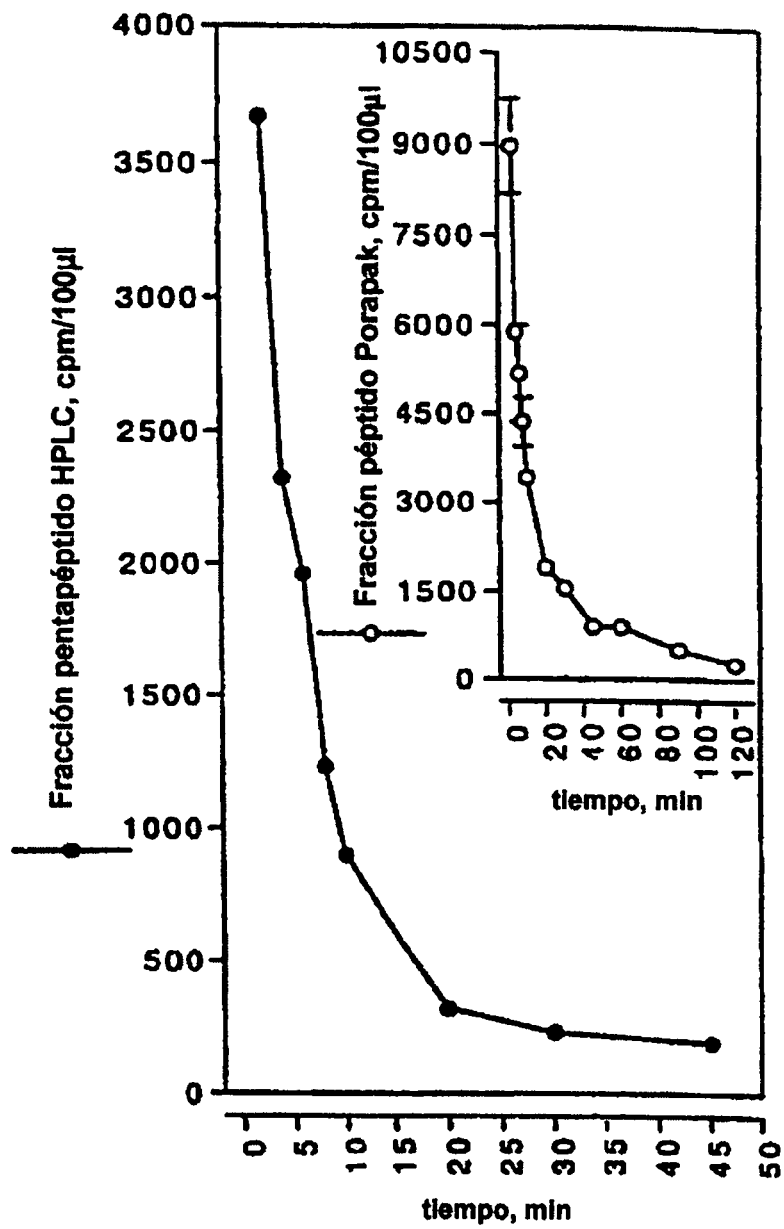
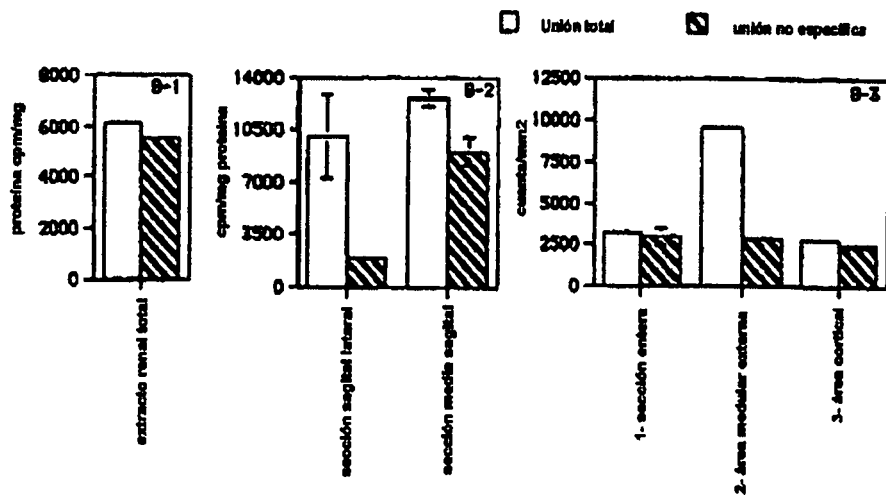


Figura 6

B



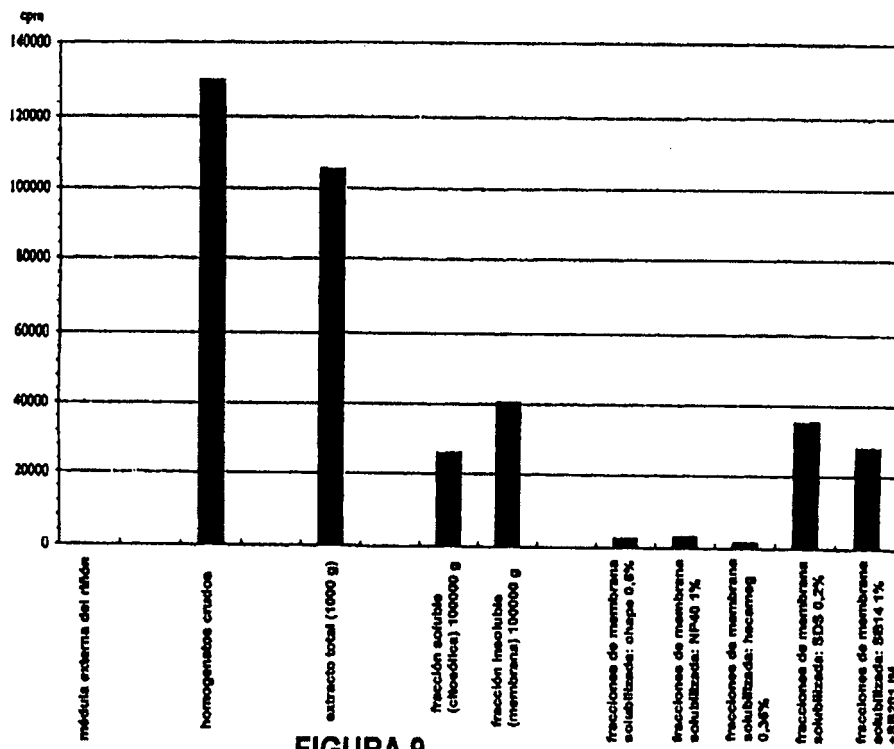


FIGURA 9

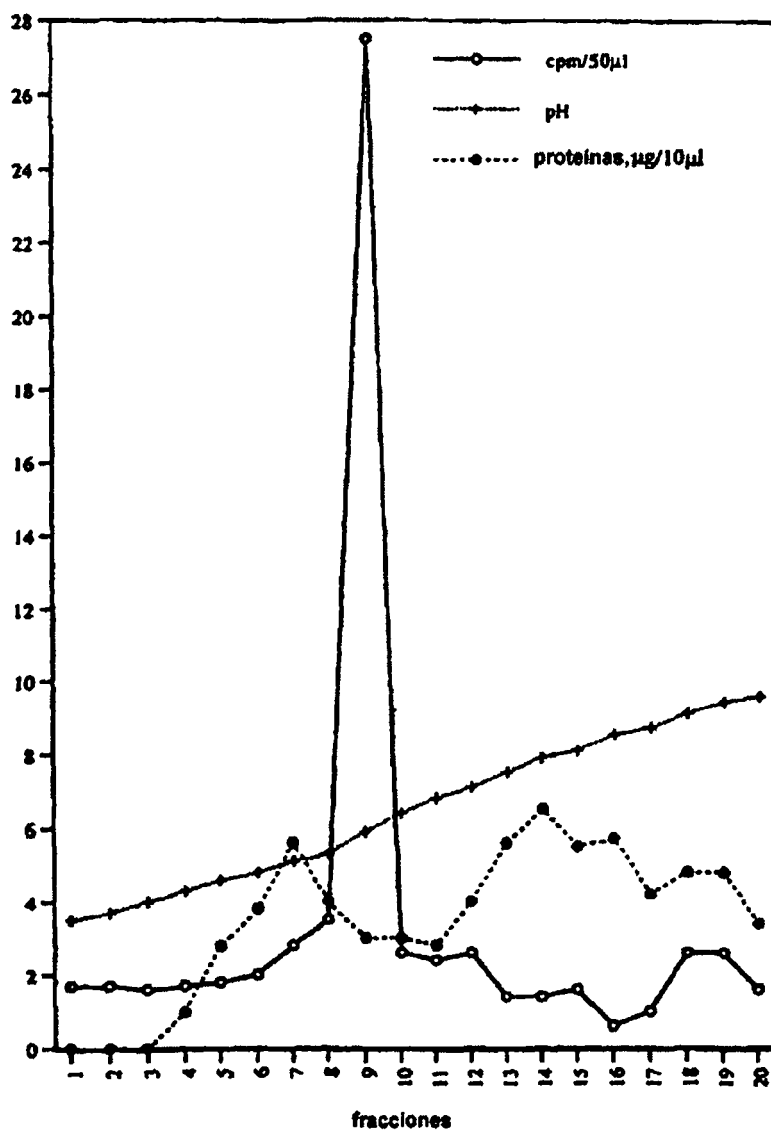


FIGURA 10

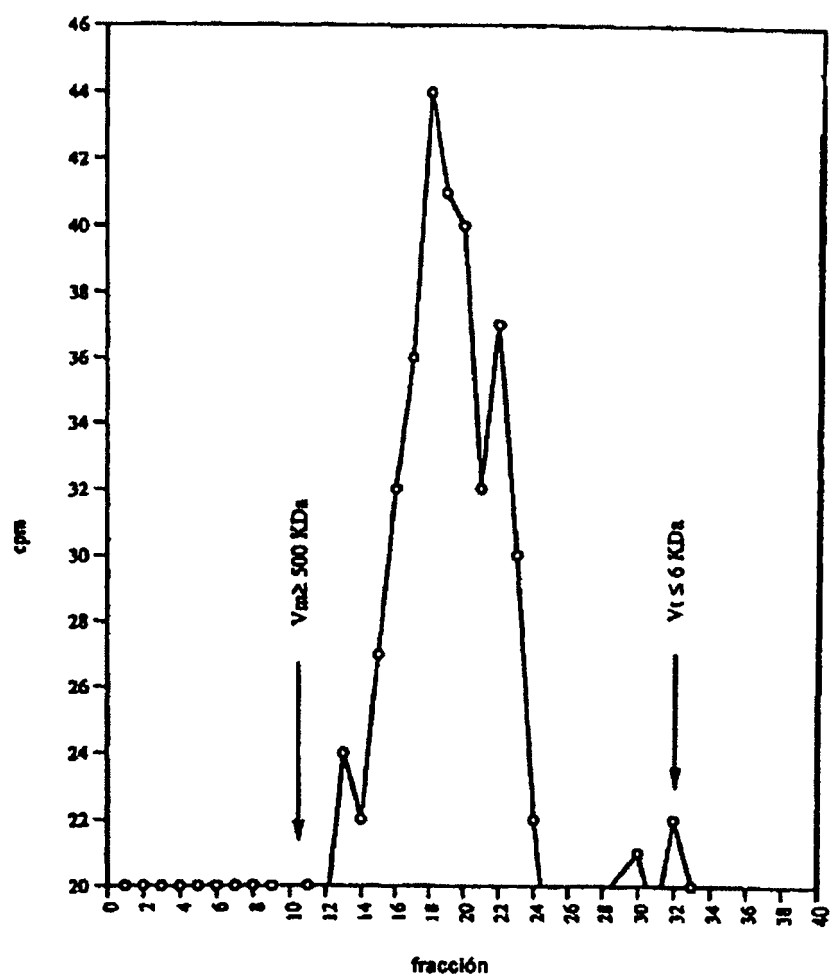


FIGURA 11

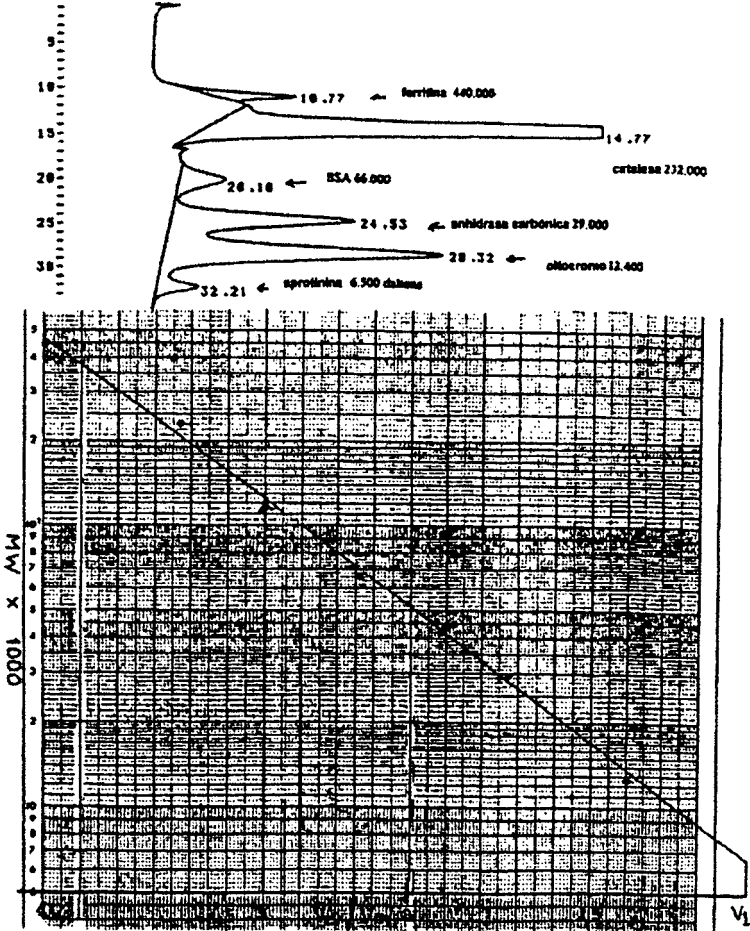


FIGURA 13

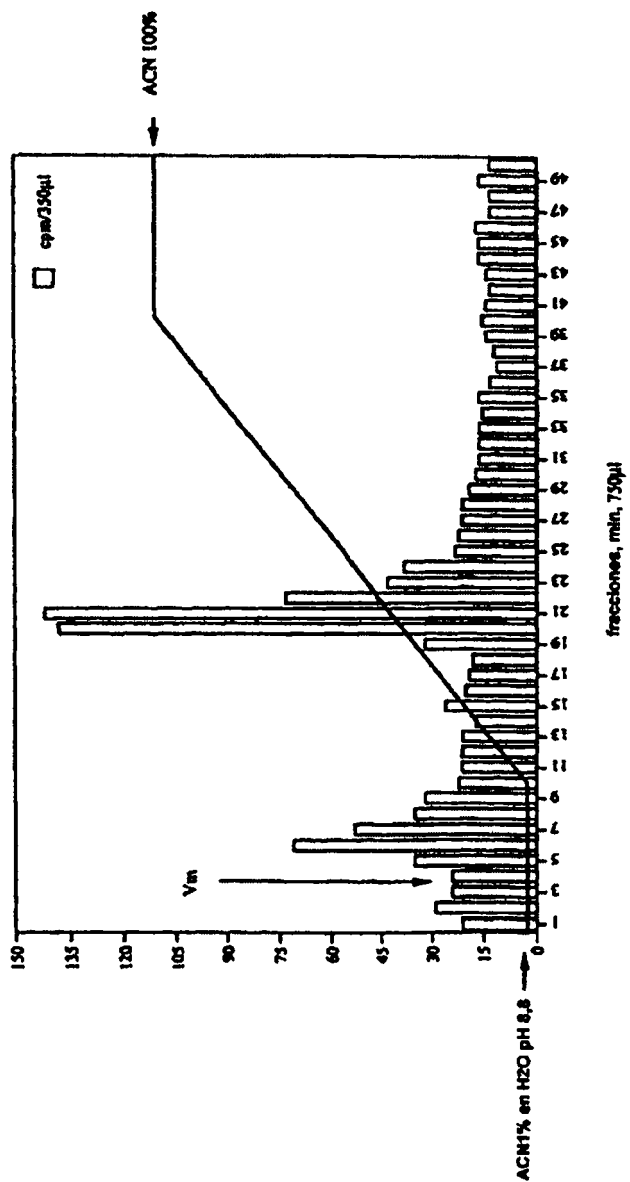


FIGURA 14

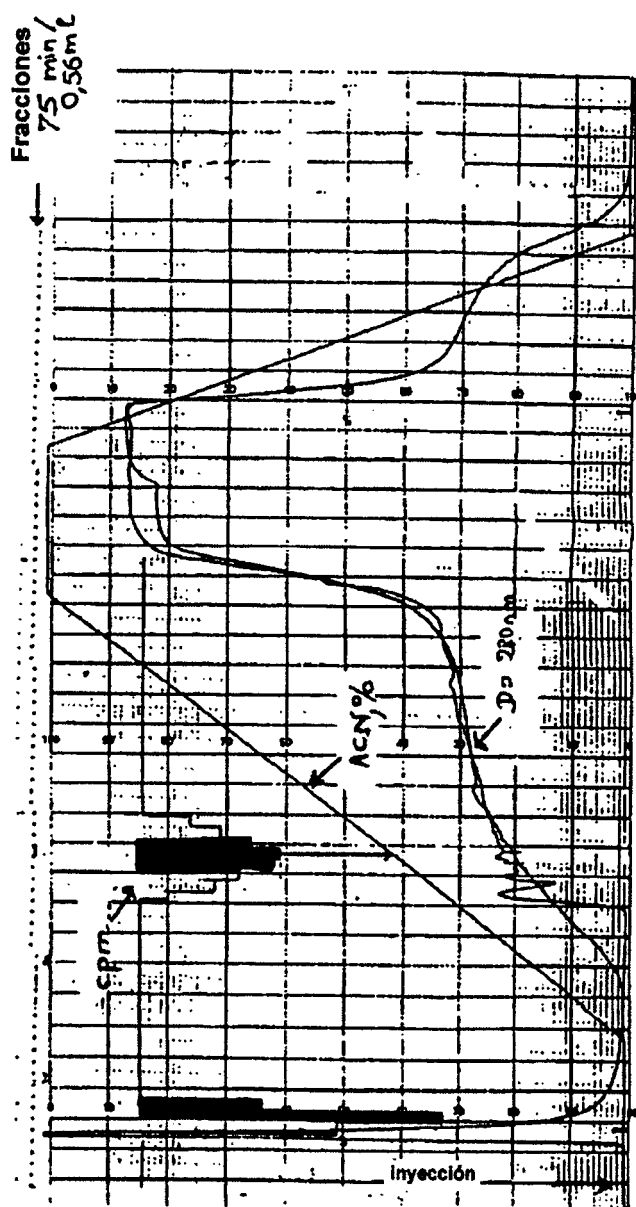


FIGURA 15

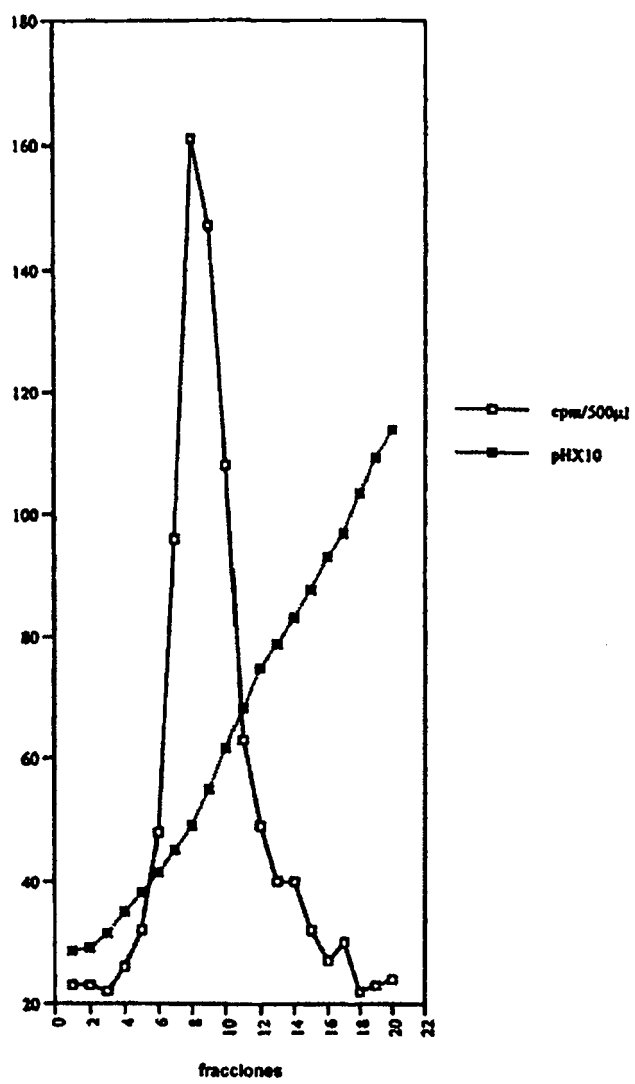


FIGURA 16

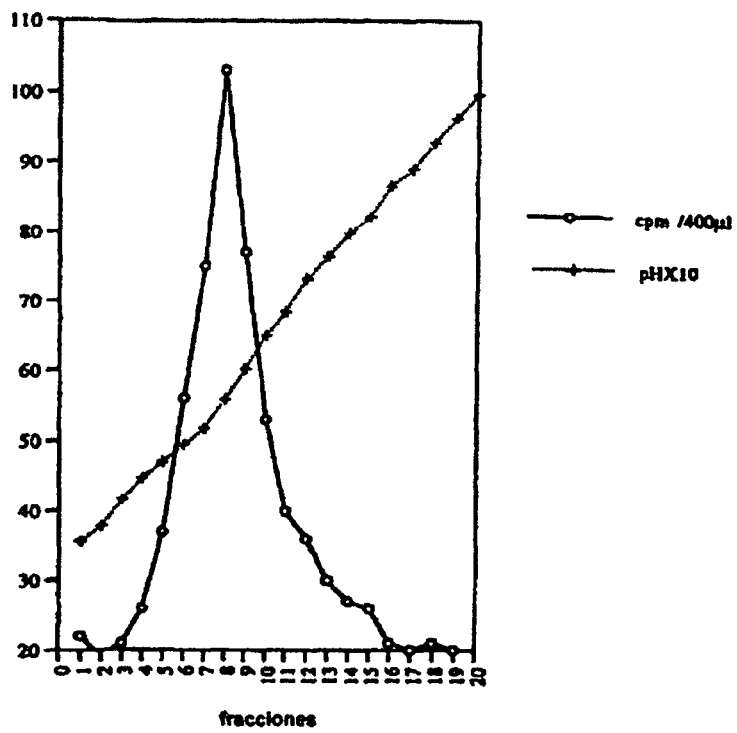


FIGURA 17

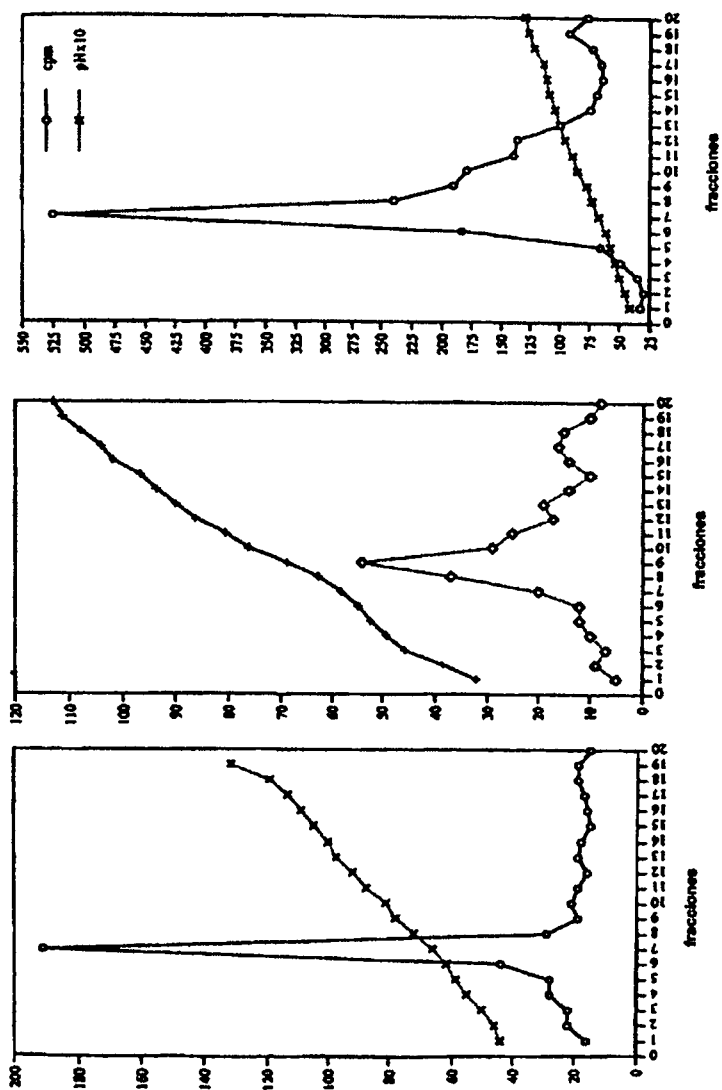


FIGURA 18

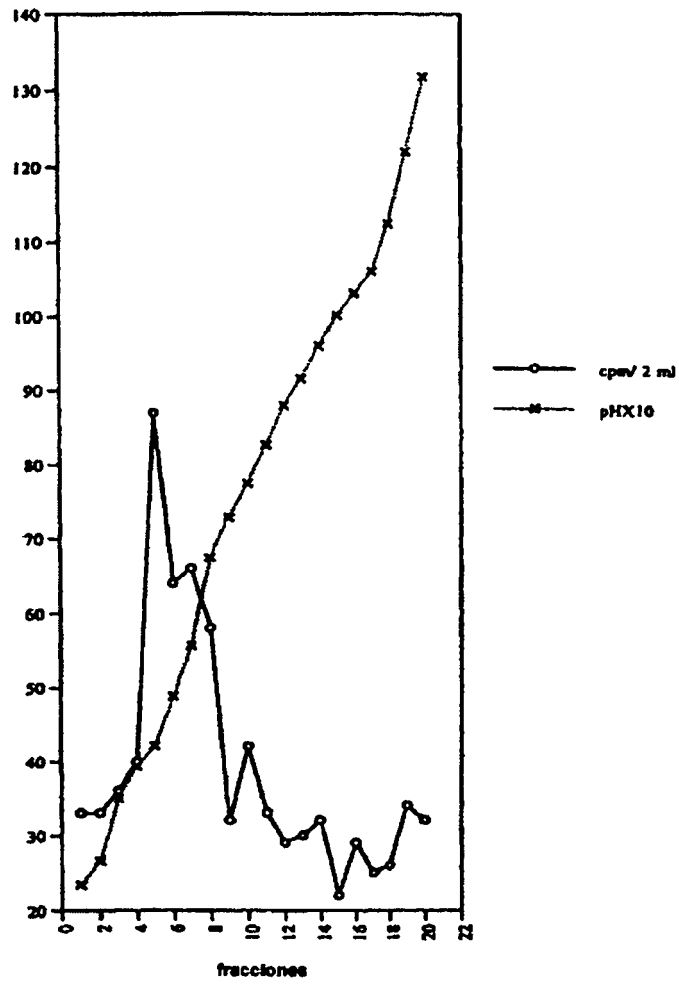


FIGURA 19

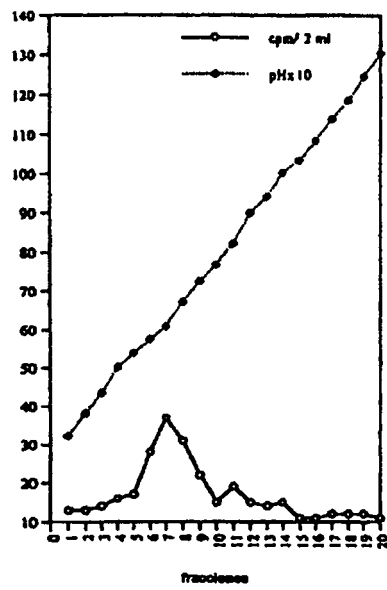


FIGURA 20

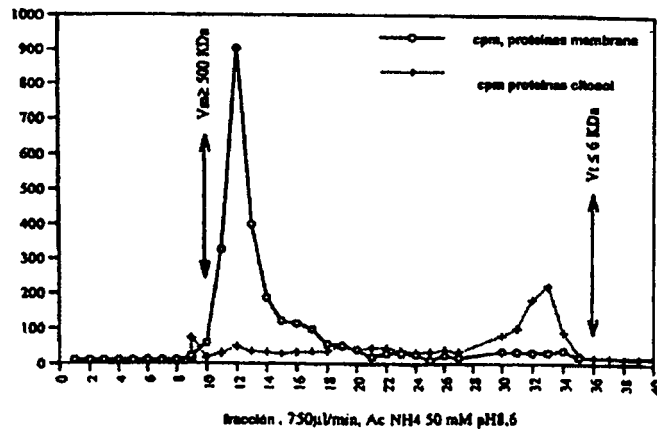


FIGURA 21

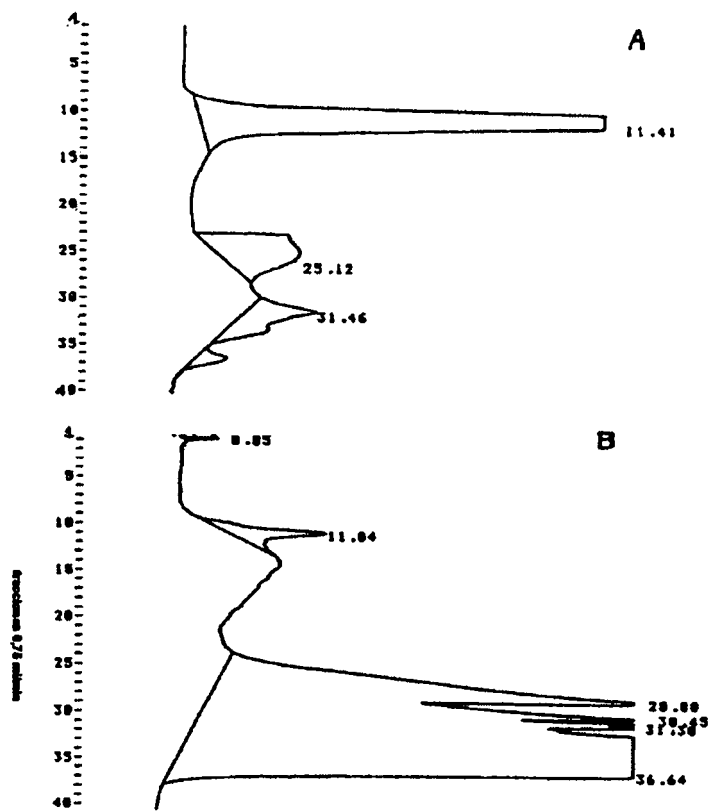


FIGURA 22

